

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE DOUTORADO**

**CARACTERIZAÇÃO DA PRÓPOLIS DE *Apis mellifera* L.  
PRODUZIDA NA BAÍA DO IGUAPE, BAHIA, BRASIL**

**ADAILTON FREITAS FERREIRA**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA  
FEVEREIRO - 2017**

**CARACTERIZAÇÃO DA PRÓPOLIS DE *Apis mellifera* L.  
PRODUZIDA NA BAÍA DO IGUAPE, BAHIA, BRASIL**

**ADAILTON FREITAS FERREIRA**

Engenheiro Agrônomo

Universidade Federal de Sergipe, 2010

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Agrárias (Área de Concentração: Fitotecnia).

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Maria Letícia Miranda Fernandes Estevinho

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Geni da Silva Sodré

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA**

**FEVEREIRO - 2017**

## FICHA CATALOGRÁFICA

F383c

Ferreira, Adailton Freitas.

Caracterização da própolis de *Apis mellifera* L. produzida na Baía do Iguape, Bahia, Brasil / Adailton Freitas Ferreira. – Cruz das Almas, BA, 2017. 99f.; il.

Orientador: Carlos Alfredo Lopes de Carvalho.

Coorientadora: Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas.

1.Própolis – Produtos apícolas. 2.Própolis – Propriedades. 3.Iguape, Baía de (BA) – Avaliação. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Sodré, Geni da Silva. III.Título.

CDD: 638.135

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitaria de Cruz das Almas • UFRB.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE DOUTORADO**

**CARACTERIZAÇÃO DA PRÓPOLIS DE *Apis mellifera* L.  
PRODUZIDA NA BAÍA DO IGUAPE, BAHIA, BRASIL**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE  
Adailton Freitas Ferreira**

Realizada em 17 de Fevereiro de 2017

Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia / UFRB  
Examinador Interno (Orientador)

Profa. Dra. Adriana Regina Bagaldo  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia / UFRB  
Examinador Externo

Profa. Dra. Joana Fidelis da Paixão  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano / IFBAIANO  
Examinador Externo

Prof. Dr. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo  
Universidade Estadual de Maringá / UEM  
Examinador Externo

Profa. Dra. Yzila Liziane Farias Maia de Araújo  
Universidade Federal de Sergipe / UFS  
Examinador Externo

## **DEDICATÓRIA**

**Dedico a Norailde Ferreira, a Pedro Ferreira e a Cátia Lucas por todos os dias transformarem meus sonhos em realidade.**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela bolsa de estudo concedida (BOL0493/2013) e pelo auxílio financeiro (PET 0022/2012).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado sanduiche (SWE) concedida no âmbito da chamada de projetos MEC/MCTI/CAPES/CNPq/FAPs nº 09/2014 – Pesquisador Visitante Especial (Processo: 88881.062167/2014-01; Proposta: 189737).

Ao Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal, por permitir a realização do doutorado sanduiche.

Ao Grupo de Pesquisa INSECTA, com vocês aprendi ciência e me fortaleci como profissional.

Aos meus Orientadores Carlos Carvalho, Letícia Estevinho e Geni Sodré, obrigado pela parceria, ensinamentos, confiança e amizade. Graças a vocês amanheço todos os dias com várias interrogações e respeitando cada vez mais a ciência.

À Deus por estar sempre ao meu lado mostrando todos os dias que tudo é possível.

Aos meus pais, Pedro Adailton Ferreira e Norailde Freitas Ferreira, que durante 32 anos não deixaram faltar amor, carinho e compreensão. Obrigado por acreditarem em minha formação profissional! Devo mais essa conquista a vocês!

À minha esposa, Cátia Ionara Santos Lucas, que incansavelmente esteve ao meu lado, arrancando sorrisos quando menos esperava e chamando a atenção quando era preciso. Obrigado pela paciência e palavras de incentivo!

Aos meus irmãos, Thed Freitas Ferreira e Filipe Freitas Ferreira, sogra, cunhados, primos, tios e avós por me mostrarem todos os dias o quanto a família faz a diferença. Com o apoio de vocês tudo se torna mais fácil!

Aos professores e funcionários da UFRB, (Fábio Dias, Breno, Maria das Graças) colaboradores incansáveis.

Às minhas eternas amigas e conselheiras Lucyana Mendonça e Yzila Araújo, independente de tempo e distância sempre estiveram presentes. Obrigado pelo companheirismo, gratidão que levo pra vida inteira!

Ao Antônio Santos e sua família, que sempre nos receberam com todo respeito e atenção em sua residência durante a execução do projeto. Obrigado!

À turma da BIG (Baía do Iguape), com vocês os sorrisos eram garantidos e as viagens ao Iguape mais prazerosas.

Ao grupo de pesquisa do Instituto Politécnico de Bragança/PT. Georgina Tolentino, Vanessa Branco Paula, Ananias Pascoal, Fátima Cruz, Ana Paula Pereira, Arminda Marcelo, Sá Moraes, Luís Avelino Guimarães Dias. Obrigado pelo acolhimento, carinho e atenção!

Aos companheiros, Cerilene Machado, Deuzuite Teles, Eloi Machado Alves, Emerson Chambó, Fabrício Chagas, Gabriela Oliveira, Guilherme Hereda, Lorena Nunes, Maiara Machado, Mariza Ferreira, Polyana Carneiro, Renata Lima, Roberto Sampaio e Samira Cavalcante. O mérito é todo nosso, obrigado!

E por fim, minha eterna paixão e total admiração: as Abelhas!

## SUMÁRIO

Página

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**REFERENCIAL TEÓRICO.....01**

**ARTIGO 1**

COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA PRÓPOLIS PRODUZIDA EM APIÁRIOS NO ENTORNO NA BAÍA DO IGUAPE, BRASIL.....26

**ARTIGO 2**

COMPOSTOS FENÓLICOS DA PRÓPOLIS PRODUZIDA EM APIÁRIOS NO ENTORNO DA BAÍA DO IGUAPE, BRASIL.....49

**ARTIGO 3**

ATIVIDADES DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA DA PRÓPOLIS PRODUZIDA EM APIÁRIOS NO ENTORNO DA BAÍA DO IGUAPE, BRASIL.....70

**CONSIDERAÇÕES FINAIS.....91**



## **CARACTERIZAÇÃO DA PRÓPOLIS DE *Apis mellifera* L. PRODUZIDA NA BAÍA DO IGUAPE, BAHIA, BRASIL**

Autor: Adailton Freitas Ferreira

Orientador: Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

**RESUMO:** O objetivo desse trabalho foi a caracterização físico-química e a avaliação do seu efeito na inibição de enzimas, com importância ao nível da saúde humana, de amostras de própolis produzidas em apiários localizados no entorno da Baía do Iguape, Bahia, Brasil. O estudo foi realizado em três apiários, com colônias de *Apis mellifera* instaladas em colmeias Langstroth adaptadas com coletores de própolis. As coletas foram realizadas mensalmente, de agosto de 2013 a julho de 2014. Foram avaliados os parâmetros físico-químicos: umidade, cinzas, cera, massa mecânica, sólidos solúveis, índice de oxidação, extrato seco, fenóis totais, flavonoides totais, antioxidantes, perfil dos ácidos graxos e compostos fenólicos. Na atividade enzimática foi avaliada a inibição das enzimas:  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glucosidase, lipase, acetilcolinesterase, butirilcolinesterase e tirosinase. Também, foram determinadas as atividades anti-inflamatória e anti-hemolítica. Todas as amostras apresentaram atividade antioxidante e os parâmetros físico-químicos estão em conformidade com a legislação Brasileira para este produto, exceto teor de cera, extrato seco e flavonoides. Observaram-se ácidos graxos da família do ômega-3 ( $\omega$ 3) e ômega-9 ( $\omega$ 9). Todos os ácidos fenólicos encontrados pertencem a classe dos hidroxicinâmicos, exceto o ácido benzoico-4-sulfato, e os flavonoides das classes flavonas, flavonóis e flavonona, destacando os flavonoides glicosilados apigenina-6-C-glucosyl-8-C-arabinose, apigenina-8-C-arabinose e kaempferol-3-O-glucoside. As amostras apresentaram benefícios potenciais na inibição das diferentes enzimas avaliadas com melhor desempenho das amostras de novembro/2013 a janeiro/2014. A própolis em estudo pode ser considerada uma fonte de antioxidantes naturais, podendo ser explorada como matéria prima para produtos nutracêuticos e cosméticos.

**Palavras-chave:** *Apis mellifera*, produto apícola, antioxidante, ômega-3, compostos fenólicos, ações biológicas.

## CHARACTERIZATION OF PROPOLIS FROM *Apis mellifera* L. PRODUCED NEAR BAÍA DO IGUAPE, BAHIA, BRAZIL

Author: Adailton Freitas Ferreira

Advisor: Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

**ABSTRACT:** This work aimed at the physical-chemical characterization and evaluation of the effect of propolis of *Apis mellifera* L. on the inhibition of enzymes that are important for human health of propolis samples produced in apiaries located near Baía do Iguape, Bahia, Brazil. The study was conducted in three apiaries with colonies of *Apis mellifera* installed in Langstroth hives adapted with propolis collectors. The sampling was carried out monthly, from August 2013 to July 2014. We evaluated the physical and chemical parameters: moisture, ash, wax, mechanical mass, soluble solids, index of oxidation, dry extract, total phenols, total flavonoids, antioxidants, fatty acids profile and phenolic compounds. In the enzymatic activity, it was evaluated the inhibition of enzymes:  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, lipase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and tyrosinase. In addition, it was determined anti-inflammatory and anti-hemolytic activities. All samples showed that the antioxidant activity and the physical-chemical parameters are in accordance with the Brazilian legislation for this product, except for the contents of wax, dry extract and flavonoids. Fatty acids were in the family of Omega-3 ( $\omega$ 3) and Omega-9 ( $\omega$ 9). All phenolic acids found belong to the class of hydroxycinnamic, except for benzoic-4-sulfate acid, and the flavonoids of the classes flavones, flavonols and flavanone, highlighting the glycosylated flavonoids apigenin-6-C-glucosyl-8-C-arabinose, apigenin-8-C-arabinose and kaempferol-3-O-glucoside. The samples showed potential benefits in inhibiting the enzymes evaluated with better performance of the samples from November 2013 to January 2014. The propolis in study can be considered a source of natural antioxidants and can be used as raw material for nutraceutical and cosmetic products.

**Key-words:** *Apis mellifera*, bee product, antioxidant, omega-3, phenolic compounds, biological actions.

## REFERENCIAL TEÓRICO

### Apicultura

Os primeiros registros de abelhas na terra datam cerca de 125 milhões de anos, e seu sucesso evolutivo ocorreu graças à vida em sociedade, a qual permitiu o desenvolvimento e a potencial adaptação em praticamente todos os habitats da terra (BANKOVA, 2005). O número de indivíduos na natureza, estrutura física como tamanho corporal, aparelho bucal, pernas corbiculadas e pelos aderentes são fatores que facilitam a adaptação das abelhas às diversas estruturas florais possibilitando maior eficiência como polinizadoras, sendo este o principal serviço ecossistêmico prestado pelas abelhas (BACAXIXI et al., 2011). Substancialmente esses insetos contribuem na economia com o aumento da produção agrícola, além de elaborarem produtos que são comercialmente apreciados pela população humana quer seja para alimentação ou para usos fitoterápicos (CORBY-HARRIS et al., 2016).

A importância das abelhas como polinizadores na agricultura tem sido bastante documentada em todo o mundo. Blitzer et al. (2016) observaram que as abelhas nativas nos Estados Unidos contribuem com os serviços essenciais de polinização na cultura de maçã, com um aumento significativo no número de sementes por fruto e uma redução na limitação de pólen. No Brasil, Saturni et al. (2016) verificaram que a presença de abelhas na cultura do café resultou em um aumento de 28% dos frutos, que pode sofrer maior influência quando as culturas estão próximas de áreas de fragmentos florestais, acarretando também na participação de abelhas nativas, uma vez que, estas apresentam um raio de ação menor que as *Apis mellifera* L. Outras culturas agrícolas como manga (RAMIREZ; DAVENPORT, 2016), maracujá (YAMAMOTO et al., 2012) melão (SHIN et al., 2007) entre outras, obtiveram maior rendimento quando ocorreu polinização por abelhas.

A atividade apícola brasileira iniciou-se com a introdução das abelhas *A. mellifera* pelos padres e imigrantes nos anos de 1830 no período das missões e apresentou um grande avanço genético, tecnológico e de produção a partir da década de 1950 com o cruzamento das abelhas africanas com as europeias que habitavam no território brasileiro (KERR et al., 2001; TOLEDO et al., 2006). Por se

tratar de uma atividade que envolve o aspecto social, econômico e ambiental a apicultura brasileira tornou-se um agronegócio por exportar produtos naturais de alto valor no mercado como mel e própolis (SANTOS; RIBEIRO, 2009; OLDONI et al., 2011).

O mel é o produto mais explorado na apicultura. O último censo de Produção da Pecuária Municipal realizado pelo IBGE (2015) indicou que o Brasil produziu 37,82 mil toneladas de mel representando redução de 1,7% em relação ao censo anterior. A Região Sul foi a maior produtora (37,3%), seguida pela Região Nordeste (32,6%), Sudeste (23,4%), Centro-Oeste (4,2%) e Norte (2,5%). A pesquisa mostrou que entre as Regiões, o Nordeste registrou um aumento na produção de mel de 16,6% destacando os Estados da Bahia e Piauí. Na Bahia, o município Campo Alegre de Lourdes apresentou maior destaque de produção. No total, a produção brasileira gerou R\$ 358,85 milhões, representando um aumento de 13,9% quando comparado as avaliações anteriores.

A própolis é o segundo produto mais explorado na apicultura brasileira, estando o Brasil em segundo lugar na produção mundial ficando atrás apenas da China (SEBRAE, 2015). Segundo a Cooperativa Nacional de Apicultura – CONAB (2015) são produzidos no Brasil mais de 100 toneladas de própolis por ano, sendo que 70% da produção é da própolis verde, destacando-se o Estado de Minas Gerais responsável por 90% da exportação desse tipo de própolis. Em Alagoas, cerca de 60 produtores familiares estão produzindo aproximadamente 100 kg/mês da própolis vermelha, sendo 92% da produção exportada para países como Japão, Coreia do sul e Coreia do Norte, com valor de comércio de R\$ 500 a 900/kg (SEBRAE, 2015).

### **Própolis**

A própolis é uma substância composta por resinas colhidas por abelhas em brotos, flores e exsudados de plantas, com acréscimo de secreções salivares, pólen e cera, resultando em uma alta variação química no produto final (ZUNINI et al., 2010). Esse produto é elaborado pelas abelhas com intuito de proteger a colônia contra intempéries climáticas, infecções por microrganismos, decomposição de animais mortos entre outros serviços, promovendo o bem-estar da colônia (CASTRO et al., 2014).

O Brasil por apresentar variedade quer na vegetação, quer nas condições climáticas e geográficas favorece a produção de diferentes tipos de própolis (PARK et al., 2004). O estudo de plantas fornecedoras de resina para as abelhas é um fator restritivo e de suma importância no planejamento do manejo apícola e na identificação da origem botânica da própolis (AGUERO et al., 2010), permitindo uma melhor caracterização química, contribuindo para a qualidade e segurança do produto (FALCÃO et al., 2013).

No Brasil, com base na origem botânica, composição química, características físicas e região de produção, foram identificadas e classificadas treze tipos de própolis (DAUGSCH et al., 2008). A própolis da Região Sul foi avaliada por Park et al. (2002), que com auxílio da técnica de cromatografia concluíram que a *Populus alba* é a principal fornecedora de resinas, sendo essa própolis classificada como tipo 3. A própolis tipo 12 oriunda da Região Sudeste, apresenta coloração verde e tem como origem botânica a *Baccharis dracunculifolia* (FUNARI; FERRO, 2006). Na Região Nordeste dois tipos de própolis já tiveram sua origem botânica definida. A do tipo 6, avaliada por Silva et al. (2008) que observaram que as folhas jovens da *Hyptis divaricata* é detentora de resina da qual as abelhas produzem uma própolis de cor marrom avermelhada. Dausch et al. (2008) identificaram a própolis tipo 13, sendo a *Dalbergia ecastaphyllum* a espécie botânica a partir da qual tem origem a própolis vermelha, produzida principalmente em regiões de mangue.

Com o aumento da produção e da diversidade de própolis produzida em todo o Brasil, o Ministério da Agricultura no ano de 2001 criou o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade da Própolis. Foram contemplados parâmetros organolépticos (aroma, cor, consistência e sabor), granulometria e físico-químicos (umidade, cinzas, cera, fenois, flavonoides, atividade de oxidação, massa mecânica, sólidos solúveis em etanol e teor alcoólico). Esse regulamento visa estabelecer a identidade e os requisitos mínimos de qualidade a que a própolis deve atender, independente do tipo em que é enquadrado (BRASIL, 2001).

A sazonalidade é um dos fatores que pode interferir nas características e na qualidade da própolis, fornecendo informações para definir qual a melhor época de produção e melhor disponibilidade de compostos químicos

biologicamente ativos (SFORCIN et al., 2011). Na zona temperada do hemisfério norte, a produção de própolis ocorre apenas no verão e início de outono, enquanto que, na zona tropical, apesar de não haver grandes oscilações na temperatura média e distribuições desuniformes das chuvas, a produção ocorre durante todo o ano (TORRES et al., 2008).

Mendonça et al. (2015) observaram que a variação sazonal não teve efeito significativo sobre a abundância relativa dos principais compostos químicos da própolis vermelha produzida no Estado de Sergipe, no entanto as concentrações destes compostos tiveram oscilações ao longo do ano. O mesmo comportamento foi relatado por Souza et al. (2010), Valencia et al. (2012), Loureiro e Galbiati (2013). As pesquisas têm demonstrado que a sazonalidade não altera o perfil químico, mas pode influenciar quantitativamente os compostos presentes (SIMÕES-AMBROSIO et al., 2012).

Devido à variedade de compostos químicos presentes na própolis e por apresentar propriedades biológicas, este produto apícola vem sendo utilizado como alimento funcional, na produção de cosméticos e em tratamentos terapêuticos (ARAÚJO et al., 2016). Mais de 300 componentes químicos já foram identificados por diversos pesquisadores em diferentes própolis (FALCÃO et al., 2010; PICINELLI et al., 2011; RIGHI et al., 2013; VALENZUELA-BARRA et al., 2015). Dentre os compostos químicos identificados encontram-se os ácidos fenólicos, flavonoides, terpenos, sesquiterpenos,  $\beta$ -esteroides, estilbenos, álcoois e aldeídos aromáticos (PAPOTTI et al., 2012).

Na indústria de alimentos, Siripatrawan e Vitchayakitti (2016) utilizaram extrato de própolis na elaboração de papel filme de embalagem e constataram melhor desempenho das propriedades mecânicas, de barreira, atividades antioxidantes e antimicrobiana que na embalagem sem extrato. Segundo estes autores, esse desempenho deve-se às interações entre os grupos funcionais do quitosano e os compostos fenólicos presentes na própolis.

Na agricultura, Pereira et al. (2014a) aplicaram extrato de própolis em cultura de feijão e obtiveram um aumento dos teores de nutrientes foliares (N, Mg e Fe), redução da severidade da antracnose, aumento da superfície fotossintética e aumento da produtividade. Avaliando o desenvolvimento de mudas de café com o uso de extratos de própolis na nutrição foliar, Pereira et al. (2014b)

verificaram aumento no teor de nitrogênio, manganês, teor de massa seca da raiz e das partes aéreas e total da planta.

Em ensaios da avaliação da atividade antioxidante *in vitro* utilizando os métodos de sequestro de radicais livres, o 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico) (ABTS) a própolis vermelha apresentou maior capacidade antirradicalar, seguida da verde e marrom. Estas atividades podem ser justificadas devido a diferenças quantitativas e qualitativas nos compostos fenólicos encontrados nas amostras de própolis (MACHADO et al., 2016). A própolis verde também apresentou capacidade antioxidante pelo método ORAC (CORRÊA et al., 2016).

Os compostos fenólicos, principalmente os flavonoides, são os principais responsáveis pelas ações biológicas da própolis (WAGH, 2013). Flavonoides como quercetina, apigenina, kaempferol e luteolina, estavam presentes em amostras de própolis avaliadas por Valenzuela-Barra et al. (2015) que evidenciaram atividade anti-inflamatória. Os resultados mostraram que as amostras foram mais eficazes nas inflamações induzidas por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) do que por ácido araquidônico.

Estudos têm demonstrado que a própolis apresenta, além da ação anti-inflamatória (VALENZUELA-BARRA et al., 2015) e antioxidante (MACHADO et al., 2016), princípios ativos com ação antimicrobiana (NEVES et al.; 2016), prevenção e regressão de doenças degenerativas como o câncer (MENDONÇA et al., 2015; MACHADO et al., 2016), diabetes (BEZERRA et al., 2012), Alzheimer (MIGUEL et al., 2014) entre outras. Muitos pesquisadores relacionam essas doenças à presença excessiva dos radicais livres (ALVES et al., 2010).

### **Radicais livres**

Os radicais livres são espécies químicas formadas por um átomo ou associações de átomos que possuem um elétron desemparelhado na sua órbita externa. Para que haja estabilidade é necessário a doação ou retirada de elétron de outra molécula, fato que ocasiona instabilidade energética e cinética (VALKO et al., 2007). Em condições normais, é inevitável o surgimento de radicais livres no organismo devido às várias reações bioquímicas essenciais no metabolismo celular, como exemplo da respiração celular nas mitocôndrias que geram energia

na forma de ATP - adenosina trifosfato (CASTROGIOVANNI; IMBESI, 2012), encontra-se envolvido no processo de fagocitose, regulamentação do crescimento celular, sinalização intercelular e na síntese de substâncias (ALVES et al., 2010).

O consumo de oxigênio no metabolismo celular promove de forma natural a produção dos principais radicais livres, as espécies reativas de oxigênio, que em concentrações moderadas, são benéficas às células, estando envolvidas em vários processos fisiológicos (FERREIRA et al., 2008). Estes radicais são instáveis, altamente reativos e incluem o ânion radical superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxila ( $OH\cdot$ ), e diversas moléculas peróxidos (LUSHCHAK, 2014). Vale salientar que o composto peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) apesar de ser considerada espécie reativa de oxigênio, por apresentar oxigênio molecular ( $O_2$ ), não é um radical livre, mas é capaz de promover danos ao DNA por meio de reações enzimáticas (LIOCHEV, 2013). Há também espécies reativas de nitrogênio (óxido nítrico, peroxinitrito), carbono (BILD et al., 2013) e enxofre (JACOB, 2006).

A produção dos radicais livres é mantida em equilíbrio com a defesa antioxidante das células, sendo esta a condição essencial para funcionamento saudável do organismo (JURÁNEK et al., 2013). Porém, por mais que haja mecanismos de defesa do organismo, a exposição excessiva à luz solar, a falta de exercícios físicos, alimentação desregrada no dia a dia tornam a defesa antioxidante insuficiente (BUONOCORE et al., 2010) resultando em elevadas concentrações de radicais que podem induzir alterações severas na estrutura celular, ocasionando desequilíbrio chamado estresse oxidativo (KEHRER et al., 2015). Este desequilíbrio pode promover danos deletérios às mitocôndrias, ao DNA, oxidar lipídios e proteínas atacando as cadeias de ácidos graxos polinsaturados dos fosfolipídios e colesterol, iniciando o processo de peroxidação lipídica das membranas celulares (CASTROGIOVANNI; IMBESI, 2012; KEHRER et al., 2015; HAMMOND; JOHNSON; GEORGE, 2016).

Durante décadas, pesquisadores de diferentes frentes de pesquisas têm debruçado esforços para esclarecer o papel dos radicais livres em processos de degradação dos alimentos (WANG et al., 2016) e patológicos como o envelhecimento (LABAT-ROBERT; ROBERT et al., 2014), diabetes (KIM; PARK, 2016), obesidade (RAZZAGHY-AZAR et al., 2016), inflamações (FUJIWARA et



al., 2016), doenças degenerativas como o câncer (CITRON et al., 2016), doença de Alzheimer (WOJTUNIK-KULESZA et al., 2016) e doença de Parkinson (HASEGAWA, 2010) entre outras.

### **Antioxidantes**

Agentes antioxidantes são substâncias com capacidade de remover radicais livres, prevenir, inibir ou atrasar reações de oxidação de estruturas celulares (CAROCHO et al., 2013). Estes agentes doam átomos de hidrogênio para os radicais livres tornando-os mais estáveis e impedindo a autooxidação (ALVES et al., 2010).

Para evitar os danos oxidativos causados pelos radicais livres, o organismo desenvolveu sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos ou endógenos, os quais são os primeiros a agir evitando acúmulos de radicais, e incluem diversas enzimas, principalmente, a superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase e glutatona redutase (YU et al., 2015). Associado à defesa enzimática há também os antioxidantes não enzimáticos ou exógenos, como as vitaminas, glutatona, ácido úrico, melatonina, compostos fenólicos (ANGELO; JORGE, 2007). Essas defesas antioxidantes atuam para manter o equilíbrio homeostático celular e prevenir contra patologias (ALVES et al., 2010).

Os antioxidantes exógenos também são utilizados para prevenir e retardar deterioração oxidativa dos alimentos durante o processamento e armazenamento (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). Os antioxidantes comumente utilizados como aditivos alimentares são os compostos fenólicos sintéticos, representados pelo hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), galato de propilo (PG) e terc-butilhidroquinona (TBHQ) (MAKAHLEH; SAAD; BARI, 2015) e os compostos naturais, como tocoferóis e compostos fenólicos (WENG; YEN, 2015). Os antioxidantes sintéticos são estáveis e eficazes contra a oxidação, no entanto o seu uso tem se tornado cada vez mais limitado pela indústria devido aos potenciais efeitos tóxicos e carcinogênicos (BIPARVA; EHSANI; HADJMOHAMMADI, 2012; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). Nas últimas décadas houve um aumento de investigações que buscam identificar novos compostos antioxidantes naturais que sejam seguros à saúde humana (JIANG; XIONG, 2016).

## Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são as principais fontes de antioxidantes naturais provenientes do metabolismo secundário das plantas (COHEN; KENNEDY, 2010). Estes metabólitos são oriundos de vias bioquímicas intermediárias, não interferindo nos metabolismos celulares vitais (GURNANI et al., 2014). Nas plantas, os compostos fenólicos auxiliam no crescimento, reprodução, coloração e sabor dos frutos, atraem polinizadores, sendo intensamente produzidos, em aç 8 antioxidante como estratégia de defesa, especialmente, sob condições de estresse (radiação ultravioleta, infecções, déficit hídrico, ferimentos) (MUCHUWETI et al., 2007; TAKSHAK; AGRAWAL, 2015).

Esses compostos são substâncias que apresentam em sua formação química um ou mais grupos hidroxila ligados a anel aromático, podendo variar desde moléculas simples a polímeros de elevado peso molecular denominados de polifenóis (HARBORNE, 1989; CHEYNIER, 2012). Apesar do termo “polifenóis” ser muito utilizado como sinônimo de compostos fenólicos, este se restringe a compostos com pelo menos dois anéis aromáticos em sua estrutura química (QUIDEAU et al., 2011).

Diante da diversidade estrutural, os compostos fenólicos são classificados em: ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e taninos (OZCAN et al., 2014). No entanto, essa revisão enfatizará os ácidos fenólicos e flavonoides por serem os principais compostos encontrados em produtos naturais, como a própolis, e estarem relacionados às ações biológicas (Figura 1).

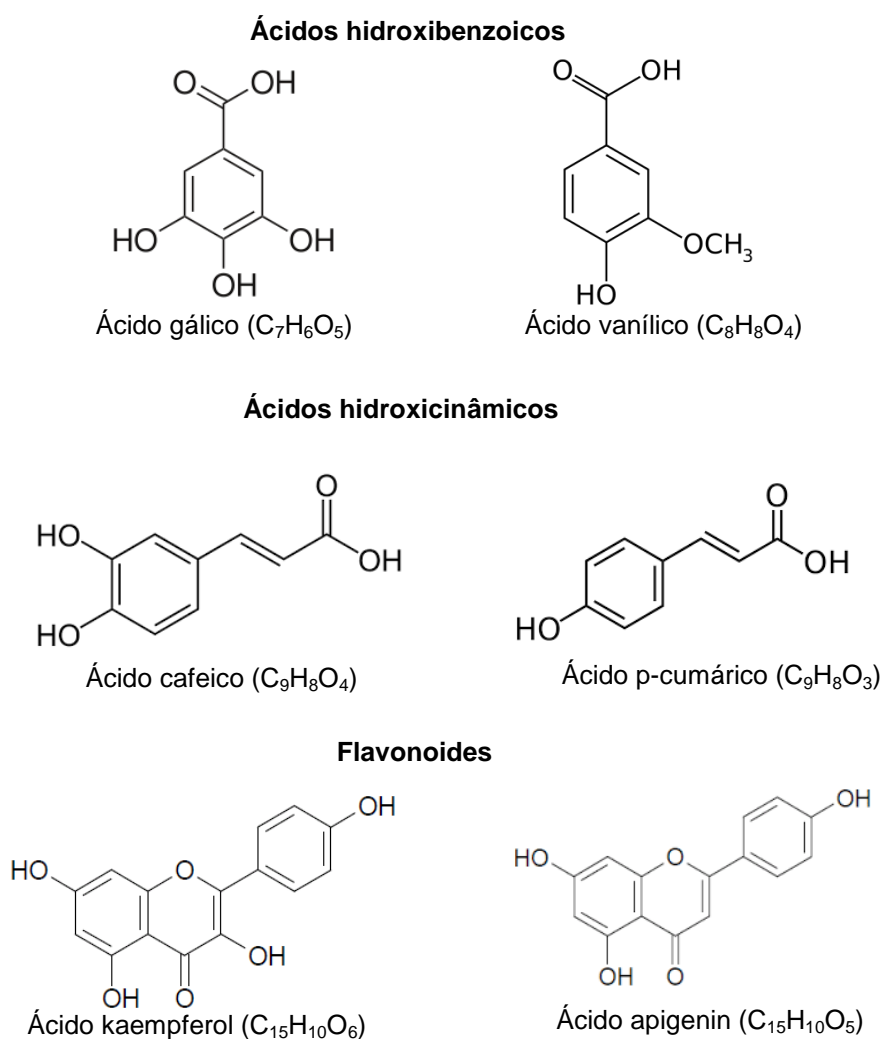
Os ácidos fenólicos são classificados em ácidos hidroxibenzoicos e ácidos hidroxicinâmicos. O ácido gálico, vanílico e protocatequídico são exemplos de ácidos hidroxibenzoicos que apresentam em sua estrutura sete átomos de carbono ( $C_6-C_1$ ), e os ácidos hidroxicinâmicos com nove átomos de carbono na cadeia principal, seis compoem o anel aromático e três formam uma cadeia lateral ( $C_6-C_3$ ) comuns aos ácidos cafeico, p-cumárico e ferúlico (D'ARCHIVIO et al., 2007; OLIVEIRA; BASTOS, 2011).

Os flavonoides são constituídos por dois anéis aromáticos e um anel heterocíclico oxigenado, perfazendo em sua estrutura básica um total de quinze carbonos ajustados em três anéis ( $C_6-C_3-C_6$ ) que de acordo com a oxigenação do anel heterocíclico originam uma série de formações estruturais, as quais

proporcionam a diferenciação dos flavonoides nas classes de flavonas, flavonol, isoflavonas, flavanonas, flavanonol, flavanol e antocianidina (NACZK; SHAHIDI, 2004; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

Em matrizes químicas oriundas de produtos naturais, a exemplo da própolis, que servem como base para elaboração de novos fármacos, cosméticos, alimento funcional e aditivos alimentares, seguro à saúde humana tem sido amplamente estudada a ação biológica dos compostos fenólicos, especialmente os ácidos fenólicos e flavonoides (ATANACOV et al., 2015).

**Figura 1.** Exemplos das estruturas químicas dos compostos fenólicos. Fonte: <http://phenol-explorer.eu>



A determinação desses compostos pode ser efetuada através de métodos espectrofotométricos utilizados como um indicativo da presença quantitativa de um grupo de compostos fenólicos e por métodos cromatográficos (ANGELO; JORGE, 2007). Normalmente, em própolis os métodos espectrofotométricos mais utilizados são os do Folin-Ciocalteu e do Cloreto de Alumínio que quantificam, respectivamente, os fenóis totais e flavonoides totais (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999; ALENCAR et al., 2007; MACHADO et al., 2016). A cromatografia é um método analítico mais específico na identificação e quantificação dos compostos fenólicos (LOPES et al., 2014). Este método baseia-se na separação de moléculas devido à sua diferença estrutural e química a partir de um sistema com fase móvel, podendo ser um gás ou líquido, que se move através de uma coluna na fase estacionária e de acordo com a afinidade da amostra ocorrerá a separação e, posteriormente, a identificação e quantificação dos compostos (COLLINS, 2006).

Entre as diferentes técnicas cromatográficas, as mais utilizadas para identificar e quantificar compostos em amostras de própolis de diferentes países do mundo é a cromatografia líquida e cromatografia gasosa (HUANG et al., 2014). A incorporação do detector de massa (espectrofotometria de massa) à High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ou Cromatografia gasosa (GC) permite identificar compostos pela massa molecular independente dos padrões de referência, porém para quantificar os compostos é essencial dispor de uma biblioteca de padrões (FALCÃO et al., 2013).

A busca por moléculas químicas naturais tem estimulado a pesquisa em identificar os efeitos dos compostos fenólicos, os quais podem resultar da ação sinérgica e/ou de compostos específicos. Bezerra et al. (2012) investigaram o efeito do composto éster fenólico do ácido cafeico (CAPE) na sinalização da insulina e nas vias inflamatórias do fígado de camundongos com obesidade induzida, estes verificaram, após 12 semanas de tratamento, a restauração na sinalização intracelular da insulina e redução considerável na esteatose hepática, sugerindo o CAPE como um potencial agente terapêutico em alterações metabólicas provocadas pela obesidade. Búfalo et al. (2013) em ensaios *in vitro* com o método DPPH demonstraram que o ácido cafeico apresentou melhor atividade antioxidante quando comparado com o efeito sinérgico do extrato de

própolis. No entanto, ambos inibiram a produção de óxido nítrico em macrófagos. Estes autores acreditaram que o ácido cafeico e seus derivados podem estar diretamente envolvidos na ação anti-inflamatória e na sinalização celular.

Vargas-Sánchez et al. (2015) avaliaram a atividade dos flavonoides (crisina, galagina, pinocembrina) e ácidos fenólicos (ácido cafeico), comumente encontrados em própolis frente à radicais livres em sistemas químicos, tendo observado que tanto os flavonoides quanto os fenóis apresentaram ação antioxidante com maior tendência para doar elétrons que para os atrair.

Freire et al. (2016) prepararam extratos etanólicos da própolis brasileira dos tipos 3 e 13, fracionaram e submeteram a análise por cromatografia gasosa acoplada ao detector de massa. Em seguida o extrato etanólico e as frações de hexano, diclorometano e acetato de etilo foram testados quanto à capacidade de inibir espécies do gênero *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. kruzei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*) com intuito de determinar as concentrações fungistática e fungicida. A fração diclorometano da própolis tipo 3 e a fração de hexano da própolis tipo 13 foram consideradas as mais efetivas contra leveduras e esta ação estava relacionada à presença do ácido p-cumárico, ester fenético de ácidos cafeico (CAPE), kaempferol, e quercetina para o tipo 3 e medicarpina, vestitol e formononetina para o tipo 13. Todos os extratos e frações na concentração de 500 µg/mL interromperam estruturas dos biofilmes e, nas observações de microscopia de varredura verificaram-se áreas com danos celulares.

As análises cromatográficas são uma ferramenta que além de determinar o perfil químico de um produto também rotula um composto como marcador químico conferindo-lhe uma identidade, contribuindo para sua padronização e controle de qualidade (PICCINELLI et al., 2011; RASHEED et al., 2012). Com o uso das técnicas cromatográficas Silva et al. (2008) constataram que a formononetina, daidizeína e isoliquiritigenina, compostos pertencentes ao grupo dos flavonoides, foram considerados marcadores químicos da própolis vermelha. Park et al. (2004) indicaram o Artepelin C para a própolis verde devido a alta concentração, frequência e, principalmente, por estes compostos nunca terem sido descritos para esse tipo de produto.

Diante da gama de diversidade fitogeográfica presente no Brasil, a identificação de novos tipos de própolis, assim como marcadores, que os caracterizem pode vir a surpreender, pois apesar de vários estudos com própolis brasileira, ainda há várias áreas com potencial para produção ainda não explorada. Como exemplo tem-se a região da Baía do Iguape, situada na Baía de Todos os Santos a 100 km de Salvador, capital do Estado da Bahia, banhada pelo Rio Paraguaçu e manguezais, com vegetação preponderante de Mata Atlântica (PROST, 2010). Nesta área, a atividade apícola é uma alternativa de renda para os pequenos agricultores. Neste contexto, visando incentivar a produção e comercialização da própolis, este estudo teve como objetivo a caracterização físico-química e a avaliação do efeito na inibição de enzimas, com importância ao nível da saúde, de amostras de própolis produzida em apiários localizados no entorno da Baía do Iguape, Bahia, Brasil.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUERO, M.B.; GONZALEZ, M.; LIMA, B.; SVETAZ, L.; SANCHEZ, M.; ZACCHINO, S.; FERESIN, G.E.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; PALERMO, J.; WUNDERLIN, D.; TAPIA, A. Argentinean propolis from *Zuccagnia punctata* Cav. (Caesalpinaeae) exudates: phytochemical characterization and antifungal activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n.1, p.194-201, 2010.

ALENCAR, S.M.; OLDONI, T.L.C.; CASTRO, M.L.; CABRAL, I.S.R.; COSTA-NETO, C.M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red própolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, n.2, p.278-83, 2007.

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v.33, n.10, p.2202-2210, 2010.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos-uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n.1, p.1-9, 2007.

ARAÚJO, K.S.S., JUNIOR, J.F.S., SATO, M.O., FINCO, F.D.B.A., SOARES, I. M., BARBOSA, R.S., ALVIM, T.C.; ASCENIO, S.D.; MARIANO, S.M.B. Physicochemical properties and antioxidant capacity of própolis of stingless bees (*Meliponinae*) and *Apis* from two regions of Tocantins, Brazil. **Acta Amazonica**, v.46, n.1, p. 61-68, 2016.

ATANACOV, A. G., WALTENBERGER, B., PFERSCHY-WENZIG, E.M., LINDER, T., WAWROSCH, C., UHRIN, P., TEMML, V., WANG, L., SCHWAIGER, S., HEISS, E.H., ROLLINGER, J. M., SCHUSTER, D., BREUSS, J.M., BOCHKOV, V., MIHOVILOVIC, M.D., KOPP, B., BAUER, R., DIRSCH, V.M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v.33, p.1582-1614, 2015.

BACAXIXI, P.; BUENO, C.E.M.S.; RICARDO, H.A.; EPIPHANIO, P.D.; SILVA, D.P.; BARROS, B.M.C.; SILVA, T.F.; BOSQUE, G.G.; LIMA, F.C.C. A importância da apicultura no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v.10, n. 20, p.1-6, 2011.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 114-117, 2005.

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

BILD, W.; CIOBICA, A.; PADURARIU, M.; BILD, V. The interdependence of the reactive species of oxygen, nitrogen, and carbono. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v.69, p.147-154, 2013.

BIPARVA, P.; EHSANI, M.; HADJMOHAMMADI, M. R. Dispersive liquid–liquid microextraction using extraction solvents lighter than water combined with high performance liquid chromatography for determination of synthetic antioxidants in fruit juice samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.27, p.87-94, 2012.

BLITZER, E.J.; GIBBS, J.; PARK, M.G.; DANFORTH, B.N. Pollination services for apple are dependent on diverse wild bee communities. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 221, p.1-7, 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Instrução Normativa nº 3 – ANEXO VI - Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 19 jan. 2001.

BÚFALO, M.C.; FERREIRA, I.; COSTA, G.; FRANCISCO, V.; LIBERAL, J.; CRUZ, M.T.; LOPES, M.C.; BATISTA, M.T.; SFORCIN, J.M. Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF-KB and MAPK activation in macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v.149, p.84-92, 2013.

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

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

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



CASTROGIOVANNI, P; IMBESI, R. Oxidative stress and skeletal muscle in exercise. **Italian Journal of Anatomy and Embryology**, v.117, n.2, p.107-117, 2012.

CHEYNIER, V. Phenolic compounds: from plants to foods. **Phytochemistry Reviews**, v.11, p.153–177, 2012.

CITRON, B.A.; AMEENUDDIN, S.; UCHIDA, K.; SUO, W.Z.; SANTACRUZ, K.; FESTOFF, B.W. Membrane lipid peroxidation in neurodegeneration: Role of thrombin and proteinase-activated receptor-1. **Brain Research**, v.15, n.1643, p.10-17, 2016.

COHEN, S.D.; KENNEDY, J.A. Plant Metabolism and the Environment: Implications for Managing Phenolics. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.50, n.7, p.620-643, 2010.

COLLINS, C.H. Princípios Básicos de cromatografia. In COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos da cromatografia**: Campinas, Unicamp, 2006, p.453.

COOPERATIVA NACIONAL DE APICULTURA – CONAB. Disponível em <http://www.conap.coop.br/2016/05/05/crise-economica-faz-crescer-o-uso-da-dapopolis-verde/>. (2015). Acesso e 27 de dezembro de 2016.

CORBY-HARRIS, V.; MEADOR, C.A.D.; SNYDER, L.A.; SCHWAN, M.R.; MAES, P.; JONES, B.M.; WALTON, A.; ANDERSON, K.E. Transcriptional, translational, and physiological signatures of undernourished honey bees (*Apis mellifera*) suggest a role for hormonal factors in hypopharyngeal gland degradation. **Journal of Insect Physiology**, v.85, p.65-75, 2016.

CORRÊA, W.R.; LÓPEZ, B.G.; PRADO, S.C.; CUNHA, I.B.S.; SAWAYA, A.C.H.F.; SALVADOR, M.J. ESI-MS fingerprinting of residues of green própolis,

and evaluation of their antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of Apicultural Research**, v.55, n.1, p.1-7, 2016.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; BENEDETTO, R.D.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Ann Ist Super Sanità**, v.43, n.4, p.348-361, 2007.

DAUGSCH, A.; MORAIS, C.S.; FORT, P.; PARK, Y.K. Brazilian red propolis – chemical composition and botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.5, n.4, p.435-441, 2008.

FALCÃO, S.I.; VILAS-BOAS M.; ESTEVINHO, M.L.M.; BARROS, C.; DOMINGUES, M.R.M.; CARDOSO, S.M. Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. **Phytochemical Analysis**, v.396, n.1, p. 887-897, 2010.

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: Uncommon Propolis Rich in Flavonoid Glycosides. **Phytochemical Analysis**, v.24, p.309-318, 2013.

FERREIRA, F; FERREIRA, R; DUARTE, J.A. Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, v.7, n.2, p.257-275, 2008.

FREIRES, I.A.; QUEIROZ, V.C.P.P.; FURLETTI, V.F.; IKEGAKI, M.; ALENCAR S.M.; DUARTE M.C.T.; ROSALEN, P.L. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp. **Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology**, v.26, n.2, p.122–132, 2016.

FUJIWARA, N.; SOM, A.T.; PHAM, L.D.; LEE, B.J.; MANDEVILLE, E.T.; LO, E.H.; ARAI, K. A free radical scavenger edaravone suppresses systemic inflammatory

responses in a rat transient focal ischemia model. **Neuroscience Letters**, v. 633, n.28, p.7–13, 2016.

FUNARI, C.S., & FERRO V.O. Análise de própolis. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, 171-178, 2006.

GURNANI, N.; MEHTA, D.; GUPTA, M.; MEHTA, B.K. Natural Products: Source of Potential Drugs. **Journal of Basic and Applied Scientific Research**, v.6, n.6, p.171-186, 2014.

HAMMOND, B.R.; JOHNSON, B.A.; GEORGE, E.R. Oxidative photodegradation of ocular tissues: Beneficial effects of filtering and exogenous antioxidants. **Experimental Eye Research**, v.129, p.135-150, 2014.

HARBORNE, J.B. General Procedures and Measurements of Total Phenolics. In: **Methods in Plant Biochemistry**, pp. 1–28. Dey, P.M. and Harborne, J.B. (Eds.) Academic Press, San Diego, CA., 1989.

HASEGAWA, T. Tyrosinase-Expressing Neuronal Cell Line as in Vitro Model of Parkinson's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v.11, p.1082-1089, 2010.

HUANG, S.; ZHANG, C.; WANG, K.; LI, G.L.; HU, F. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. **Molecules**, v.19, p.19610-19632, 2014.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal 2015**. Brasil, v.43, p.47, 2015.

JACOB, C. A scent of therapy: pharmacological implications of natural products containing redox-active sulfur atoms. **Natural Product Reports**, v.23, p.851-863, 2006.

JIANG, J.; XIONG, Y.L. Natural antioxidants as food and feed additives to promote health benefits and quality of meat products: A review. **Meat Science**, v.120, p.107-117, 2016.

JURÁNEK, I.; NIKITOVIC, D.; KOURETAS, D.; HAYES, A.W.; TSATSAKIS, A.M. Biological importance of reactive oxygen species in relation to difficulties of treating pathologies involving oxidative stress by exogenous antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v.61, p.240–247, 2013.

KEHRER, J.P.; TIPPLE, T.E.; ROBERTSON, J.D.; SMITH, C.V. Free Radicals and Reactive Oxygen Species. **Reference Module in Biomedical Sciences**, v. n. p., 2015.

KERR, W.E.; CARVALHO, G.A.; SILVA, A.C.; ASSIS, M.G.P. Biodiversidade, pesquisa e desenvolvimento na Amazônia: Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Parcerias Estratégicas**, 12, p. 20-41, 2001.

KIM, Y.; PARK, C.W. Adenosine monophosphate-activated protein kinase in diabetic nephropathy. **Kidney Research and Clinical Practice**, v.35, p.69-77, 2016.

LABAT-ROBERT, J.; ROBERT, L. Longevity and aging. Role of free radicals and xanthine oxidase. A review. **Pathologie Biologie**, v.62, p.61–66, 2014.

LIOCHEV, S.I. Reactive oxygen species and the free radicals theory of aging. **Free Radical Biology & Medicine**, v.60, n.1, p.1-4, 2013.

LÓPEZ, B.G.C.; SCHMIDT, E.M.; EBERLIN, M.N.; SAWAYA, A.C.H.F. Phytochemical markers of different types of red propolis. **Food Chemistry**, 146, 174-180, 2014.

LOUREIRO, E.M., GALBIATI C. Evaluation of the influence of seasonality and landscape on the physicochemical characteristics of propolis. **Food Science and Technology**, v.33, n.4, p. 790-795, 2013.

LUSHCHAK, V.I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v.224, n.5, p.164–175, 2014.

MACHADO, B.A.S., SILVA, R.P.D., BARRETO, G.A., COSTA, S.S., SILVA, D.F., BRANDÃO, H.N., ROCHA, J.L.C., DELLAGOSTIN, O.A., HENRIQUES, J.A.P., UMSZA-GUEZ, M.A.; PADILHA, F.F. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. **Plos One**, v.8, p.1-26, 2016.

MAKAHLEH, A.; SAAD, B.; BARI, M. F. Synthetic phenolics as antioxidants for food preservation. In SHAHIDI, F. (Ed.), **Handbook of antioxidants for food preservation**, Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd., p.487, 2015.

MENDONÇA L. S., MENDONÇA F. M. R., ARAÚJO Y. L. F. M., ARAÚJO E. D., RAMALHO S. A., NARAIN N., CARDOSO J. C. Chemical markers and antifungal activity of red propolis from Sergipe, Brazil. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 2, p. 291-298, 2015.

MENDONÇA, I.C.G.; PORTO, I.C.C.M.; NASCIMENTO, T.G.; SOUZA, N.S.; OLIVEIRA, J.M.S.; ARRUDA, R.E.S.; MOUSINHO, K.C.; SANTOS, A.F.; BASÍLIO-JÚNIOR, I.D.; PAROLIA, A.; BARRETO, F.S. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **Complementary and Alternative Medicine**, v.15, n.357, p.1-12, 2015.

MIGUEL, M.G.; DOUGHMI, O.; AZZA, S.; ANTUNES, D.; LYOUSSI, B. Antioxidant, anti-inflammatory and acetylcholinesterase inhibitory activities of propolis from different regions of Morocco. **Food Science Biotechnology**, v.23, n.1, p.313-322, 2014.

MUCHUWETI, M.; KATIVU, E.; MUPURE, C.H.; CHIDEWE, C.; NDHLALA, A.R.; BENHURA, M.A.N. Phenolic composition and antioxidant properties of some spices. **American Journal of Food Technology**, v.2, n.5, p.414-420, 2007.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extractions and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v.1054, n.1-2, p.95-111, 2004.

NEVES, M.V.M.; SILVA, T.M.S.; LIMA, E.O.; CUNHA, E.V.L.; OLIVEIRA, E.J. Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.47, n.1, p.159–166, 2016.

OLDONI, T.L.C.; CABRAL, I.C.R.; D'ARCEA, M.A.B.R.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKIC, M.; NASCIMENTO, A.M.; ALENCAR, S.M. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, v.77, n.1, p.208-213, 2011.

OLIVEIRA, D.M.; BASTOS, D.H.M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v.34, n.6, p.1051-1056, 2011.

OZCAN, T.; AKPINAR-BAYIZIT, A.; YILMAZ-ERSAN, L.; DELIKANLI, B. Phenolics in Human Health. International. **Journal of Chemical Engineering and Applications**, v.5, n.5, p. 393-396, 2014.

PAPOTTI, G.; BERTELLI, D.; BORTOLOTTI, L.; PLESSI, M. Chemical and Functional Characterization of Italian própolis obtained by diferente harvesting methods. **Journal and Food Chemistry**, v. 60, p. 2852-2862, 2012.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINE, A.R.P.; AGUIAR, C.L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v.32, n.6, p.997-1003, 2002.

PARK, Y.R.; PAREDES-GUZMAN, J.F.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; FUJIWARA, F.Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.1100-1103, 2004.

PEREIRA, C.S.; MAIA, L.F.P.; PAULA, F.S. Aplicação de extrato etanólico de própolis no crescimento e produtividade do feijoeiro comum. **Revista Ceres**, v. 61, n.1, p.98-104, 2014a.

PEREIRA, C.S.; SOUZA, F.L.F.; GODOI, C.A. Aplicação de extrato etanólico de própolis (EEP) na nutrição e desenvolvimento de mudas de cafeeiro. **Coffee Science**, v.9, n. 1, p. 14-23, 2014b.

PICCINELLI, A.L.; LOTTI, C.; CAMPONE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; CAMPO-FERNANDEZ, M.; RASTRELLI, L. Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, n.12, p.484-6491, 2011.

PROST, C. Resex marinha versus polo naval na Baía do Iguape. **Novos Cadernos NAEA**, v.13, n.1, p.47-70, 2010.

QUIDEAU, S; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYSÉGU L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v.50, n.3, p.586–621, 2011.

RAMÍREZ, F.; DAVENPORT, T. Mango (*Mangifera indica* L.) pollinations: A Review. **Scientia Horticulturae**, v.203, p.158-168, 2016.

RASHEED, N.M.A.; NAGAI AH, K.; GOUD, P.R.; SHARMA, V.U.M. Chemical marker compounds and their essential role in quality control of herbal medicines. **Annals of Phytomedicine**, v.1, n.1, p.1-8, 2012.

RAZZAGHY-AZAR, M.; NOURBAKHS, M.; POURMOTEBED, A.; NOURBAKHS, M.; ILBEIGI, D.; KHOSRAVI, M. An Evaluation of Aylated Ghrelin and Obestatin Levels in Childhood Obesity and Their Association with Insulin Resistance, Metabolic Syndrome, and Oxidative Stress. **Journal of Clinical Medicine**, v.5, n.7, p.61-85, 2016.

RIGHI, A.A.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Comparative Chemistry of Propolis from Eight Brazilian Localities. **Hidawi - Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-14, 2013.

SANTOS, C.S., RIBEIRO, A.S. Apicultura uma alternativa na busca do desenvolvimento sustentável. **Revista Verde**, v.4, n.3, p.01-06, 2009.

SATURNI, F.T.; JAFFÉ, R.; METZGER, J.P. Landscape structure influences bee community and coffee pollination at different spatial scales. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 235, p.1-12, 2016.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS - SEBRAE. Disponível em [http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS\\_CHRONUS/bd/bds.nsf/cdb856e1dedd81e245438b6ba5ea2c4f/\\$File/4612.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bd/bds.nsf/cdb856e1dedd81e245438b6ba5ea2c4f/$File/4612.pdf). (2015). Acesso em 27 de Dezembro de 2016.

SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. Propolis: Existe potencial para o desenvolvimento de novas drogas? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 253-260, 2011.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects: A review. **Journal of Functional Foods**, v.18, p.820-897, 2015.

SHIN, Y.S.; PARK, S.D.; KIM, J.H. Influence of pollination methods on fruit development and sugar contents of oriental melon (*Cucumis melo* L. cv. Sagyejeol-Ggul). **Scientia Horticulturae**, v. 112, p.388-392, 2007.



SILVA B.B.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V.C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S.M. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.5, n.3, p.313-316, 2008.

SIMÕES-AMBROSIO, L.M.C., GREGORIO, L.E., SOUSA, J.P.B., FIGUEIREDO-RINHEL, A. S. G., AZZOLINI, A., BASTOS, J. K. ET AL. The role of seasonality in the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. **Phytotherapy**, v.81, p. 1102-1108, 2010.

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

SIRIPATRAWAN, U.; VITCHAYAKITTI, W. Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 695-702, 2016.

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

TAKSHAK, S.; AGRAWAL, S.B. Defence strategies adopted by the medicinal plant *Coleus forskohlii* against supplemental ultraviolet-B radiation: Augmentation of secondary metabolites and antioxidants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.97, p.124-138, 2015.

TOLEDO, V.A.A.; TORAL, F.L.B.; MIRANDA, S.B.; SHIRAISHI, A.; HASHIMOTO, J.H.; SILVA, W.R. Ocorrência e coleta de colônias e de enxames de abelhas africanizadas na zona urbana de Maringá, Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 28, n.3, p. 353-359, 2006.

TORRES, R.N.S.; LOPES, J.A.D.; MOITA NETO, J.M.; CITÓ, A.M.G.L. Constituintes voláteis de própolis piauiense. **Química Nova**, v.32, n.3, p.479-485, 2008.

VALENCIA, D.; ALDAY, E.; ROBLES-ZEPEDA, R.; GARIBAY-ESCOBAR, A.; GALVEZ-RUIZ, J.; SALA-REYES, M.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; VALAZQUEZ-CONTRERAS, E.; HERNANDEZ, J.; VELAZQUEZ, C. Seasonal effect on chemical composition and biological activities os Sonoran própolis. **Food Chemistry**, v. 131, p. 645-651, 2012.

VALENZUELA-BARRA, G.; CASTRO, C.; FIGUEROA, C.; BARRIGA, A.; SILVA, X.; HERAS, B.L.; HORTELANO, S.; DELPORTE, C. Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in Region Metropolitana de Santiago, Chile. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 168, p. 37-44, 2015.

VALKO, M; LEIBFRITZ, D; MONCOL, J; CRONIN, M.T.; MAZUR, M; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, n.1, p.44-84, 2007.

VARGAS-SÁNCHEZ, R.D.; MENDOZA-WILSON, A.M.; TORRESCANO-URRUTIA, G.R.; SÁNCHEZ-ESCALANTE, A. Antiradical potential of phenolic compounds fingerprints of própolis extracts: DFT approach. **Computational and Theoretical Chemistry**, v.1066, p.7-13, 2015.

WANG, Y.; MÄKELÄ, N.; MAINA, N.H.; LAMPI, A.; SONTAG-STROHM, T. Lipid oxidation induced oxidative degradation of cereal beta-glucan. **Food Chemistry**, v.197, p.1324–1330, 2016.

WENG, C.; YEN, G. Natural plant extracts as antioxidants for food preservation In SHAHIDI, F. (Ed.), **Handbook of antioxidants for food preservation**, Cambridge, UK: in Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Woodhead Publishing Ltd., p.487, 2015.

WOJTUNIK-KULESZA, K.,A.; ONISZCZUK, A.; ONISZCZUK, T.; WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M. The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.78, p.39–49, 2016.

YAMAMOTO, M.; SILVA, C.I.; AUGUSTO, S.C.; BARBOSA, A.A.A.; OLIVEIRA, P.E. The role of bee diversity in pollination and fruit set of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* forma *flavicarpa*, Passifloraceae) crop in Central Brazil. **Apidologie**, v.43, p.515-526, 2012.

YU, X.L.; LI, Y.N.; ZHANG, H.; SU, Y.J.; ZHOU, W.W.; ZHANG, Z.P.; WANG, S.W.; XU, P.X.; WANG, Y.J.; LIU, R.T. Rutin inhibits amylin-induced neurocytotoxicity and oxidative stress. **Food & Function**, v.6, n.10, p.3296-306, 2015.

ZUNINI, M. P., ROJAS, C., DE PAULA, S., ELINGOLD, I., MIGLIARO, E. A., CASANOVA, M. B., DUBIN, M. Phenolic contents and antioxidante activity in central-southern Uruguayan propolis extracts. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v.55, n.1, 141-146, 2010.

## ARTIGO 1

# COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA PRÓPOLIS PRODUZIDA EM APIÁRIOS NA BAIA DO IGUAPE, BRASIL<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup>Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico *Journal of Hymenoptera Research*, em versão na língua inglesa.

## **Composição físico-química e atividade antioxidante da própolis produzida em apiários na Baía do Iguape, Brasil**

**Resumo:** Fatores como sazonalidade, vegetação e condições geográficas podem interferir nos parâmetros físico-químicos afetando diretamente na qualidade da própolis. O objetivo do trabalho foi avaliar as propriedades físico-químicas, atividade antioxidante e composição de ácidos graxos da própolis ao longo de um ano de produção. As amostras foram coletadas mensalmente durante o período de agosto de 2013 a julho de 2014, sendo avaliados os parâmetros físico-químicos, incluindo capacidade antioxidante e perfil de ácidos graxos. As amostras apresentaram atividade antioxidante e os parâmetros físico-químicos estão em conformidade com a legislação brasileira estabelecida pelo Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Própolis, exceto teor de cera, extrato seco e flavonoides. As diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os parâmetros físico-químicos ao longo de um ano indicaram que houve influência da sazonalidade (precipitação pluviométrica e temperatura média). A presença de ácidos graxos da família do ômega-3 ( $\omega 3$ ) e ômega-9 ( $\omega 9$ ) na própolis nos faz recomendar seu uso como suplemento alimentar.

**Palavras-chave:** *Apis mellifera*; produtos da colônia; compostos fenólicos, apicultura.

## **Physical-chemical composition and antioxidant activity of propolis produced in apiaries near Baía do Iguape, Brazil**

**Abstract:** Factors such as seasonality, vegetation and geographical conditions can interfere with physical-chemical parameters directly affecting the quality of propolis. The objective of this work was to evaluate the physical-chemical properties, antioxidant activity and fatty acids composition of propolis throughout a production year. The samples were collected monthly from August 2013 to July 2014, and the physical-chemical parameters were evaluated, including the antioxidant capacity and profile of fatty acids. The samples showed that the antioxidant activity and the physical-chemical parameters are in accordance with the Brazilian legislation established by the Regulation for Identity Establishment and Propolis Quality, except for the wax content, dry extract and flavonoids. Differences ( $p < 0.05$ ) between the physical-chemical parameters during a year indicated that are influenced by seasonality (precipitation and average temperature). The presence of fatty acids from the family of omega-3 ( $\omega 3$ ) and omega-9 ( $\omega 9$ ) in the propolis allows recommending it as food supplement.

**Keywords:** *Apis mellifera*; beehive products; phenolic compounds, apiculture.

## Introdução

A própolis é uma substância de composição complexa (resina, pólen, cera, secreções salivares de abelha) com alta variação química, especialmente devido ao seu processo de elaboração (Zunini et al., 2010). Diversos tipos de própolis são conhecidos e comercializados, porém a brasileira é uma das mais investigadas por apresentar grande diversidade e elevada ação biológica (Sousa, Furtado, Jorge, Soares, & Bastos, 2007; Alday et al., 2016).

Estudos evidenciaram que a própolis apresenta potencial como ingrediente funcional e aditivo alimentar natural (Mendiola et al., 2010). Além disso, são conhecidos diferentes benefícios no uso da própolis para fins terapêuticos por humanos e animais, tais como, ação antitumoral (Machado et al., 2016), anti-inflamatória (Osés, Pascual-Maté, Fernández-Muinõ, López-Días, & Sancho, 2016), bactericida, antifúngica (Neves, Silva, Lima, Cunha, & Oliveira, 2016), antimicrobiana (Borges, Santos, Telles, Correia, & Lanna, 2014), antioxidante (Araújo et al., 2016) entre outros.

Parâmetros físico-químicos como: umidade, cinzas, cera, fenois, flavonoides, atividade de oxidação, massa mecânica, sólidos solúveis em etanol e teor alcoólico, são variáveis de suma importância para avaliar a qualidade da própolis. No Brasil, a própolis para ser considerada de qualidade deve atender os padrões mínimos exigidos pelo Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade da Própolis (Brasil, 2001).

Recentemente, esforços tem sido direcionados para identificar os constituintes químicos de diferentes própolis (Falcão et al., 2009; Righi, Negri, & Salatino, 2013; Valenzuela-Barra et al., 2015), que podem ser influenciados por fatores como condições geográficas (Loureiro & Galbiati, 2013), sazonalidade (Puker, Abot, Matia, Rodrigues, & Pinto, 2010) e vegetação (Funari & Ferro, 2006).

O objetivo do trabalho foi analisar e comparar as propriedades físico-químicas, atividade antioxidante e composição de ácidos graxos da própolis mensalmente, produzida na Baía do Iguape, Brasil, ao longo de um ano.

## Material e métodos

### Produtos químicos

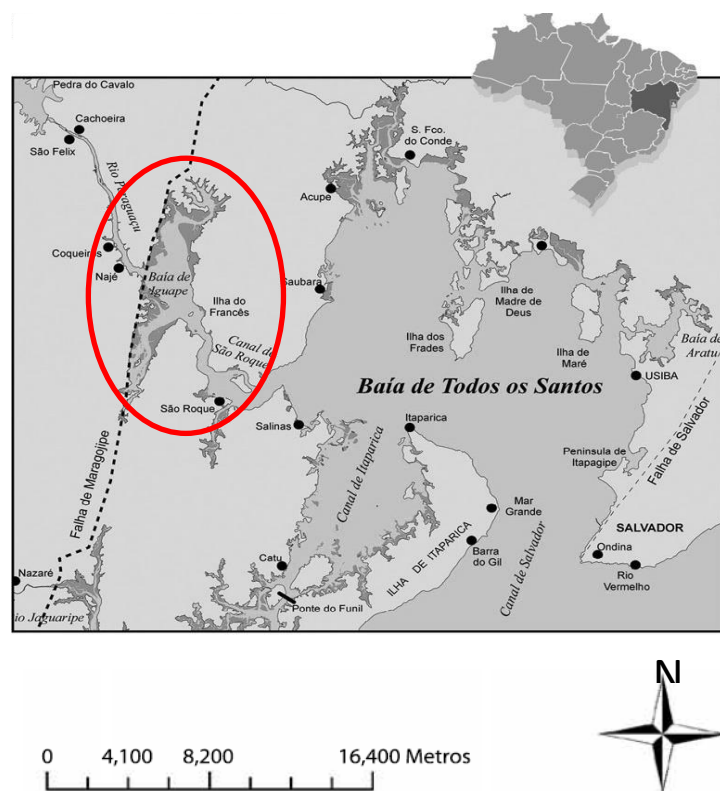
Os reagentes sulfato de sódio e ácido sulfúrico foram obtido do Labsynth/Brasil. O ácido gálico, acetona e folin ciacauteau da Dinâmica Química Contemporânea/Brasil. O fosfato de sódio e cloreto de alumínio foi adquirido à Neon/Brasil. Quercetin, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl,  $\alpha$ -tocopherol e  $\beta$ -Carotene adquiridos da Sigma Aldrich/USA. O Etanol e Metanol para HPLC foram provenientes da empresa AppliChem Panreac ITW Companies/ Alemanha. Para a identificação e quantificação dos ácidos graxos foi utilizado o Sulpeco <sup>TM</sup> 37 Component No. 47885-U da Sigma Aldrich/USA.

### Local do estudo e coleta das amostras

As amostras foram coletadas em apiários localizados no entorno da Baía do Iguape, município de Cachoeira, Bahia, Brasil ( $\lambda = 12^\circ 40' 59,88'' S$ ,  $\phi = 38^\circ 51' 0'' W$ ) (Figura 1). O local é considerado uma reserva extrativista constituída de vegetação diversificada com resquícios de Mata Atlântica, vegetação de mangue e por espécies de interesse agrônômico (Prost, 2010).

As colônias de *A. mellifera* foram instaladas em colmeias Langstroth adaptadas com coletores de própolis e as coletas foram realizadas mensalmente, de agosto de 2013 a julho de 2014, com três repetições (Figura 2). As amostras de própolis foram acondicionadas em recipientes fechados e conservadas a  $-20^\circ C$  até momento das análises. Os registros climáticos de temperatura média e precipitação pluviométrica foram coletados pelo Instituto Nacional de Meteorologia- INMET (Figura 3).

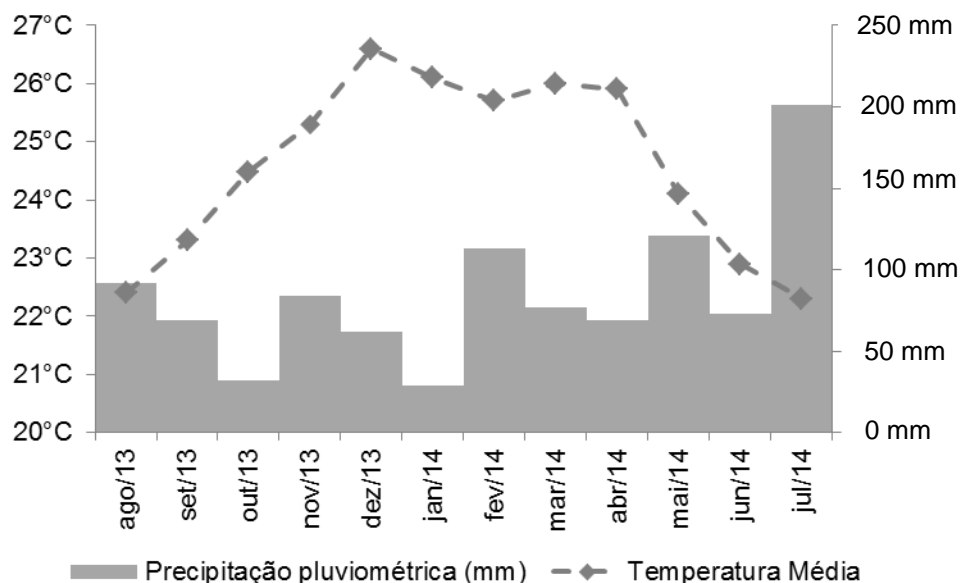




**Figura 1.** Área de coleta das amostras de própolis (Reprodução do livro Baía de Todos os Santos - aspectos oceanográficos (Hatje & Andrade, 2009)).



**Figura 2.** Colméias Langstroth adaptadas com coletores de própolis em apiários localizados no entorno da Baía do Iguape, Bahia, Brasil.



**Figura 3.** Dados climáticos do período de coleta da própolis (agosto de 2013 a julho de 2014), Cachoeira-BA. (Fonte: <http://www.inmet.gov.br/portal/>)

### **Análises físico-químicas**

Os parâmetros umidade e cinzas totais foram determinados por método gravimétrico conforme recomendado a Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2000). A quantificação de cera, massa mecânica (substâncias insolúveis em etanol) e atividade de oxidação foram realizadas de acordo com o relatado por Melo, Matsuda, e Almeida-Muradian (2012). As substâncias solúveis em etanol foram determinadas pela diferença entre o valor inicial da amostra e o valor da massa mecânica (Dias, Pereira, & Estevinho, 2012).

Os extratos foram preparados conforme Park, Ikegari, Abreu, e Alcici (1998). Foram diluídos 30g de própolis *in natura* em 375 mL de etanol (70%) e o rendimento (%) foi calculado pela razão entre a massa do material após a volatilização e a massa inicial.

### **Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante**

A quantificação espectrofotométrica de compostos fenólicos totais foi efetuada pelo método colorimétrico descrito por Singleton, Orthofer, e Lamuela-Raventos (1999). Os resultados foram expressos em miligramas equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mgEAG/ g) a partir da curva padrão ( $y = 0,0092x + 0,0334$ ;

$R^2 = 0,9998$ ). O teor de flavonoides totais foi determinado pelo método colorimétrico reportado por Park et al. (2004) e a quercetina foi usada como referência. Os resultados foram expressos em miligramas equivalente de quercetina por grama de extrato (mgEQ/g) a partir da curva padrão ( $y = 0,0362x - 0,0148$ ;  $R^2 = 0,9996$ ).

A capacidade de redução de radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi estimada usando o método descrito por Sánchez-Moreno, Larrauri, e Saura-Calixto (1999). A mistura de reação foi composta de 0,3 mL da amostra de própolis em diferentes concentrações (0,048 a 1,0 mg/mL). A absorbância foi medida a 517 nm e os resultados expressos em  $EC_{50}$  (média da concentração efetiva), sendo este, um indicador inversamente proporcional ao efeito. Para fins de comparação dos resultados usamos o padrão  $\alpha$ -tocoferol.

Para análise da ação antioxidante da própolis durante a peroxidação do ácido linoléico foi estabelecida de acordo com o método utilizado por Ahn, Kumazawa, Hamasaka, Bang, e Nakayama (2004). As amostras foram avaliadas na concentração de 0,9 mg/mL. O ensaio espectrofotométrico foi realizado a um comprimento de onda de 470 nm por leituras referentes à descoloração da solução aquosa do  $\beta$ -Caroteno/ácido linoleico e expressa em porcentagem de inibição em relação ao controle. Como padrão positivo utilizou-se o antioxidante sintético butilhidroxianisol (BHA) na concentração 0,07 mg/mL.

### **Ácidos Graxos**

Os ácidos graxos foram determinados por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID), equipado com uma coluna capilar, conforme metodologia descrita por Barros, Heleno, Carvalho, e Ferreira (2010) e Estevinho, Rodrigues, Pereira, e Féas (2012). O método envolve o processo de transesterificação utilizando o metanol, ácido sulfúrico e tolueno (na proporção 2:1:1(v/v/v)) durante, pelo menos, 12 h em banho a 50°C e a 160 rpm), seguida da adição de 3 mL de água deionizada para obter a separação das fases. A mistura foi recuperada com 3 mL de éter dietílico por agitação no vórtex e a água foi eliminada com sulfato de sódio anidro. A amostra foi armazenada em recipiente com teflon e, antes da injeção, filtrou-se com um filtro de nylon de 0,2  $\mu$ m de Milipore.

A análise foi realizada com um cromatógrafo modelo GC DANI 1000 equipado com um injetor split/splitless, um detetor de ionização de chama (FID a 260°C) e uma coluna Macherey-Nagel (30m X 0,32mm ID X 0,25µm d<sub>f</sub>). A rampa de temperaturas do forno foi a seguinte: temperatura inicial da coluna de 50°C, mantida durante 2 min, 30°C / min. até 125°C; 5°C / min. até 160°C; 20°C / min. até 180°C e 3°C / min. até 200°C. Finalmente, utilizou 20°C / min. até ao limite de 220°C. O fluxo do gás de transporte (hidrogénio) foi de 4,0 mL/min (0,61 bar), medido a 50°C. A injeção split (1:40) foi realizada a 250°C. O volume de amostra injetado foi de 1 µL. A identificação dos ácidos graxos foi feita comparando os tempos relativos de retenção dos picos dos extratos das amostras com padrões. Os resultados foram processados pelo software CSW 1.7 (DataApex 1.7) e expressos em percentagem relativa de cada ácido graxo.

### **Análise de dados**

Os dados foram submetidos à Análise de Variância de fator único após verificação da não violação dos seus pressupostos e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott. Adotou-se o nível de 5% de significância em todas as análises. Para as variáveis referentes aos dados de ácidos graxos foram calculadas as estatísticas descritivas: valores mínimo e máximo, média, mediana, percentil e desvio padrão. Todas as análises foram realizadas usando o Programa R versão 3.0.2 (R Core Team, 2014). Os valores exigidos pelo Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Própolis da Legislação Brasileira (Brasil, 2001) para identificação e qualidade da própolis foram usados para comparação com os resultados obtidos em nosso estudo.

## **Resultados**

### **Análise físico-química**

Os parâmetros umidade, cinzas, sólidos solúveis e massa mecânica atenderam aos valores preconizados pela legislação brasileira em todo o período investigado, exceto para massa mecânica em novembro/2013. O conteúdo de cera apenas apresentou os padrões de qualidade exigidos pela legislação em julho/2014. Para a atividade de oxidação as exigências (max. 22") foram atendidas nos meses de

dezembro/2013, janeiro e fevereiro/2014 e para o extrato seco, além desses meses, outubro e novembro/2013. Houve diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os meses investigados para todos os parâmetros físico-químicos (Tabela 1). A variável temperatura média apresentou correlação positiva entre os parâmetros cinza ( $r = 0.53$ ), extrato seco ( $r = 0.82$ ) e negativo para atividade de oxidação ( $r = -0.81$ ). Por sua vez a variável precipitação pluviométrica obteve alta correlação negativa com cinzas ( $r = -0.8$ ).

### **Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante**

As amostras atenderam à legislação (Brasil, 2010) para fenois totais em todos os meses, sendo que o maior ( $p < 0,05$ ) teor foi obtida em maio/2014 ( $111,45 \pm 1,16$  mg EAG/g). Para flavonoides totais os meses de novembro/2013 ( $6,64 \pm 0,70$  mg EQ/g) e dezembro/2013 ( $5,98 \pm 0,70$  mg EQ/g) apresentaram maiores ( $p < 0,05$ ) teores (Tabela 2).

**Tabela 1.** Valores obtidos para os parâmetros físico-químicos nas amostras de própolis na Baía do Iguape, Brasil.

Amostras	Umidade (% m/m)	Cinzas (% m/m)	M.Mec. (% m/m)	S.Sol. (% m/m)	Cera (% m/m)	Atv. Oxi. (")	Ex. Sec (% m/m)
ago/13	6,51±0,57 <sup>a</sup>	1,61±0,05 <sup>b</sup>	37,32±0,63 <sup>c</sup>	62,66±0,63 <sup>c</sup>	28,54 ±0,96 <sup>b</sup>	33,21±1,0 <sup>b</sup>	4,03± 0,46 <sup>c</sup>
set/13	7,22±0,51 <sup>a</sup>	1,84±0,04 <sup>a</sup>	35,32±0,54 <sup>d</sup>	64,67±0,54 <sup>b</sup>	28,98±1,39 <sup>b</sup>	37,25±0,73 <sup>a</sup>	6,68±0,6 <sup>b</sup>
out/13	6,83±0,19 <sup>a</sup>	1,93±0,28 <sup>a</sup>	33,63±0,53 <sup>e</sup>	66,36± 0,53 <sup>a</sup>	30,22±0,62 <sup>b</sup>	26,93±0,72 <sup>e</sup>	12,17±2,31 <sup>a</sup>
nov/13	6,88±0,55 <sup>a</sup>	1,9±0,12 <sup>a</sup>	41,87±0,48 <sup>a</sup>	58,12±0,48 <sup>e</sup>	29,44±1,40 <sup>b</sup>	31,83±0,92 <sup>c</sup>	11,86±0,23 <sup>a</sup>
dez/13	6,84±0,72 <sup>a</sup>	2±0,04 <sup>a</sup>	34,61±0,91 <sup>d</sup>	65,37±0,91 <sup>b</sup>	31,82±1,0 <sup>a</sup>	21,88±0,69 <sup>g</sup>	11,86±2,87 <sup>a</sup>
jan/14	6,24±0,42 <sup>b</sup>	2,05±0,11 <sup>a</sup>	40,16±0,72 <sup>b</sup>	59,83±0,72 <sup>d</sup>	28,21±1,35 <sup>b</sup>	21,56±0,71 <sup>g</sup>	10,52±0,28 <sup>a</sup>
fev/14	6,96±0,40 <sup>a</sup>	1,57±0,13 <sup>b</sup>	36,41±0,60 <sup>c</sup>	63,57±0,60 <sup>c</sup>	33,58±1,51 <sup>a</sup>	21,1±0,17 <sup>g</sup>	10,91±1,15 <sup>a</sup>
mar/14	5,7± 0,55 <sup>b</sup>	1,56±0,2 <sup>b</sup>	37,1±0,87 <sup>c</sup>	62,88±0,87 <sup>c</sup>	28,46±1,60 <sup>b</sup>	23,59±0,37 <sup>f</sup>	9,65±1,5 <sup>a</sup>
abr/14	5,81±0,57 <sup>b</sup>	1,54±0,20 <sup>b</sup>	37,24±0,57 <sup>c</sup>	62,74±0,57 <sup>c</sup>	25,77 ±1,8 <sup>c</sup>	22,71±0,58 <sup>f</sup>	9,45±0,82 <sup>a</sup>
mai/14	6,09±0,50 <sup>b</sup>	1,46±0,16 <sup>b</sup>	36,9±0,92 <sup>c</sup>	63,09±0,92 <sup>c</sup>	26,71±1,86 <sup>c</sup>	31,09±0,46 <sup>c</sup>	8,32±1,56 <sup>b</sup>
jun/14	6,44±0,73 <sup>a</sup>	1,44±0,11 <sup>b</sup>	37,12±0,86 <sup>c</sup>	62,86±0,86 <sup>c</sup>	27,37±1,41 <sup>c</sup>	33,64±0,85 <sup>b</sup>	6,82±0,71 <sup>b</sup>
jul/14	5,34±0,38 <sup>b</sup>	1,19±0,14 <sup>c</sup>	38,2±0,11 <sup>c</sup>	61,78±0,11 <sup>c</sup>	23,14±0,81 <sup>d</sup>	29,84±0,94 <sup>d</sup>	6,86±0,75 <sup>b</sup>
Legislação <sup>1</sup>	Max. 8%	Max. 5%	Max. 40%	Min. 35%	Max. 25%	Max. 22"	Min. 11%

M.Mec = massa mecânica; S.Sol = sólidos solúveis; Atv.Oxi. = atividade de oxidação; Ex.Sec = extrato seco Max = máximo; Min = mínimo; " = segundos; m/m = massa de unidade/soma de massas da amostra; <sup>1</sup> Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis (Brasil, 2001); \*Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente (p<0,05) entre si, pelo teste de Scott-Knott.

**Tabela 2.** Resultados obtidos para os compostos fenólicos totais e atividade antioxidante da própolis na Baía do Iguape, Brasil.

Amostra	Fenois mg EAG/g	Flavonoide mg EQ/g	DPPH EC <sub>50</sub> (mg/mL)	B-Caroteno (%)
ago/13	100,78 ± 0,80 <sup>d</sup>	4,78 ± 0,66 <sup>b</sup>	0,43 ± 0,05 <sup>c</sup>	68,77 ± 0,52 <sup>g</sup>
set/13	108,55 ± 1,31 <sup>b</sup>	3,87 ± 0,74 <sup>b</sup>	0,41 ± 0,05 <sup>c</sup>	78,1 ± 0,86 <sup>d</sup>
out/13	84,19 ± 1,39 <sup>g</sup>	4,15 ± 0,76 <sup>b</sup>	0,74 ± 0,07 <sup>a</sup>	73,88 ± 0,86 <sup>f</sup>
nov/13	106,52 ± 1,56 <sup>b</sup>	6,64 ± 0,70 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,06 <sup>b</sup>	64,99 ± 0,43 <sup>h</sup>
dez/13	109,1 ± 1,40 <sup>b</sup>	5,98 ± 0,70 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,05 <sup>c</sup>	83,3 ± 0,97 <sup>b</sup>
jan/14	88 ± 1,09 <sup>f</sup>	2,47 ± 0,51 <sup>c</sup>	0,37 ± 0,05 <sup>c</sup>	84,53 ± 0,69 <sup>a</sup>
fev/14	81,62 ± 1,30 <sup>h</sup>	3,63 ± 0,57 <sup>b</sup>	0,4 ± 0,02 <sup>c</sup>	80,01 ± 0,70 <sup>c</sup>
mar/14	103,18 ± 1,17 <sup>c</sup>	1,85 ± 0,04 <sup>c</sup>	0,37 ± 0,03 <sup>c</sup>	78,97 ± 0,59 <sup>d</sup>
abr/14	91,13 ± 1,45 <sup>e</sup>	1,4 ± 0,30 <sup>c</sup>	0,41 ± 0,03 <sup>c</sup>	69,44 ± 0,10 <sup>g</sup>
mai/14	111,45 ± 1,16 <sup>a</sup>	4,28 ± 0,51 <sup>b</sup>	0,34 ± 0,05 <sup>c</sup>	76,27 ± 0,53 <sup>e</sup>
jun/14	107,24 ± 1,49 <sup>b</sup>	4,77 ± 0,52 <sup>b</sup>	0,36 ± 0,01 <sup>c</sup>	56,94 ± 0,51 <sup>i</sup>
jul/14	100,96 ± 1,62 <sup>d</sup>	1,94 ± 0,37 <sup>c</sup>	0,35 ± 0,01 <sup>c</sup>	50,58 ± 0,53 <sup>j</sup>
Legislação brasileira <sup>1</sup>	(5%) Min. 50mg/g	(0,5%) Min 5mg/g	-	-

Min = mínimo, <sup>1</sup> Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis (Brasil, 2001); \*Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si pelo teste de Scot-Knott.

A própolis apresentou atividade antioxidante durante todo o ano, com EC<sub>50</sub> maior que a substância de referência ( $\alpha$ -tocoferol 0,08±0,02 mg/mL) pelo método DPPH. Entretanto, a própolis coletada nos meses de outubro/2013 (0,74±0,07 mg/mL) e novembro/2013 (0,58±0,06 mg/mL) diferiram estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ) e apresentaram menor redução de radicais DPPH em relação aos demais meses. No método do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, a própolis coletada em julho/2014 (50,58±0,53%) e janeiro/2014 (84,53±0,69%) apresentaram a menor e a maior atividade antioxidante, respectivamente (Tabela 2). A substância de referência BHA apresentou inibição de 98±0,83%. Os resultados de  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico apresentaram correlação positiva ( $r = 0,69$ ) para a variável temperatura média e negativa ( $r = -0,59$ ) para a variável precipitação pluviométrica.

### Ácidos Graxos

Foram identificados 21 ácidos graxos e o maior percentual foi para os ácidos saturados (SFA) (59,50±2,56%), seguido dos monoinsaturados (MUFA)

(33,7±2,11%) e dos polinsaturados (PUFA) (6,79±0,65%). Dentre os SFA o palmítico (C16:0) teve a maior percentagem (33,80±1,93%), enquanto para os MUFA foi o oleico (C18:1n9c) (31,89±2,56%) e para os PUFA o linolênico (C18:3n3) (5,98±0,72%) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Valores obtidos para os ácidos graxos (%) nas amostras de própolis da Baía do Iguape, Brasil.

Ácido Graxos	Min (%)	Max (%)	Medi (%)	5% tile	95% tile	Med (%)	SD
(C6:0)	0,12	0,45	0,23	0,14	0,43	0,27	0,11
(C8:0)	3,14	7,35	5,8	3,6	7,12	5,7	1,21
(C10:0)	0,04	0,3	0,06	0,05	0,29	0,09	0,09
(C12:0)	0,16	0,33	0,19	0,17	0,32	0,21	0,06
(C13:0)	0,07	0,12	0,08	0,07	0,11	0,1	0,02
(C14:0)	2,66	3,99	3,43	2,66	3,87	3,29	0,51
(C15:0)	0,19	0,4	0,27	0,21	0,38	0,28	0,06
(C15:1CIS-10)	0,18	0,25	0,2	0,19	0,24	0,21	0,02
(C16:0)	29,9	36,02	31,66	30,36	35,7	33,38	1,93
(C16:1)	0,31	0,55	0,43	0,32	0,54	0,44	0,08
(C17:0)	0,17	0,37	0,26	0,19	0,37	0,26	0,06
(C17:1CIS-10)	0,02	0,09	0,04	0,02	0,09	0,05	0,03
(C18:0)	3,72	4,61	4,22	3,77	4,53	4,2	0,26
(C18:1n9c)	27,85	35,26	31,93	28,23	35,2	31,89	2,56
(C18:2n6t)	0,15	0,62	0,28	0,15	0,61	0,34	0,18
(C18:3n3)	5,29	7,53	5,75	5,38	7,37	5,98	0,72
(C20:0)	0,65	0,95	0,76	0,68	0,92	0,77	0,08
(C20:1CIS-11)	0,4	2,17	0,97	0,42	2,14	1,1	0,56
(C20:3n3)	0,26	0,66	0,44	0,32	0,62	0,45	0,1
(C22:0)	1,77	2,42	2	1,79	2,41	2,07	0,23
(C24:0)	6,89	11,74	10,52	6,95	11,7	9,95	1,76
<b>SAT</b>	<b>55,32</b>	<b>62,91</b>	<b>59,67</b>	<b>55,46</b>	<b>62,41</b>	<b>59,5</b>	<b>2,56</b>
<b>MUFA</b>	<b>30,73</b>	<b>36,53</b>	<b>33,72</b>	<b>31,06</b>	<b>36,46</b>	<b>33,7</b>	<b>2,11</b>
<b>PUFA</b>	<b>6,19</b>	<b>8,28</b>	<b>6,52</b>	<b>6,24</b>	<b>8,07</b>	<b>6,79</b>	<b>0,65</b>

(C6:0) = Éster Metílico do Ácido Capróico ; (C8:0) = Éster Metílico do Ácido Caprílico; (C10:0) = Éster Metílico do Ácido cáprico; (C12:0) = Éster metílico do Ácido Láurico; (C13:0) = Éster Metílico Do Ácido Tridecanóico; (C14:0) = Éster Metílico Do Ácido Mirístico; (C15:0) = Éster Metílico Do Ácido Pentadecanóico; (C15:1CIS-10)= Éster Metílico do Ácido cis-10-Pentadecenóico; (C16:0) = Éster Metílico do Ácido Palmítico; (C16:1) = Éster Metílico do Ácido Palmitoleico; (C17:0) = Éster Metílico do Ácido Heptadecanóico; (C17:1CIS-10) = Éster Metílico do cis-10- Ácido Heptacenóico; (C18:0) = Éster Metílico do Ácido Esteárico; (C18:1n9c) = Éster Metílico do Ácido oleico; (C18:2n6t) = Éster Metílico do Ácido Linoleaidico; (C18:3n3) = Éster Metílico do Ácido Linolênico ; (C20:0) = Éster Metílico do Ácido araquínico; (C20:1CIS-11) = Éster Metílico do Ácido cis-11- Eicosenóico; (C20:3n3) = Éster Metílico do cis-11.14.17-Ácido eicosatrienóico; (C22:0) = Éster Metílico do Ácido Beênico; (C24:0) = Éster Metílico do Ácido Lignocérico; SAT = Saturados; MUFA = Monoinsaturados; PUFA = Polinsaturados; Min = mínimo; Max = máximo; Medi = mediana; Med = média; SD= desvio padrão.



## Discussão

Ao contrário do que ocorre na zona temperada do hemisfério norte, onde a produção de própolis apenas ocorre no verão e início de outono, na zona tropical, especialmente na região Nordeste do Brasil, essa produção ocorre durante todo o ano (Torres, Lopes, Neto, & Citó, 2008).

Os resultados do nosso estudo são similares aos encontrados por Melo et al. (2012) para os parâmetros umidade (2,0% a 9,0%), cinzas (1,7% a 3,5%) e mais elevada em relação a atividade de oxidação (3" a 7,3"). Dias et al. (2012) avaliaram diferentes amostras de própolis portuguesa e obtiveram valores que variaram de 27% a 45,1% para a massa mecânica e 60,7% a 71,1% para sólidos solúveis. Bastos, Galbiati, Loureiro, e Scoaris (2011) encontraram oscilação entre 3,4% e 74,6% para o parâmetro cera ao longo de um ano.

Quanto aos compostos fenólicos e atividade antioxidante, Cabral, Oldoni, Alencar, Rosalen, e Ikegaki (2012) encontraram maior quantidade de fenóis totais (14,8 mg EAG/g) e valores semelhantes de flavonoides totais (3,2 mgEQ/g) em comparação ao nosso estudo. Em outro estudo, os autores, também encontraram maior valor de fenóis totais (121 a 150 mg EAG/g) e resultado semelhante para o sequestro de radicais livres -  $EC_{50}$  0,26 e 0,84 mg/mL (Araújo et al., 2016). De-Melo, Matsuda, Freitas, Barth, e Almeida-Murandian (2014) constataram inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno de 70% a 90%. Resultados similares também foram observados em extratos metanólicos da própolis vermelha, 85.3% (Righi et al., 2011).

Em geral, as diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os meses investigados para todos os parâmetros físico-químicos indicam efeito da sazonalidade. Além disso, correlações entre as variáveis de sazonalidade e teor de cinzas mostraram ser maiores em períodos secos, em que a contaminação por partículas em suspensão (poeira, resto de folhas etc.) tendem a serem maiores que em períodos de chuvas, o que é justificado por esse parâmetro o qual avalia a quantidade de substâncias residuais não voláteis (Funari & Ferro, 2006).

Quanto à atividade de oxidação, a correlação negativa desse parâmetro com a temperatura média indica que o período para a realização das coletas possa ter influenciado. Esse parâmetro é empregado para sugerir o tempo ideal entre a disponibilização dos coletores e a colheita, assim como o armazenamento

e a temperatura (Melo et al., 2012). No nosso estudo, todas as coletas aconteceram no sétimo dia após a colocação do coletor nas colmeias, independente do período sazonal.

Os extratos hidroalcoólicos das amostras de própolis apresentaram melhores rendimentos nos meses em que a temperatura média foi maior. A correlação positiva do rendimento com a temperatura média indicou que as condições ambientais assim como a disponibilidade de resina nas mediações dos apiários são fatores importantes na oscilação do valor de rendimento ao longo do ano (Mendonça et al., 2015).

Os resultados de massa mecânica encontraram-se próximos dos limites toleráveis de qualidade (40%), uma vez que os sólidos solúveis em etanol foram superiores a 50% em todos os meses. Ambos os parâmetros estão diretamente relacionados com a solubilidade das amostras, podendo ser influenciados pelo solvente utilizado na análise (etanol), pelo tipo de material coletado pelas abelhas ou por contaminações de materiais indesejáveis durante a coleta e armazenamento da própolis (Melo et al., 2012).

O teor de cera maior (fev/14) no mês de menor temperatura média (22°C) e de maior índice pluviométrico (201 mm) (ver Tabela 1 e Figura 1). A própolis em estudo apresentou consistência maleável à temperatura ambiente, que segundo Funari e Ferro (2006) é indicio de uma própolis com elevado teor de cera. Valores similares foram observados por Bastos et al. (2011), mas ao contrário do nosso estudo, suas amostras que foram coletadas no verão exibiram maior quantidade de cera e os autores atribuíram isso à escassez da oferta de resinas. Além disso, Melo et al. (2012) observaram que a quantidade de cera e extrato seco estão associadas negativamente entre si, assim como o conteúdo de compostos fenólicos. Entretanto, essas correlações não foram significativas em nosso estudo. Possivelmente, outros fatores que não a precipitação pluviométrica e temperatura média influenciaram para que tal relação não ocorresse. Loureiro e Galbiati (2013) também não verificaram correlação significativa entre a quantidade de cera e estações secas e chuvosas.

Fatores como o teor de cera presente nas amostras de própolis, o método aplicado para a quantificação e a disponibilidade de plantas resiníferas na região podem ter influenciado os resultados obtidos para os compostos fenólicos. A

relação cera/resina é de relativa importância uma vez que os compostos fenólicos não estão presentes na composição da cera (Funari & Ferro, 2006). A própolis marrom avaliada por Cabral et al. (2012) apresentou atividade biológica mesmo com baixa concentração de flavonoides. Segundo Popova et al. (2004) o método de quantificação dos flavonoides pela reação espectrofotométrica com o cloreto de alumínio é pouco exato, uma vez que esse reagente não contempla todas as classes dos flavonoides, podendo os resultados serem subestimados. Além de que, a quantidade de compostos fenólicos é dependente da localização geográfica em que o apiário foi instalado e entre os tipos de própolis. Estudos realizados por Righi et al. (2011), Cabral et al. (2012), López, Schmidt, Eberlin, e Sawaya (2014), Mendonça et al. (2015) e Machado et al. (2016) relataram elevado teor de compostos fenólicos em amostras de própolis verde e vermelha.

Relativamente ao ensaio de inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno constatou-se que todas as amostras de própolis induziram inibição superior a 50%, com diferenças ( $p < 0,05$ ) ao longo do ano. No entanto, o melhor desempenho da própolis foi verificado nos meses em que ocorreu menor precipitação pluviométrica coincidindo com o período de melhor concentração de extrato seco. Segundo Mendonça et al. (2015), a capacidade antioxidante da própolis está correlacionada com o tipo e quantidade de compostos fenólicos presentes nas amostras, o que pode justificar as diferenças observadas no nosso estudo, ao longo do ano.

Poucos são os relatos na literatura referentes à quantificação de ácidos graxos em amostras de própolis. Park, Alencar, Scamparini, e Aguiar (2002) identificaram oito ésteres metílicos de ácidos graxos Castro, Cury, e Rosalen (2007) identificaram quatro ácidos graxos em amostras de própolis da Região Sudeste e sete para a Região Nordeste.

Os ácidos graxos C16:0, C18:1n9c e C18:3n3 também foram identificados por Righi et al. (2013). Estes autores justificaram a presença destes ácidos por fazerem parte da composição química de um dos mais importantes componentes da própolis, a cera. De acordo com Riemenschneider e Bolt (2005), a cera apícola apresenta como principais constituintes os hidrocarbonetos e ácidos graxos, representando o ácido C16:0, cerca de 30% dos ácidos graxos. Doan et al. (2014)

em estudos efetuados com diferentes tipos de cera constataram a presença de C16:0 em todas as ceras, corroborando com as nossas observações.

Dentre os ácidos insaturados encontrados nas amostras da própolis estudada, podemos observar a presença de ômega-3 ( $\omega$ 3) e ômega-9 ( $\omega$ 9). O uso destes ácidos graxos na suplementação da dieta tem se tornado uma opção adicional em estudos clínicos no tratamento de várias doenças inflamatórias, cardíacas, hipertensão e certos tipos de cancro (Borges, Santos, Telles, & Correia, 2014). Santos et al. (2016) em estudo efetuado sobre a utilização da própolis em dietas de vacas em lactação, observaram benefícios na peroxidação lipídica no sangue, maior concentração de ácidos graxos polinsaturados no leite e melhor desempenho antioxidante do leite.

Utilizando o mesmo método empregado neste estudo, Estevinho et al. (2012) e Bárbara et al. (2015) quantificaram os ácidos graxos em amostras de pólen de diferentes espécies de abelhas, obtendo quantidades superiores para os ácidos C18:3n3 ( $34,03 \pm 6,62\%$ ) e C18:2n6c ( $36,58 \pm 4,04$ ). Os resultados obtidos indicaram que os produtos das abelhas são ricos em ácidos graxos e que a própolis estudada apresentou uma gama de ácidos graxos que são benéficos para a saúde, podendo vir a ser utilizados como suplemento alimentar.

## CONCLUSÃO

As características físico-químicas da própolis proveniente da Baía do Iguape sofreram influência das condições ambientais, em que parâmetros de sazonalidade foram significativamente correlacionados com o teor de cinza, sólidos solúveis, extrato seco e a atividade antioxidante. Esta própolis apresentou qualidade para parâmetros físico-químicos, além de atividade antioxidante ao longo do ano e uma constituição rica em ácidos graxos ( $\omega$ 3 e  $\omega$ 9) benéficos para a saúde humana, podendo ser uma alternativa rentável para os apicultores dessa região.

## Referências

- Alday, E., Navarro-Navarro, M., Garibay-Escobar, A., Robles-zepeda, R., Hernandez, J., Velazquez, C. (2016). Advances in Pharmacological Activities and Chemical Composition of Propolis Produced in Americas. In Chambó, E. D.. Beekeeping and Bee Conservation - Advances in Research. (1ª ed.) Rijeka: InTech, 1, 250p.
- Ahn, M. R., Kumazawa, S., Hamasaka, T., Bang, K. S., & Nakayama, T. (2004) Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 7286-7292 doi: 10.1021/jf048726s
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists. (2000). *Official Methods of Analysis*. AOAC International: Maryland, USA.
- Araújo, K. S. S., Junior, J. F. S., Sato, M. O., Finco, F. D. B. A., Soares, I. M., Barbosa, R.S., ... Mariano, S.M.B. (2016). Physicochemical properties and antioxidant capacity of própolis of stingless bees (*Meliponinae*) and *Apis* from two regions of Tocantins, Brazil. *Acta Amazonica*, 46 (1), 61-68. <http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392201501045>
- Bárbara, M. S., Machado, C. S., Sodr e, G. S., Dias, L. G., Estevinho, L. M., & Carvalho, C. A. L. (2015). Microbiological Assessment, Nutritional Characterization and Phenolic Compounds of Bee Pollen from *Mellipona mandacaia* Smith, 1983. *Molecules*, 20, 12525-12544. doi:10.3390/molecules200712525
- Barros, L., Heleno, S. A., Carvalho, A. M. & Ferreira, I. C. F. R. (2010) Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: vitamins and phenolics. *LWT – Food Science and Technology*, 43, 544–550. doi:10.1016/j.lwt.2009.09.024
- Bastos, E. M. A. F., Galbiati, C., Loureiro, E.M., & Scoaris, D. O. (2011). Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63 (5), 1255-1259. Obtido em <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v63n5/v63n5a32.pdf>
- Borges, E. C., Silva, L. C., Alencar, S. M., & Aguiar, C. L. (2014) Caracterização química de extratos etanólicos de própolis com atividade inibitória do

crescimento de Estafilococos isolados de mastite bovina. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, 8, 1040-1153. doi: 10.3895/S1981-36862014000100001

- Borges M. C., Santos F. M. M., Telles R. W., Correia M. I. T. D., & Lanna C. C. D. (2014) Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e lúpus eritematoso sistêmico: o que sabemos? *Revista Brasileira de Reumatologia*, 54 (6), 459-466. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2013.12.002>
- Brasil. (2001). Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 3 – ANEXO VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, 19 jan. 2001. <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/60/normas.htm>
- Cabral I. S. R., Oldoni T. L. C., Alencar S. M., Rosalen P. L., & Ikegaki M. (2012). The correlation between the phenolic composition and biological activities of two varieties of Brazilian propolis (G6 and G12). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48 (3), 557-564. Obtido em <http://www.scielo.br/pdf/bjps/v48n3/a23v48n3.pdf>
- Castro M. L., Cury J. A., & Rosalen P.L. (2007). Própolis do Sudeste e Nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Química Nova*, 30 (7), 1512-1516. Obtido em <http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n7/02.pdf>
- De-Melo A. A. M., Matsuda A. H., Freitas A. S., Barth O. M., & Almeida-Muradia L. B. (2014). Capacidade antioxidante da propolis. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 44 (3), 341-348. Obtido em <http://www.scielo.br/pdf/pat/v44n3/a04v44n3.pdf>
- Dias L. G., Pereira A. P., & ESTEVINHO L. M. (2012). Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 4246–4253. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.056>
- Doan C. D., To C. M., Vrieze M. D., Lynen F., Danthine S., Brown A., Dewettinck K., & Patel A. R. (2014) Chemical profiling of the major componentes in natural waxes to elucidate their role in liquid oil structuring. *Food Chemistry*, 149, 717-725. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.123>

- Estevinho M. L., Rodrigues S., Pereira A. P., & Feas X. (2012) Portuguese bee pollen: palynological study, nutritional and microbiological evaluation. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 429–435. doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02859.x
- Falcão, S. I., Vilas-Boas, M., Estevinho, L. M., Barros, C., Domingues, M. R. M., Cardoso, S. M. (2009). Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 887-897. doi:10.1007/s00216-009-3232-8
- Funari, C. S., & Ferro V. O. (2006) Análise de própolis. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, 26 (1), 171-178. Obtido em <http://www.scielo.br/pdf/cta/v26n1/28867.pdf>
- Hatje, V.; Andrade, J.B. Baía de Todos os Santos – aspectos oceanográficos. Editora UFBA, Salvador, ed.1, 306p., 2009.
- Loureiro, E. M., & Galbiati C. (2013). Evaluation of the influence of seasonality and landscape on the physicochemical characteristics of própolis. *Food Science and Technology*, 33 (4), 790-795. Obtido em <http://www.scielo.br/pdf/cta/v33n4/v33n4a27.pdf>
- López, B. G. C., Schmidt, E. M., Eberlin, M. N., & Sawaya, A. C. H. F. (2014). Phytochemical markers of different types of red propolis. *Food Chemistry*, 146, 174-180. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.063>
- Machado, B. A. S., Silva R. P. D., Barreto, G. A., Costa, S. S., Silva, D. F., Brandão, H. N., ... Padilha, F. F. (2016) Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of Brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. *Plos One*, 11 (1), 1–26. doi: 10.1371 / journal.pone.0145954
- Mendiola, J. A., Martín-Álvarez, P. J., Señoráns, F. J., Reglero, G., Capodicasa, A., Nazzaro, F., ... Ibáñez, E. (2010) Design of natural food antioxidant ingredients through a chemometric approach. *Journal Agricultural Food Chemical*, 58 (2), 787–792. doi: 10.1021 / jf901951z
- Melo A. A. M., Matsuda A. H., & Almeida-Muradian L. B. (2012). Identity and quality of própolis from four regions of Brazil. *Instituto Adolfo Lutz*, 71 (3), 540-548. Obtido em <https://www.researchgate.net/publication/268035280>

- Mendonça L. S., Mendonça F. M. R., Araújo Y. L. F. M., Araújo E. D., Ramalho S. A., Narain N., ... Cardoso J. C. (2015). Chemical markers and antifungal activity of red propolis from Sergipe, Brazil. *Food Science and Technology*, 35 (2), 291-298. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457X.6554>
- Neves, M. V. M., Siva, T. M. S., Lima, E. O., Cunha, E. V. L., & Oliveira., E. J. (2016). Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida sp.* *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 159-166. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.009>
- Osés, S. M., Pascual-Maté, A., López-Díaz, T. M., & Sancho, M. T. (2016). Bioactive properties of honey with propolis. *Food Chemistry*, 196, 1215-1223. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.050>
- Park, Y. K., Ikegari, M., Abreu, J. A. S., & Alcici, N. M. F. (1998). Estudo da preparação dos extratos de propolis e suas aplicações. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 18 (3), 313-318. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20611998000300011>
- Park, Y. K., Alencar, S. M., Scamparini, A. R. P., & Aguiar, C. L. (2002). Propolis produzida no Sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. *Ciência Rural*, 32 (6), 997-1003. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782002000600013>
- Park, Y. R., Paredes-Guzman, J. F., Aguiar, C. L., Alencar, C. L. ALENCAR, S. M., & FUJIWARA, F. Y. (2004). Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1100-1103. doi: 10.1021 / jf021060m
- Popova, M., Bankova V. S., Butovska D., Petkov V., Nikolova-Damyanova B., Sabatini A. G., Marcazzan G. L., & Bogdanov S., (2004). Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar type propolis. *Phytochemical Analysis* 15, 235-240. Doi: 10.1002 / pca.777
- Prost, C. (2010) Resex marinha versus polo naval na Baía do Iguape. *Novos Cadernos-NAEA*, 13 (1), 47-70. Obtido em <https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/7208/1/Resex%20marinha%20versus%20polo%20naval%20na%20ba%C3%ADa%20do%20Iguape.pdf>



- Puker, A., Abot, A. R., Matias, R., Rodrigues, S. R., & Pinto, A. M. (2010). Propolis produced by africanized honeybees in the Cerrado-Pantanal Ecotone: Effects of seasonality in production and physico-chemical characteristics. *Sociobiology*, 56 (1), 149-162. <https://www.researchgate.net/publication/231181064>
- Riemenschneider, W., & Bolt, H. M., (2005). Esters, Organic. Ullmann's, Encyclopedia of Industrial Chemistry, In Wiley-VCH. 2011, v.13, 245-266p. doi: 10.1002 / 14356007.a09\_565.pub2
- Righi, A. A., Negri, G., & Salatino, A. (2013). Comparative Chemistry of Propolis from Eight Brazilian Localities. *Hidawi - Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1-14p. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/267878>
- Righi, A. A., Alves, T. R., Negri, G., Marques, L. M., Breyer, H., & Salatino, A. (2011). Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal Science Food Agriculture*, 91 (1), 2363-2379. doi: 10.1002 / jsfa.4468
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri J. A., & Saura-Calixto F. (1999). Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Research International*, 32, 407-412. [http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00097-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00097-6)
- Santos, N. W., Yoshimura, E. H., Machado, E., Matumoto-Pinto P. T., Montanher P. F., Visentainer J. V., ... Zeoula L. M. (2016). Antioxidant effects of a propolis extract and vitamin E in blood and milk of dairy cows fed diet containing flaxseed oil. *Livestock Science*, 191, 132-138. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2016.07.012>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*, 299, 152-178. [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Sousa, J. P. B., Furtado, N. A. J. C., Jorge, R., Soares, A. E. E., Bastos, J. K. (2007). Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17 (1), 85-93. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100017>

- Torres, R. N. S., Lopes, J.A. D., Moita Neto, J.M., & Citó, A.M.G.L. (2008). Constituintes voláteis de própolis piauiense. *Quimica Nova*, 31 (3), 479-485. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000300003>
- Valenzuela-Barra, G., Castro, C., Figueroa, C., Barriga, A., Silva, X., Heras, B., Hortelano, S., & Delporte, C. (2015). Anti-inflammatory activity and phenolic profile of própolis from two locations in Región Metropolitana de Santiago, Chile. *Journal of Ethnopharmacology*, 168, 37-44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.03.050>
- Zunini, M. P., Rojas, C., De Paula, S., Elingold, I., Migliaro, E. A., Casanova, M. B., ... Dubin, M. (2010). Phenolic contents and antioxidant activity in central-southern Uruguayan propolis extracts. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 55, (1), 141-146. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072010000100033>.

## ARTIGO 2

# COMPOSTOS FENÓLICOS DA PRÓPOLIS PRODUZIDA EM APIÁRIOS NO ENTORNO DA BAÍA DO IGUAPE, BRASIL <sup>1</sup>

---

<sup>1</sup>Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico *Food Chemistry*, em versão na língua inglesa.

## **Compostos fenólicos da própolis produzida em apiários no entorno da Baía do Iguape, Brasil**

**Resumo:** A própolis é um produto natural formado por diferentes substâncias com atuações biológicas dependentes da composição química. No presente estudo, foram preparados seis extratos de amostras de própolis coletadas em diferentes épocas do ano, tendo como objetivo determinar o perfil dos compostos fenólicos da própolis produzida na região do entorno da Baía do Iguape, Bahia, Brasil. As amostras foram coletadas durante os meses de novembro e dezembro de 2013, janeiro, maio, junho e julho de 2014. Foram realizadas análises espectrofotométricas para a quantificação e cromatográfica (LC/MS) para identificação de compostos fenólicos. Foram identificados 19 compostos químicos, sendo cinco ácidos fenólicos e quatorze flavonoides. Todos os ácidos fenólicos presentes são da classe dos hidroxicinâmicos exceto o ácido benzoico-4-sulfato. Quanto aos flavonoides foram detectados compostos das classes flavonas, flavonois e flavonona, destacando os flavonoides glicosilados apigenin-6-C-glucosyl-8-C-arabinose (isoschaftosido), apigenin-8-C-arabinose (schaftosido) e kaempferol-3-O-glucoside. As amostras apresentaram diferença na quantificação de compostos fenólicos totais, no entanto a composição química foi similar independente da época de coleta, apontando disponibilidades dos recursos vegetais ao longo do ano. A presença de flavonoides glicosilados nas amostras em estudo eleva a importância de mais investigações da própolis desta região, por não serem compostos comumente encontrados na própolis brasileira.

**Palavras-chave:** Apicultura, análise cromatográfica, polifenóis.

## Phenolic compounds of propolis produced in apiaries near Baía do Iguape, Brazil

**Abstract:** Propolis is a natural product composed of different substances with biological roles that depend on the chemical composition. In this study, we prepared six extracts of propolis samples collected at different times of the year, aiming to determine the profile of the phenolic compounds of propolis produced in the region around Baía do Iguape, Bahia, Brazil. The samples were collected during the months of November and December 2013, and January, May, June and July 2014. Spectrophotometric and chromatographic (LC/MS) analyses were carried out for quantification and identification of phenolic compounds, respectively. Nineteen chemical compounds were identified, being five phenolic acids and 14 flavonoids. All phenolic acids found are in the hydroxycinnamic class except for the benzoic-4-sulfate acid. As for the flavonoids, we detected compounds in the classes of flavones, flavonols and flavanone, highlighting the glycosylated flavonoids apigenin-6-C-glucosyl-8-C-arabinose (isoschaftoside), apigenin-8-C-arabinose (schaftoside) and kaempferol-3-O-glucoside. The samples showed a difference in the quantification of total phenolics; however, the chemical composition was similar regardless of the collection time, pointing to availability of plant resources throughout the year. The presence of glycosylated flavonoids in the samples under study highlights the importance of further research on propolis from this region, because they are not commonly found in Brazilian propolis compounds.

**Key words:** Apiculture, chromatographic analysis, polyphenols.

## INTRODUÇÃO

A oxidação é um processo metabólico relevante nas reações bioquímicas e fisiológicas de células, porém a produção excessiva de radicais de oxigênio pode acarretar em alterações celulares e estar associada à diversas doenças como o envelhecimento precoce e doenças cardíacas (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; ROESLER et al., 2007).

Os produtos naturais apresentam em sua composição substâncias importantes para a manutenção da saúde, contribuem para a eliminação dos radicais livres e são promissores na geração de novas drogas e complementos alimentares. Dentre os produtos, a própolis (produto apícola) tem sido explorada pela população e investigada pela comunidade acadêmica devido a sua composição complexa de substâncias químicas (BLOCH et al., 2010; SFORCIN; BANKOVA, 2011).

A composição variável da própolis é devida as propriedades químicas, mais precisamente a presença de compostos fenólicos como os flavonóides (apigenina, crisina, naringenina, kaempferol, quercetina, catequina) e ácidos fenólicos (ácido caféico, cumárico, ferúlico e elágico) que apresentam propriedades bioativas, que atuam como antioxidantes primários e inibidores de radicais livres (BUSCH et al., 2017). Esta diversidade química pode agir de diferentes maneiras nas atividades biológicas por isso, destaca-se a necessidade da identificação desses compostos e atrelá-los a um tipo de atividade biológica (PICINELLI et al., 2013).

Estudos com própolis (CABRAL et al., 2009; RIGHI et al., 2011; SHIMOMURA et al., 2012; WANG et al., 2015) apontam a cromatografia como uma técnica eficiente na separação de misturas e identificação dessas substâncias químicas. À medida que a própolis brasileira passou a ser estudada e importantes compostos fenólicos como artepelin C e formononetina foram encontrados nas própolis verde (SOUSA et al., 2007) e vermelha (ALENCAR, et al., 2007), respectivamente, o mercado internacional intensificou o interesse para a própolis produzida no Brasil gerando um aumento no preço do quilo comercializado (SCMIDT et al., 2014).

No Estado da Bahia, a própolis também vem sendo investigada em diversas localidades com características fitogeográficas diferentes (MELO et al.,

2012; MATOS et al., 2013). Por não haver registros na literatura sobre a composição química da própolis produzida na região da Baía do Iguape é que o presente estudo tem como objetivo determinar o perfil dos compostos fenólicos da própolis produzida em apiários localizados do entorno da Baía do Iguape, Bahia, Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Produtos químicos

Etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) foi fornecido pela Pronolab (Lisboa, Portugal). O Folin-Ciocalteu reagente, clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ), carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). O ácido gálico e catequina foram adquiridos a Sigma (St. Louis, MO, EUA). Todos os reagentes eram de grau de pureza analítico.

### Local do estudo e coleta das amostras

As amostras foram coletadas em apiários localizados no entorno da Baía do Iguape, município de Cachoeira, Bahia, Brasil ( $\lambda = 12^\circ 40' 59,88'' \text{S}$ ,  $\phi = 38^\circ 51' 0'' \text{W}$ ). O local é considerado uma reserva extrativista constituída de vegetação diversificada com resquícios de Mata Atlântica, vegetação de mangue e por espécies vegetais de interesse agrônômico (PROST, 2010).

As colônias de *Apis mellifera* L. foram instaladas em colmeias Langstroth adaptadas com coletores de própolis e as coletas foram realizadas nos meses de novembro/2013 a Janeiro/2014 e maio/2014 a julho/2014, com três repetições. As amostras foram acondicionadas em recipientes fechados e conservadas a  $-20^\circ\text{C}$  até o momento das análises.

### Extração da própolis

Para a preparação do extrato pesou-se 30g de amostra de própolis pulverizado, em seguida submetida à extração com 375 mL de etanol a 70%, em temperatura ambiente, em banho ultrassônico. Após sessenta minutos, a mistura foi centrifugada a 3000 rpm durante dez minutos e o sobrenadante evaporado sob baixa pressão em capela de exaustão e armazenado a  $-20^\circ\text{C}$  até realização das análises (PARK et al., 1998).

### **Fenois totais**

A quantificação espectrofotométrica de compostos fenólicos totais foi determinada pelo método colorimétrico com o folin-ciocalteu (1:10), utilizando o ácido gálico como referência (SINGLETON et al.,1999). Utilizou-se soluções padrões de ácido gálico para a construção da curva de calibração ( $y=0,0092x+0,0333$  ( $R^2=0,9998$ ), sendo o conteúdo total de fenois expressos como mg equivalentes de ácido gálico por grama de própolis (mg EAG/ g).

### **Flavonoides totais**

O teor de flavonoides totais foi determinado pelo método colorimétrico com cloreto de alumínio (2%), de acordo com Park et al. (2004). A quercetina foi utilizada para construção da curva de calibração ( $y=0,0362x-0,0148$  ( $R^2=0,9996$ ), sendo o conteúdo total de flavonoides expressos como mg equivalentes de quercetina por grama de própolis (mg EQ/ g).

### **LC/MS e MS<sup>n</sup>**

Para a realização da análise LC-MS foi utilizado o espectrômetro de massa LTQ Orbitrap XL <sup>TM</sup> (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Alemanha), controlada pelo *LTQ Tune Plus 2.5.5* e *Xcalibur 2.1.0*. As análises foram realizadas no modo íon negativo, por apresentar maior sensibilidade na detecção de classes distintas de compostos fenólicos.

### **Condições Cromatográficas**

Os dados cromatográficos foram adquiridos por três canais de leituras a 280nm, 320nm e 360nm e as frações recolhidas manualmente de acordo com a visualização do perfil de UV. Utilizou-se a coluna de fase reversa Gemini C<sub>18</sub> (250 x 4.6 mm; 5 µm) da Phenomenex. Os extratos foram filtrados com filtro de nylon 0,22 µm (Millipore) para recipiente âmbar e o volume de 20 µL foi injetado. A fase móvel era composta por água (solvente A) e metanol (solvente B), ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico, e foi utilizada a 1,0 mL/min em modo gradiente do seguinte modo: 0 min, 15% de B em A; 20 min, 30% de B em A; 40 min, 45% de B em A; 45 min, 50% de B em A; 50 min, 55% de B em A; 65 min, 70% de B em A; 75 min, 100% de B; manteve-se 100% de B em A (75-80 min); a



composição da fase móvel regressou às condições iniciais nos 10 minutos seguintes e estas condições foram mantidas durante mais 10 minutos para estabilização antes da injeção seguinte. Os eluentes foram previamente filtrados com um filtro de nylon (porosidade 0,45  $\mu\text{m}$ , Whatman) e desgaseificados. Durante as análises a temperatura da coluna foi mantida a 25°C.

### **Análise estatística**

As análises estatísticas foram executadas pelo Programa R versão 2.15.1. Os dados foram submetidos à Anova de fator único após verificação da não violação dos seus pressupostos e as médias foram comparadas pelo teste *t* de *Student*. Adotou-se o nível de 5% de significância em todas as análises. As análises foram realizadas em triplicatas.

Os valores exigidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2001) para identificação e qualidade da própolis foram usados para comparação com os resultados obtidos nesse estudo.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As amostras de própolis apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para compostos fenólicos totais (Tabela 1). Considerando que a legislação brasileira preconiza valores limites de 5% e 0,5% para fenois e flavonoides totais respectivamente, constatou-se que todas as amostras obtiveram resultados acima do estabelecido pelo Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade da Própolis (BRASIL, 2001). A amostra de maio/2014 ( $111,45 \pm 1,16$  mg EAG/g) apresentou maiores quantidades de fenois totais, enquanto que as amostras referentes aos meses de novembro/2013 ( $6,64 \pm 0,70$  mg EQ/g) e dezembro/2013 ( $5,98 \pm 0,70$  mg EQ/g) destacaram-se na quantidade de flavonoides totais.

Estudos com amostras de própolis oriunda do Estado da Bahia obtiveram valores de 1,48% de fenois totais e 0,32% de flavonoides totais em amostras da Mata Atlântica (CABRAL et al., 2012), 25,86% mgEAG/g e 3,14% mgEQ/g para amostras da região sul (RIGHI; NEGRI; SALATINO, 2013) e uma variação de 7,68 a 36,78 mgEAG/g em amostras da região do Semiárido (MATOS et al., 2013).

**Tabela 1.** Resultados obtidos para os compostos fenólicos totais da própolis da Baía do Iguape, Brasil.

Mês/Ano	Fenois mg EAG/g	Fenois (%)	Flavonoides mg EQ/g	Flavonoides (%)
nov/13	106,52 ± 1,56b	10,65 ± 0,15	6,64 ± 0,70a	0,66 ± 0,07
dez/13	109,1 ± 1,40b	10,91 ± 0,14	5,98 ± 0,70a	0,59 ± 0,07
jan/14	88 ± 1,09d	8,8 ± 0,10	2,47 ± 0,51c	0,24 ± 0,05
mai/14	111,45 ± 1,16a	11,14 ± 0,11	4,28 ± 0,51b	0,42 ± 0,05
jun/14	107,24 ± 1,49b	10,72 ± 0,15	4,77 ± 0,52b	0,47 ± 0,05
jul/14	100,96 ± 1,62c	10,09 ± 0,16	1,94 ± 0,37c	0,19 ± 0,03

EAG/g = equivalente de ácido gálico por grama; EQ/g = equivalente de quercetina por grama. \*Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de *t* de Student.

A quantidade de compostos fenólicos varia consideravelmente entre os tipos de própolis. Machado et al. (2016) comparando diferentes tipos de própolis brasileira constataram que o extrato etanólico da própolis vermelha apresentou maior quantidade de compostos fenólicos ( $300,36 \pm 0,01$  mg EAG/g;  $57,60 \pm 0,01$  mg EQ/g), seguida da própolis verde ( $181,71 \pm 0,01$  mg EAG/g;  $46,80 \pm 0,01$  mg EQ/g) e marrom ( $117,03 \pm 0,01$  mg EAG/g;  $27,97 \pm 0,01$  mg EQ/g). Outros estudos também relataram elevados teores de compostos em própolis de coloração avermelhada (LÓPEZ et al., 2014; MENDONÇA et al., 2015).

Os compostos fenólicos totais deste estudo foram superiores aos supracitados encontrados em diferentes regiões da Bahia e inferiores a própolis vermelha e verde. Essa variabilidade no teor de compostos fenólicos está associada a diferentes espécies vegetais utilizadas como matéria-prima da própolis e na composição e características dos extratos elaborados (MACHADO et al., 2016).

Inicialmente, foi utilizada a espectrofotometria com base na reação de cor para expressar quantitativamente a presença de fenois e flavonoides nas amostras de própolis. Porém, esse método não contesta de forma igualitária os compostos fenólicos presentes apresentando valores subestimados, além de não determinar as classes dos compostos fenólicos (KUBILIENE et al., 2015). Sendo assim, a composição química da própolis foi convalidada pela análise de Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massa (LC/MS).

As análises dos extratos de própolis por LC/MS permitiram a identificação de 19 compostos sendo cinco ácidos fenólicos e quatorze flavonoides. Os perfis cromatográficos (280 nm) foram similares para todas as amostras com pequenas diferenças na intensidade dos picos e tempo de retenção (Figura 1). A identificação dos compostos foi baseada na pesquisa da molécula desprotonada com a interpretação das suas fragmentações (MS) e por comparação com massas descritas na literatura.

Dentre os ácidos fenólicos, quatro foram da classe hidroxicinâmico (ácido cafeico, ácido férrico, ácido clorogênico, ácido 3,4-dimetil-cafeico (DMCA)) e um hidroxibenzoico (ácido benzoico-4-sulfato). Quanto aos flavonoides, o maior número de compostos enquadrou-se na classe das flavonas (apigenina, apigenina-O-glucuronido, apigenina-6,8-di-C-glucosido, Apigenina-6-C-glucosil-8-C-arabinose (isoschaftoside), apigenina-8-C-glucosil-6-C-arabinose (schaftoside), dimetoxi-luteolina-glucósido, vitexina), seguido de flavonois (quercetina, quercetina-3-O-rhamnosida, quercetina-3-O-glucuronida, kaempferol, kaempferol-3-O-glucosido) e flavononas (naringin, naringenina). Os compostos obtidos e cada uma das frações analisadas estão representados na Tabela 2.

Estudos indicam que a própolis dos países da zona tropical apresentam baixas variedades e concentrações de flavonoides na constituição química (TRUSHEVA et al., 2006). Na própolis brasileira é comumente encontrado flavonoides aglicona (RIGHI; NEGRI; SALATINO, 2013), no entanto, no presente estudo foram detectados flavonoides glicosilados sendo os principais constituintes químicos.

Os compostos derivados da apigenina (apigenina 6,8-di-C-glucoside (vicenin-2), apigenina-6-C-glucosyl-8-C-arabinose (isoschaftoside), apigenina-8-C-glucosyl-6-C-arabinose (schaftoside), e kaempferol (kaempferol-3-O-glucoside) apresentaram os maiores picos estando presentes em todas as amostras.

O composto apigenina-6,8-di-C-glucosido (vicenin-2) é resultante da molécula desprotonada  $[M-H]^-$  de m/z 593. Os espectros  $MS^2$  de íons negativos m/z 353 em m/z 383 indicaram que a aglicona é a apigenina (m/z 269) + glucose + glicose. O grupamento da aglicona e molécula de açúcar indicam ser uma hexose por apresentar fragmentos como pico base m/z 473 os íons m/z 503 e m/z 575 (RIGHI; NEGRI; SALATINO, 2013). O mesmo comportamento foi observado

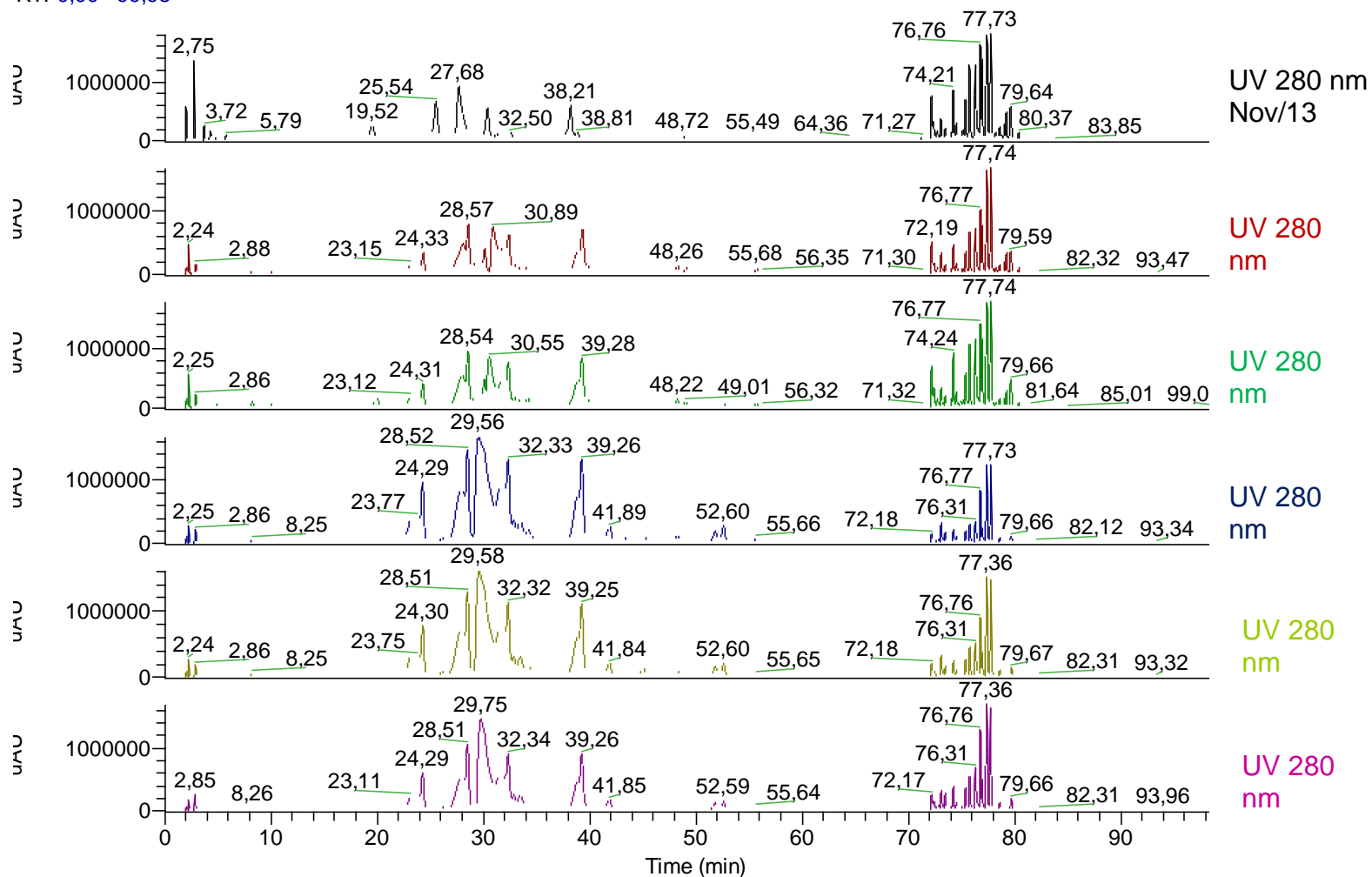
em demais compostos derivados da apigenina. A apigenina-6-C-glucosil-8-C-arabinose (isoschaftoside) e a apigenina-8-C-glucosil-6-C-arabinose (schaftoside) apresentaram molécula desprotonada para  $[M-H]^-$  m/z 563, obtendo padrões semelhantes nas fragmentações: m/z 473, m/z 443, m/z 545, m/z 353, m/z 383.

Apigenina e seus derivados pertencem à classe das flavonas e estão presentes em muitos vegetais (laranja, pimentas, camomila) e têm sido relatados em estudos por suas propriedades biológicas (WIJAYA; MARES, 2012). He et al. (2016) observaram que a apigenina apresentou potencial terapêutico por reduzir alterações histopatológicas e inibir o estresse oxidativo induzido pelo uso da cisplatina (cis-diamminedichloroplatinum) em lesões renais. Em tratamento do cancro de próstata, o mesmo composto obteve efeito inibitório sobre a produção de andrógenos pela inibição direta da atividade de enzimas esteroidogênicas (WANG et al., 2016).

A presença dessa flavona em própolis foi observada por Richi, Negri e Salatino (2013) em estudos com amostras da Bahia, Piauí, São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Goiás e por Valenzuela-Barra et al. (2015) com própolis de duas regiões do Chile, as quais tiveram efeito anti-inflamatório tópico contra os agentes inflamatórios ácido araquidônico e O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate.

O composto kaempferol-3-O-glucoside ( $[M-H]^-$  de m/z 447) expôs o fragmento de m/z 285 o que caracteriza uma molécula desprotonada do kaempferol. O kaempferol é um dos principais flavonóis presentes em diferentes formas glicosídicas em que a posição de glicosilação ocorre frequentemente no C-3 ou C-7 (FALCÃO et al. 2012). Este composto e seu derivado foram detectados em extratos de própolis de Portugal (FALCÃO et al., 2013) e do Chile (CASTRO et al., 2014). Em estudo experimental para o tratamento de doenças no fígado Wang et al. (2015) demonstraram que o kaempferol-3-O-glucoside obteve efeitos protetores contra lesão hepática induzida por tetracloreto de carbono ( $CCl_4$ ) oxidativa. Avaliando a capacidade antioxidante intracelular e efeitos protetores do kaempferol em diferentes tipos de cancro humano, Lião et al. (2016) relataram que o composto obteve notável atividade antioxidante preservando enzimas a níveis normais e efeito antiproliferativo pela indução de apoptose.

RT: 0,00 - 99,98



**Figura 1.** Cromatogramas obtidos referentes às amostras de própolis.

**Tabela 2.** Compostos fenólicos obtidos por análise LC/MS de amostras de própolis.

Nº	Rt (min)	[M-H]-	MS <sup>2</sup> fragmento	Compostos	Amostras
1	2,7	179	179, 134,135	Ácido Cafeico	I1, I2, I3, I4, I5, I6
2	4,46	193	149, 133	Ácido Ferúlico	I1, I2, I3, I4, I5, I6
3	7,15	301	179, 178, 151	Quercetina	I1, I2, I3, I4, I5, I6
4	9,94	217	173	Ácido Benzóico-4-sulfato	I3, I6
5	14,5	353	191, 178, 179, 135	Ácido Cafeoilquínico	I1, I2, I3, I4, I5, I6
6	17,3	445	325, 355, 427	Apigenina-O-glucuronido	I1, I4, I5
7	19,5	475	355, 385, 149	Dimetoxi-luteolina-glucósido	I1, I2, I3, I4, I5, I6
8	25,5	593	503, 473, 353, 383	Apigenina 6,8-di-C-glucosido	I1, I2, I3, I4, I5, I6
9	27,6	447	284, 285, 327	Kaempferol-3-O-glucosido	I1, I2, I3, I4, I5, I6
10	30,3	563	443, 353, 383	Apigenina-6-C-glucosil-8-C-arabinose (isoschaftósido)	I1, I2, I3, I4, I5, I6
11	38,2	563	443, 353, 383	Apigenina-8-C-glucosil-6-C-arabinose (schaftosido)	I1, I2, I3, I4, I5, I6
12	47	579	300, 271, 301, 255	Naringin	I1, I2, I3, I4, I5, I6
13	47,6	447	301, 300, 326	Quercetina-3-O-rhamnosido	I1, I2, I3, I4, I5, I6
14	48,7	477	301, 178, 151	Quercetina-3-O-glucuronido	I1, I2, I3
15	52,6	431	285, 255, 242	Vitexina	I4, I5, I6
16	53,4	271	150, 176,119, 125	Naringenina	I1, I2, I3, I4, I5, I6
17	55,4	269	225	Apigenina	I1, I2, I3, I4, I5, I6
18	56,1	285	151, 185	Kaempferol	I1, I2, I3, I4, I5, I6
19	64,3	207	161,163, 192, 136	3,4- Ácido dimetil-cafeico (DMCA)	I1, I2, I3, I4, I5, I6

I1 = amostra novembro/13; I2 = amostra dezembro/13; I3 = amostras janeiro/14; I4 = amostras maio/14; I5 = amostras junho/14; I6 = amostras julho/14.

Os flavonóis quercetina-3-O-rhamnoside ( $[M-H]^-$  de  $m/z$  447) e quercetina-3-O-glucuronido ( $[M-H]^-$  de  $m/z$  477) correspondem os glicosídeos da quercetina. A presença do espectro  $MS^2$  de  $m/z$  301 é um indicativo de um derivado da aglicona. Outro indicio é a presença do fragmento de  $m/z$  300, formado pela ruptura hemolítica da ligação O-glicosídica (FALCÃO et al., 2012). A quercetina-3-O-rhamnoside foi relatada por Righi, Negri e Salatino (2013) em amostras de própolis do município de Picus/PI da região Nordeste do Brasil. Golpi et al. (2016) verificaram que esse composto obteve inibição significativa em atividade *in vitro* de fosfolipase e hialuronidase, aumentando o tempo de sobrevivência dos indivíduos injetados com o veneno de cobra.

A espectrofotometria de massa possibilitou a identificação de dois compostos da classe flavonona. Os fragmentos  $m/z$  300, 271, 301 caracterizam o composto naringin ( $[M-H]^-$  de  $m/z$  579), no entanto o naringenin ( $[M-H]^-$  de  $m/z$  271) apresentou os fragmentos  $m/z$  150, 176, 119. Esse último, foi relatado por Piccinelli et al. (2011) em amostras de própolis oriundas do nordeste brasileiro e de Cuba. Qin et al. (2016) sugeriram que a naringenin pode ser útil no tratamento de complicações vasculares do diabetes. No estudo, os pesquisadores observaram que o composto reduziu a apoptose das células endoteliais e melhoraram a disfunção endotelial vascular.

Os flavonoides glicosídeos anteriormente descritos são raramente encontrados na composição da própolis devido à resina de fontes vegetais terem características hidrofóbicas e a presença de enzimas  $\beta$ -glucosidase durante a colheita e processamento do material (ZHANG et al., 2011; FALCÃO et al., 2012). Vale salientar que os flavonoides com moléculas de açúcar podem proporcionar interações químicas com ações biológicas mais eficazes que os agliconas (GOLPI et al., 2016).

Em diversos estudos têm sido relatado o efeito benéfico à saúde humana (KADOMA; FUJISAWA, 2008) e animal (GONZÁLEZ-RÍOS et al., 2016) dos ácidos hidroxicinâmicos. Por serem amplamente distribuídos no reino vegetal, eles são comumente encontrados em diferentes própolis e localidades geográficas (KASOTE et al., 2014; MENDONÇA et al., 2015; DIMKIC et al., 2016).

Referente aos ácidos fenólicos, os dados MS e  $MS^2$  proporcionaram a identificação do ácido cafeico ( $[M-H]^-$   $m/z$  179), ácido *p*-cumárico, ( $[M-H]^-$   $m/z$

163), ácido ferulico ( $[M-H]^-$  m/z 193), os quais partilharam uma via de fragmentação comum com base na perda do grupo CO<sub>2</sub> (-44u) (Pellati et al., 2011). O ácido 3,4-dimetil-cafeico ( $[M-H]^-$  m/z 207) foi identificado como sendo um derivado metilado do ácido cafeico, onde o espectro deste íon apresentou fragmento m/z 163 e um íon principal de m/z 102, resultante da perda de CO<sub>2</sub> e um dos substituintes do metoxilo (FALCÃO et al., 2010).

O ácido cafeoilquínico ( $[M-H]^-$  m/z 353) é resultante dos fragmentos m/z 179 (ácido cafeico) e m/z 191 (ácido quínico). Dependendo do local de ligação, esse ácido fenólico pode apresentar os isômeros ácidos clorogênico (ácido 5-O-cafeoilquínico), criptoclorogênico (ácido 4-O-cafeoilquínico), neoclorogênico (ácido 3-O--cafeoilquínico), estando presentes em várias plantas, atuando contra a peroxidação lipídica (MARKOVIC; TOŠOVIC, 2016).

## CONCLUSÃO

As amostras apresentaram diferença na quantificação de compostos fenólicos totais, no entanto demonstraram uma composição química similar independente da época de coleta. Os compostos fenólicos identificados nesse estudo são importantes para futura validação como marcadores e controle da qualidade da própolis de *A. mellifera* produzida na região da Baía do Iguape/BA, sendo este o primeiro estudo com LC/MS nesta região do Estado da Bahia, Brasil. A presença de flavonoides glicosilados nas amostras em estudo eleva a importância de mais investigações da própolis desta região, por não serem compostos comumente encontrados na própolis brasileira.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, S.M.; OLDONI, T.L.C.; CASTRO, M.L.; CABRAL, I.S.R.; COSTA-NETO, C.M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKID, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, n.2, p.278-283, 2007.



BLOCH, G.; FRANCOYB, T.M.; WACHTELC, I.; PANITZ-COHENC, N.; FUCHSD, S.; MAZAR, A. Industrial apiculture in the Jordan valley during Biblical times with Anatolian honeybees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.107, n. 25, p.11240-11244, 2010.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 3 – ANEXO VI – **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 19 jan. 2001.

VALENZUELA-BARRA, G.; CASTRO, C.; FIGUEROA, C.; BARRIGA, A.; SILVA, X.; HERAS, B.; HORTELANO, S.; DELPORTE, C. Anti-inflammatory activity and phenolic profile of própolis from two locations in Región Metropolitana de Santiago, Chile. **Journal of Ethnopharmacology**, v.168, p.37-44, 2015.

BUSCH, V.M.; PEREYRA-GONZALEZ A.; SEGATIN, N.; SANTAGATIPA, P.R.; ULRICH, P.N.; BUERA, M.P. Propolis encapsulation by spray drying: Characterization and stability. **LWT – Food Science and Technology**, v. 75, p. 227-235, 2017.

CABRAL, I.S.R; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n.6, p.1523-1527, 2009.

CABRAL I.S.R; OLDONI T.L.C; ALENCAR S.M; ROSALEN P.L; IKEGAKI M. The correlation between the phenolic composition and biological activities of two varieties of Brazilian propolis (G6 and G12). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.48, n.3, p.557-564, 2012.

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

DIMKIC, I.; RISTIVOJEVIC, P.; JANAKIEV, T.; BERIC, T.; TRIFKOVIC J.; MILOJKOVIC-OPSENICA, D.; STANKOVIC, S. Phenolic profiles and antimicrobial activity of various plant resins as potential botanical sources of Serbian propolis. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 856-871, 2016.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M.; Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.446-452, 2006.

FALCÃO, S.I.; VILAS-BOAS M.; ESTEVINHO, M.L.M.; BARROS, C.; DOMINGUES, M.R.M.; CARDOSO, S.M. Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.396, n.1, p. 887-897, 2010.

FALCÃO, S.I.; TOMÁS, A.; VALE, N.; GOMES, P.; FREIRE, C.; VILAS-BOAS M. Phenolic quantification and botanical origin of Portuguese propolis. **Industrial Crops and Products**, v.49, p.805-812, 2013.

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: uncommon propolis rich in flavonoid glycosides. **Phytochemical Analysis**, v.24, p.309-318, 2012.

GONZÁLEZ-RÍOS, H.; DÁVILA-RAMÍREZ, J.L.; PEÑA-RAMOS, E.A.; VELENZUELA-MELENDRÉS, M.; ZAMORANO-GARCIA, L.; ISLAVA-LAGARDA, T.Y.; VALENZUELA-GRIJAVA, N.V. Dietary supplementation of ferulic acid to steers under commercial feedlot feeding conditions improves meat quality and shelf life. **Animal Feed Science and Technology**, v. 222, p. 111-121, 2016.

GOPI, K.; ANBARASU, K.; RENU, K.; JAYANTHI, S.; VISHWANATH, B.S.; JAYARAMAN, G. Quercetin-3-O-rhamnoside from *Euphorbia hirta* protects against

snake Venon induced toxicity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1860, p.1528-1540, 2016.

HE, X.; LI, C.; WEI, Z.; WANG, J.; KOU, J.; LIU, W.; SHI, M.; YANG, Z.; FU, Y. Protective role of apigenin in cisplatin-induced renal injury. **European Journal of Pharmacology**, v.789, p.215–221, 2016.

KADOMA, Y.; FUJISAWA, S. A. Comparative study of the radical-scavenging activity of the phenolcarboxylic acids caffeic acid, p-coumaric acid, chlorogenic acid and ferulic acid, with or without 2- mercaptoethanol, a thiol, using the induction period method. **Molecules**, v.13, p. 2488-2499, 2008.

KASOTE, D.; SULEMAN, T.; CHEN, W.; SANDASI, M.; VILJOEN, A.; VUUREN, S.V. Chemical profiling and chemometric analysis of South African própolis. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.55, p. 156-163, 2014.

KUBILIENE, L.; LAUGALIENE, V.; PAVILONIS, A.; MARUSKA, A.; MAJIENE, D.; BARCAUSKAITE, K.; KUBILIUS, R.; KASPARAVICIENE, G.; SAVICKAS, A. Alternative preparation of propolis extracts : comparison of their composition and biological activities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.15, n.156, p.1-7, 2015.

LIÃO, W.; CHEN, L.; MA, X.; JIAO, R.; LI, X.; WANG, Y. Protective effects of kaempferol against reactive oxygen species induced hemolysis and its antiproliferative activity on human cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.114, p.24-32, 2016.

LÓPEZ, B.G.C.; SCHMIDT, E.M.; EBERLIN, M. N.; SAWAYA, A.C.H.F. Phytochemical markers of different types of red propolis. **Food Chemistry**, v.146, n.1, p.174-180, 2014.

MACHADO, B.A.S.; SILVA R.P.D.; BARRETO, G.A.; COSTA,S.S.; SILVA, D.F.; BRANDÃO, H.N.; ROCHA J.R.C.; DELLAGOSTIN, O.A.; HENRIQUES, J.A.P.;

GUEZ, M.A.U.; PADILHA, F.F. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of Brown , green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. **PLOS ONE**, p.1-26, 2016.

MARKOVIC, S.; TOŠOVIC, J. Comparative study of the antioxidative activities of caffeoylquinic and caffeic acids. **Food Chemistry**, v. 2010, p. 585-592, 2016.

MATOS, V.R.; ALENCAR, S.M.; SANTOS, F.A.R. Pollen types and levels of total phenolic compounds in propolis produced by *Apis mellifera* L. (Apidae) in an area of the Semiarid Region of Bahia, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.86, n.1, p.407-418, 2013.

MENDONÇA, I.C.G.; PORTO, I.C.C.M.; NASCIMENTO, T.G.; SOUZA, N.S.; OLIVEIRA, J.M.S.; ARRUDA, R.E.S.; MOUSINHO, K.C.; SANTOS, A.F.; BASÍLIO-JÚNIOR, I.D.; PAROLIA, A.; BARRETO, F.S. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.15, n.357, p.1-12, 2015.

MELO, A.A.M.; MATSUDA, A.H.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Identidade e qualidade da própolis proveniente de quatro regiões do Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.71, n.3, p.540-548, 2012.

PARK, Y. K., IKEGARI, M., ABREU, J. A. S., & ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.3, p.313-318, 1998.

PARK, Y.R.; PAREDES-GUZMAN, J.F.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; FUJIWARA, F.Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.1100-1103, 2004.

PELLATI, F.; ORLANDINI, G.; PINETTI, D.; BENVENUTI, S. HPLC-DAD nad HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of própolis extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.55, n.1, p.934-948, 2011.

PICCINELLI, A.L.; LOTTI, C.; CAMPONE, L.; CUESTRA-RUBIO, O.; FERNANDEZ, M.C.; RASTRELLI, L. Cuban and brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p. 6484-6491, 2011.

PROST, CATHÉRINE. Resex marinha versus polo naval na Baía do Iguape. **Novos Cadernos- NAEA**, v.13, n.1, p. 47-70, 2010.

QIN, W.; REN, B.; WANG, S.; LIANG, S.; HE, B.; SHI, X.; WANG, L.; LIANG, J.; WU, F. Apigenin and naringenin ameliorate PKC $\beta$ II-associated endothelial dysfunction via regulating ROS/caspase-3 and NO pathway in endothelial cells exposed to high glucose. **Vascular Pharmacology**, v.85, p.39-49, 2016.

RIGHI, A.A.; ALVES, T.R.; NEGRI, G.; MARQUES, L.M.; BREYERD, H.; SALATINO, A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.91, n.13, p.2363-2370, 2011.

RIGHI, A. A.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Comparative Chemistry of Propolis from Eight Brazilian Localities. **Hidawi - Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-14, 2013.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p. 53-60, 2007.

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

SHIMOMURA, k.; SUGIYAMA, Y.; NAKAMURA, J.; AHN, M.; KUMAZAWA, S. Component analysis of propolis collected on Jeju Island, Korea. **Phytochemistry**, v. 93, p. 222–229, 2012.

SCHMIDT, E.M.; STOCK, D.; CHADA, F.J.G.; FINGER, D.; SAWAYA, A.C.H.F.; EBERLIN, M.N.; FELSNER, M.L.; QUINÁIA, S.P.; MONTEIRO, M.C.; TORRES, Y.R. A Comparison between Characterization and Biological Properties of Brazilian Fresh and Aged Propolis. **BioMed Research International**, v.1 p.1-10, 2014.

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

SOUSA, J.P.B.; FURTADO, N. A.J.C.; JORGE, R.; SOARES, A.E.E.;BASTOS, J.K. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, 2007.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; V. BANKOVA, V. Bioactive constituents of Brazilian red propolis, **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.3, n.2, p. 249–254, 2006.

WANG, X.; WANG, G.; LI, X.; LIU, J.; HONG, T.; ZHU, Q.; HUANG, P.; GE, R.S. Fitoterapia Suppression of rat and human androgen biosynthetic enzymes by apigenin : Possible use for the treatment of prostate cancer. **Fitoterapia**, v. 111, p. 66–72, 2016.

WANG, Y.; TANG, C.; ZHANG, H. Hepatoprotective effects of kaempferol 3-O-rutinoside and kaempferol 3-O-glucoside from *Carthamus tinctorius* L. on CCl<sub>4</sub>-induced oxidative liver injury in mice. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.23, p.310-317, 2015.

WIJAYA, G. Y.; MARES, D. J. Apigenin di-C-glycosides ( ACG ) content and composition in grains of bread wheat ( *Triticum aestivum* ) and related species. **Journal of Cereal Science**, v. 56, n. 2, p. 260-267, 2012.

ZHANG, C.P.; ZHENG, H.Q.; HU F.L. Extraction, partial characterization, and storage stability of b-glucosidase from propolis. **Journal Food Science**, v.76, n.1, p.75-79, 2011.

## ARTIGO 3

# ATIVIDADES DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA DA PRÓPOLIS PRODUZIDA EM APIÁRIOS NO ENTORNO DA BAÍA DO IGUAPE, BRASIL<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup>Artigo a ser ajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico científico *Food Chemistry*, em versão na língua inglesa.



## **Atividades de inibição enzimática da própolis produzida em apiários no entorno da Baía do Iguape, Brasil**

**Resumo:** O estudo teve como objetivo avaliar os efeitos inibitórios das enzimas antidiabética ( $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glucosidase), anticolinesterase (acetilcolinesterase, butirilcolinesterase), anti-lipase, anti-tirosinase, anti-hemolítico e anti-inflamatória (hialuronidase) de extratos de própolis oriunda de apiários da Baía do Iguape, Bahia, Brasil. As amostras foram coletadas em três apiários durante os meses de novembro e dezembro de 2013, janeiro, maio, junho e julho de 2014. Para a ação antidiabética a amostra de novembro/2013 apresentou melhor desempenho com  $IC_{50}$   $115,65 \pm 5,05 \mu\text{g/mL}$ , para  $\alpha$ -amilase e  $31,05 \pm 3,5 \mu\text{g/mL}$  para a  $\alpha$ -glucosidase. A amostra de dezembro/2013 apresentou menor  $IC_{50}$   $1,11 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$  na atividade anti-lipase. Na anticolinesterase, os melhores desempenhos de inibição ocorreram nas amostras de dezembro/2013 ( $IC_{50}$   $1,11 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$ ) e janeiro/2014 ( $IC_{50}$   $1,66 \pm 0,38 \mu\text{g/mL}$ ) e para butirilcolinesterase maio/2014 ( $IC_{50}$   $36,75 \pm 1,11 \mu\text{g/mL}$ ), junho/2014 ( $IC_{50}$   $39,45 \pm 1,64 \mu\text{g/mL}$ ) e julho/2014 ( $IC_{50}$   $37,93 \pm 2,66 \mu\text{g/mL}$ ). Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras de novembro/2013, dezembro/2013 e janeiro/2014 quanto às ações anti-tirosinase e anti-hemolítico. A amostra de novembro/2013 obteve maior inibição (53,18%) da enzima hialuronidase. Os resultados da própolis em estudo apresentaram benefícios potenciais quanto à inibição das diferentes enzimas avaliadas, com melhor desempenho para as amostras de novembro/2013 a janeiro/2014, período de boa disponibilidade do pasto apícola. A própolis em estudo torna-se uma fonte antioxidante natural, podendo ser explorada como matéria prima para elaboração de novos produtos com princípios ativos na formulação de novos fármacos.

**Palavras-chave:** própolis, enzimas, diabetes, Alzheimer, obesidade.

## Enzyme inhibition activity of propolis produced in apiaries near Baía do Iguape, Brazil

**ABSTRACT:** The study aimed to evaluate the inhibitory effects of antidiabetic enzymes ( $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase), anticholinesterase (acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase), anti-lipase, anti-tyrosinase, anti-hemolytic and anti-inflammatory (hyaluronidase) of propolis extracts from apiaries near Baía do Iguape, Bahia, Brazil. The samples were collected in three apiaries during the months of November and December 2013, and January, May, June and July 2014. For the antidiabetic action, samples collected in November 2013 showed better performance with  $IC_{50}$   $115.65 \pm 5.05$   $\mu\text{g/mL}$ , for  $\alpha$ -amidase and  $31.05 \pm 3.5$   $\mu\text{g/mL}$  for  $\alpha$ -glucosidase. Samples collected in December 2013 showed lower  $IC_{50}$   $1.11 \pm 0.2$   $\mu\text{g/mL}$  in the anti-lipase activity. In anticholinesterase, the best inhibitory performances were observed in samples collected in December 2013 ( $IC_{50}$   $1.11 \pm 0.2$   $\mu\text{g/mL}$ ) and January 2014 ( $IC_{50}$   $1.66 \pm 0.38$   $\mu\text{g/mL}$ ) and for butyrylcholinesterase, May 2014 ( $IC_{50}$   $36.75 \pm 1.11$   $\mu\text{g/mL}$ ), June 2014  $IC_{50}$   $39.45 \pm 1.64$   $\mu\text{g/mL}$ ) and July 2014 ( $IC_{50}$   $37.93 \pm 2.66$   $\mu\text{g/mL}$ ). There was no significant difference ( $p < 0.05$ ) among samples collected in November 2013, December 2013, and January 2014 in terms of anti-tyrosinase and anti-hemolytic actions. The sample of November 2013 showed greater inhibition (53.18%) of the enzyme hyaluronidase. The results for the propolis in study showed potential benefits as for the inhibition of the enzymes evaluated with better performance for the samples collected from November 2013 to January 2014, a period of good availability of apiculture pasture. The propolis in study becomes a natural antioxidant source, which can be used as raw material for the preparation of new products with active ingredients in formulations of new medicines.

**Key words:** propolis, enzymes, diabetes, Alzheimer's, obesity.

## INTRODUÇÃO

Os radicais livres contribuem para acelerar o envelhecimento celular, proporcionam dano neural podendo ocasionar doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (NEAGU et al., 2015). A doença de Alzheimer (principal forma de demência) afeta mais de 25 milhões de pessoas no mundo, tendo sido classificada como a terceira doença mais cara e a sexta causa de morte nos países desenvolvidos (LEWCZUK et al., 2015). O Parkinson não causa morte diretamente, porém pessoas com essa doença sofrem com tremores, má coordenação dos movimentos, dores no corpo, cansaço constante, sendo esses sintomas agravados ao avançar do tempo (WANG et al., 2011).

Outra doença que tem crescido e tornou-se problema de saúde pública é a obesidade. Associada ao acúmulo excessivo de gordura corporal, a obesidade gera problemas físicos (dores nas articulações, excesso de sono, cansaço) e doenças crônicas secundárias (JEONG et al., 2016). Uma dessas doenças é a *Diabetes mellitus*, caracterizada por apresentar elevados níveis de glicose no sangue resultantes de secreção ou função inadequada da insulina e a sub-utilização da glicose, tendo como consequência cegueira, insuficiência renal e neuropatia debilitante (LOIZZO et al., 2013).

Manter o equilíbrio entre o estresse oxidativo e antioxidantes é um importante mecanismo na prevenção de danos causados pelos radicais livres, portanto o uso de suplementos com compostos fenólicos tem sido uma alternativa na prevenção do estresse oxidativo (AL-HARIRI et al., 2016). A própolis (produto apícola) é um potencial antioxidante por apresentar em sua composição altas concentrações e uma diversidade de compostos fenólicos podendo ser explorado como aditivo alimentar ou até mesmo na formulação de fármacos (ARAÚJO et al., 2016).

Estudos têm confirmado amplas ações biológicas da própolis, agindo como antioxidante (MACHADO et al., 2016), antifúngica (NEVES, et al., 2016), antibacteriana (BITTENCOURT et al., 2016), anti-inflamatória (BUENO-SILVA et al., 2016), ao combate a doenças degenerativas (ELISSA; ELSHERBING; MAGMOMAH, 2015; CATCHPOLE et al., 2015; IKEDA et al., 2011) . Neste contexto, o estudo teve como objetivo avaliar os efeitos inibitórios das enzimas

antidiabética ( $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glucosidase), anticolinesterase (acetilcolinesterase, butirilcolinesterase), anti-lipase, anti-tirosinase, anti-hemolítico e anti-inflamatória (hialuronidase) de extratos de própolis oriundos de apiários da Baía do Iguape, Bahia, Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local do estudo e coleta das amostras

O estudo foi realizado em apiários localizados no entorno da Baía do Iguape, município de Cachoeira, Bahia, Brasil ( $\lambda = 12^\circ 40' 59,88'' S$ ,  $\phi = 38^\circ 51' 0'' W$ ). O local é considerado uma reserva extrativista constituída de vegetação diversificada com resquícios de Mata Atlântica, vegetação de mangue e por espécies de interesse agrônômico (PROST, 2010).

As colônias de *Apis mellifera* foram instaladas em colmeias Langstroth adaptados com coletores de própolis e as coletas realizadas nos meses de novembro/2013 a Janeiro/2014 e maio/2014 a julho/2014, com três repetições. As amostras foram acondicionadas em recipientes fechados e conservadas a  $-20^\circ C$  até momento das análises.

### Extração da própolis

Para a preparação do extrato pesou-se 30g de amostra de própolis pulverizado, em seguida submetida à extração com 375 mL de etanol a 70% em temperatura ambiente no banho ultrassônico. Após sessenta minutos, a mistura foi centrifugada a 3000 rpm durante dez minutos e o sobrenadante evaporado sob baixa pressão em capela de exaustão e armazenado a  $-20^\circ C$  até realização das análises (PARK et al., 1998).

### Atividade de inibição da lipase

Para avaliar a atividade da lipase pancreática de porco (PPL) tipo II foi utilizado o método espectrofotométrico descrito por Roh e Jung (2012). Para a avaliação foi utilizado o extrato de própolis e orlistat (composto de referência) em diferentes concentrações pré-incubados com PPL (1mg/ML) por uma hora em tampão fosfato de potássio (0,1 mM; pH 7,2; 0,1% de Tween 80) a  $30^\circ C$  antes do

ensaio de inibição da atividade da PPL. Adicionou-se 0,1 mL do substrato butirato de p-nitrofenila. A incubação foi realizada durante cinco minutos a 30°C, sendo a quantidade de p-nitrofenila liberado na reação medida por um espectrofotômetro a 405nm. A atividade do controle negativo (Dimetilsulfóxido-DMSO) foi avaliada com a presença e ausência do inibidor. A percentagem de inibição foi calculada e os valores IC<sub>50</sub> determinados.

#### **Atividade de inibição da $\alpha$ -amilase**

O ensaio da atividade de inibição da enzima  $\alpha$ -amilase seguiu o método descrito por Gao et al. (2008). As amostras foram dissolvidas em DMSO (50%) e 0,2 mL da solução de  $\alpha$ -amilase pancreático de porco (Sigma, A-6255; 2,0 U / mL em tampão Tri-HCl 50 mM contendo CaCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 6,9). O amido azul (2,0 mg) foi suspenso em tampão Tri-HCl 50 mM (pH 6,9) contendo 10 nM de CaCl<sub>2</sub> e utilizado como substrato. A mistura foi fervida a 100°C durante cinco minutos e incubada a 37°C por dez minutos. A reação das amostras com substrato ocorreu a 37°C durante 10 min e foi interrompida pela adição de 0,5 mL de ácido acético a 50%. A mistura foi centrifugada a 2000 rpm durante cinco minutos a 4°C, em seguida o sobrenadante foi submetido a leitura a 595 nm. Acarbose foi utilizada como composto de referência. A porcentagem de inibição foi calculada e os valores de IC<sub>50</sub> determinados.

#### **Atividade de inibição da $\alpha$ -glucosidase**

O ensaio da atividade de inibição da enzima  $\alpha$ -glucosidase foi realizado de acordo a Mayur et al. (2010) e Sancheti; Sancheti; Seo (2010). Para o ensaio foi adicionada em uma microplaca de 96 poços a solução contendo: tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0) (50  $\mu$ L), 4-nitrofenilo  $\alpha$ -Dglucopyranoside 0,5mM (25  $\mu$ L), amostras em diferentes concentrações (10  $\mu$ L) e solução de  $\alpha$ -glucosidase (25  $\mu$ L). O material foi incubado a 37°C durante trinta minutos, após o período de incubação foi acrescido 100  $\mu$ L da solução de carbonato de sódio a 0,2M. A hidrólise enzimática de substrato foi monitorada pela quantidade de p-nitrofenol liberado na mistura de reação. Amostras de branco foram utilizadas substituindo a adição da enzima por solução tampão. Foi preparado um controle solvente substituindo os extratos de própolis por metanol. A acarbose foi utilizada como composto de

referência. A leitura das absorvâncias foi realizada por um leitor de microplacas a 410 nm. A porcentagem de inibição foi calculada e os valores de IC<sub>50</sub> determinados.

### **Atividade de inibição da colinesterase**

O efeito da inibição das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase foi avaliado conforme o método espectrofotométrico descrito por Senol et al. (2010). Foram utilizados a Acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus* (enguia elétrica-S Type-VI, EC 3.1.1.7, Sigma Aldrich EUA) e BChE de soro de cavalo (CE 3.1.1.8, Sigma Aldrich EUA). Para substrato de reação utilizou-se o iodeto de acetiltiocolina e cloreto de butiriltiocolina (Sigma Aldrich, EUA). A hidrólise do iodeto de acetiltiocolina e do cloreto de butiriltiocolina foram monitoradas pela formação do aniôn amarelo 5-tio-2-nitrobenzoato de metila resultante da reação do 5,50-ditio-bis (2-nitrobenzóico) ácido (DTNB, Sigma Aldrich EUA) com as tiocolinas. A porcentagem de inibição das enzimas foi determinada comparando as taxas de reação das amostras em relação ao controle (etanol em tampão de fosfato, pH = 8). Foi utilizada a fórmula:  $(E - S) / E \times 100$ , onde E é a atividade da enzima sem amostras testes e S é a atividade da enzima com amostras testes. Eserine (Sigma Aldrich, EUA) foi utilizado como composto de referência.

### **Atividade de inibição da tirosinase**

A determinação da atividade de inibição da enzima tirosinase seguiu o método descrito por Orhan e Khan (2014), com modificações. 25 µL do extrato de própolis foram misturados a 40 µL da solução de tirosinase e (EC 1.14.1.8.1, 30 U mushroom tyrosinase, Sigma) e 100 µL de tampão fosfato (pH 6,8) numa microplaca de 96 poços e incubadas durante quinze minutos a 37°C. Em seguida, 40 µL de L-DOPA foi adicionado à mistura e novamente incubada por dez minutos a 37°C. Após incubação foi realizada a leitura a 492 nm no equipamento Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer – Finlândi. O ácido kojic foi utilizado como controle positivo. Todos os testes foram realizados em triplicatas, sendo a porcentagem de inibição da tirosinase calculada pela fórmula: % de inibição =  $[(\text{Absorbância do branco} - \text{Absorbância da amostra}) / \text{Absorbância do branco}] \times 100$ .

### **Ensaio anti-hemolítico**

Os efeitos protetores dos padrões (BHA, ácido tânico e quercetina) e das amostras de própolis contra hemólise foram realizados conforme descrito por Valente et al. (2011). Colheu-se sangue (10 mL) de um voluntário humano saudável por punção venosa num tubo revestido com citrato. Centrifugou-se imediatamente a 1500 r / min durante 10 min a 4°C e lavou-se três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) (0,02 mol / L, pH 7,4) para obter glóbulos vermelhos. Foi re-suspenso a 2% usando o mesmo tampão. Para estudar os efeitos protetores dos extratos / padrões contra a hemólise induzida por AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorido), a suspensão de eritrócitos foi pré-incubada com os extratos / padrões (50 µg de padrões e 100 µL de amostras) a 37°C durante 30 min, seguida de incubação com e sem AAPH (dissolvido em PBS, concentração final 50 mmol/L). Esta mistura reacional foi agitada suavemente durante a incubação durante 4 h a 37°C. Em todas as experiências, utilizou-se para comparação um controle negativo (eritrócitos em PBS), bem como controles do extrato (eritrócitos em PBS com extrato). A extensão da hemólise foi determinada espectrofotometricamente a 540 nm. Resumidamente, a mistura reacional foi centrifugada a 4000 r / min durante 10 min para separar os eritrócitos no final da incubação e os dados foram calculados para a atividade anti-hemolítica. Atividade anti-hemolítica /% =  $(Ac-As) / Ac \times 100$ , onde Ac é a absorvância do controle; As a absorvância das amostras.

### **Ensaio anti-inflamatórios**

A inibição da hialuronidase foi avaliada seguindo método proposto por Ling, Tanaka e Kouno (2003), o qual consiste na mistura contendo 80 U da enzima hialuronidase em 100 µL de tampão fosfato de sódio a 20 mM e 25 µL da amostra, extrato etanólico da própolis (30 mg/mL), que foi incubada a 37° C durante 20 minutos. Posteriormente, adicionou-se 100 µL de ácido hialurônico e incubou a 37° C por 45 minutos. Para iniciar a reação foi acrescentada a mistura 1 mL de solução ácida de albumina (0,1 % de albumina bovina em acetato de sódio 24 mM e ácido acético 79 mM com pH ajustado em 3,75), o que levou à precipitação do ácido hialurônico. As amostras ficaram em repouso à temperatura

por 10 minutos, e em seguida, realizou-se a leitura espectrofotométrica a 600 nm. Todos os testes foram realizados em triplicata. A atividade inibitória foi calculada pela razão percentual da absorbância da amostra versus absorbância do controle (ausência de enzima), seguindo a fórmula: Inibição (%) =  $As / Ac \times 100$ .

### **Análise estatística**

Os dados foram submetidos à Anova de fator único após verificação da não violação dos seus pressupostos e as médias comparadas pelo teste *t* de Student. Adotou-se o nível de 5% de significância em todas as análises.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O aproveitamento de produtos naturais para desenvolvimento de produtos clínicos é de suma importância por estes apresentarem em sua composição potenciais substâncias inibidoras (BIRARI; BHUTANI, 2007). Neste estudo, o uso do extrato de própolis proporcionou maior inibição da lipase pancreática (LP) com a amostra de dezembro/2013 ( $1,11 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$ ) (Tabela 1).

A obesidade é o distúrbio metabólico que mais cresce nas últimas décadas, considerada uma grande ameaça à saúde por estar associada a doenças cardíacas, hipertensão, diabetes e diferentes tipos de câncer (FINUCANE et al., 2011). A lipólise é o principal passo na digestão e absorção lipídica, inibi a ação da lipase pancreática (enzima responsável pela absorção dos triacilgliceróis na dieta) como a principal estratégia para a redução de absorção da gordura e controle de peso (JEONG et al., 2016).

Em testes “in vivo” realizados por Roquette et al. (2015) com dietas ricas em gorduras suplementadas com a própolis verde, foi observado redução da atividade da lipase em roedores. Os pesquisadores atribuem o efeito aos polifenóis presentes na própolis, por estes serem absorvidos com facilidade pelo intestino delgado. Hu et al. (2015) obtiveram inibição da PL nas concentrações de  $IC_{50}$  de 0,5 a 1,10 mg/mL com ácido cafeoilquínico e seus isômeros. Os compostos testados tiveram atuação predominante na regulação do metabolismo de gordura. Apesar dos valores de  $IC_{50}$  dos extratos de própolis testada em nosso



estudo estarem maiores que o orlistat ( $0,02 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ ), os resultados apresentados corroboram para validar o potencial da própolis como alternativa, pois os orlistat (medicamento para tratar obesidade) apresentam muitas vezes efeitos secundários intestinais desagradáveis como a esteatorréia (BIRARI; BHUTANI, 2007).

A *Diabete mellitus* é um grupo de doenças metabólicas relacionadas com estresse oxidativo e caracterizada por hiperglicemia (YUE et al., 2016). Uma opção terapêutica se dá pela diminuição da hiperglicemia pós-prandial, retardando a absorção de glicose pela inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glucosidase no trato intestinal (LOIZZO et al., 2013). Neste contexto, os resultados desse estudo apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ), com maior inibição da  $\alpha$ -amilase nas amostras de novembro/2013 a janeiro/2014 e para  $\alpha$ -glucosidase novembro/2013 (Tabela 1).

O composto Acarbose ( $54,8 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$ ) apresentou maior inibição da  $\alpha$ -amilase e resultados similares para  $\alpha$ -glucosidase. Vongsak et al. (2015) em estudo com própolis de diferentes espécies de abelhas obtiveram menor inibição da  $\alpha$ -glucosidase ( $70,8$  a  $467,66 \mu\text{g/mL}$ ) em relação ao nosso estudo. Esses pesquisadores sugerem que este efeito está possivelmente atrelado aos compostos fenólicos presentes nas própolis testadas. Os extratos de própolis analisados em nosso estudo apresentaram inibição das enzimas hidrolisadoras de carboidratos.

Outras enzimas diretamente relacionadas à doenças degenerativas são as acetilcolinesterase e butirilcolinesterase. Essas diminuem a produção ou até mesmo degradam a acetilcolina, neurotransmissores responsáveis pelo aprendizado, respostas emocionais e memória do corpo humano ocasionando o mal de Alzheimer (NARAGANI; ABIRAMI; SIDDHURAJU, 2014). Os extratos de própolis testados induziram atividade inibitória da colinesterase ( $p < 0,05$ ), com maior inibição nas amostras de dezembro/2013 ( $29,03 \pm 1,45 \mu\text{g/mL}$ ) e janeiro/2014 ( $26,03 \pm 2,05 \mu\text{g/mL}$ ) para acetilcolinesterase (AChE) e de maio/2014 a julho/2014 para butirilcolinesterase (BChE) variando de  $36,75$  a  $39,45 \mu\text{g/mL}$ . O inibidor Eserine apresentou inibição de  $0,006 \pm 0,004 \mu\text{g/mL}$  (Tabela 1).

Miguel et al. (2014) verificaram que somente 50% das amostras da própolis avaliadas apresentaram atividade de inibição da acetilcolinesterase. As amostras

apresentaram valores de IC<sub>50</sub> entre 0,043 mg/mL a 0,56 mg/mL obtendo correlação negativa ( $r = -0,873$ ) entre o teor de fenol e flavonoide. Estudos utilizando compostos fenólicos para inibição das colinesterases têm crescido nos últimos anos. Maciel et al. (2016) avaliando os efeitos neuroprotetores da quercetina em roedores com diabetes induzido, verificaram que o flavonol preveniu o aumento da atividade de AChE no córtex cerebral. Ademosun et al. (2015) observaram que a quercetina obteve melhores resultados de inibição que a rutina para ambas as enzimas. Sousa et al. (2017) obtiveram inibição na AChE de 66% e 80%, utilizando dois derivados dos kaempferol.

A enzima tirosinase está associada à doença de Parkinson (formação de espécies reativas dopamina-quininas), à hiperpigmentação da pele humana (alteração da melanogênese) e ao escurecimento de frutas e verduras (BAO et al., 2010; HAN et al., 2012). Por conseguinte, os resultados encontrados neste estudo sugerem que os extratos de própolis interagem com a enzima tirosinase ocasionando inibição da sua atividade. A máxima inibição ocorreu com as amostras de novembro/2013 a janeiro/2014 ( $p > 0,05$ ) e mínima em julho/2014. O composto referência (Acarbose) apresentou inibição de  $5,21 \pm 0,55 \mu\text{g/mL}$  (Tabela 2).

Os produtos naturais tem se apresentado como alternativa anti-tirosinase (UYSAL; AKTUMSEK, 2015). Neagu et al. (2015) em experimento com duas espécies de plantas medicinais verificaram atividade inibidora de 60 a 90,65% da tirosinase. Os autores sugeriram que os polifenóis encontrados (quercetina, rutina, ácido elágico, ácido clorogênico) nos extratos, possam ser a explicação para os valores de inibição encontrados. Bouzainde et al. (2016) observaram que a apigenina-7-glucosido e a narigenina exibiram atividade antiproliferativa contra células melanoma B16F10 e genkwanin diminuíram a atividade da tirosinase.

Os eritrócitos são bastante propícios a ataques de radicais livres por conter elevadas concentrações de ácidos graxos polinsaturados e por apresentar reação redox da hemoglobina associada com os promotores de espécies reativas de oxigênio (O<sub>2</sub>) (NAVABI et al., 2011). Portanto, a proteção de sua membrana é importante para que não ocorra o processo de lise celular. Na Tabela 2 estão expressos os efeitos dos extratos de própolis em estudo na inibição dos radicais livres em meio celular. Verificou-se que os maiores teores de inibição se deram

com as amostras de novembro/2013 a janeiro/2014 ( $p > 0,05$ ), estando todos acima de 80%.

Em estudo com própolis, Valente et al. (2011) observaram que houve proteção da membrana eritrócito da hemólise de forma dependente do tempo e da concentração (78% em 3h). Os autores correlacionam o efeito com os compostos fenólicos presentes na própolis (apigenina, pinobanksina, pinocembrina, crisina e derivados), podendo atuar como antioxidantes, extinguindo os radicais peróxido na fase aquosa antes que os radicais ataquem as biomoléculas da membrana evitando a peroxidação e hemólise.

Investigando os efeitos da própolis em células cancerosas induzidas por homocisteína, Tartik et al. (2016) observaram que mesmo em baixas doses a própolis protege as células inibindo a apoptose celular. Foi visto também que o tratamento com a própolis eliminou os radicais livres, bloqueou a peroxidação lipídica para a proteção das células de lipoproteína, restaurou significativamente a viabilidade celular e reduziu as produções de oxidantes suprimindo a toxicidade de homocisteína.

Utilizando a *Baccharis dracunculifolia* (principal fonte botânica da própolis verde brasileira) contra peroxidação lipídica em mitocôndrias isoladas do fígado de ratos, Guimarães et al. (2012) observaram ação antioxidante quanto ao estresse oxidativo causado pelo t-BuOOH nas mitocôndrias. O efeito dessa ação resultou na inibição da geração de espécies de radicais livres, a eliminação ou diminuição de peróxido de hidrogênio e a prevenção da oxidação dos grupos tiol de proteínas mitocondriais que foram associados à soma ou efeito sinérgico dos compostos presentes, principalmente o artepelin C.

Este estudo também investigou a atividade anti-inflamatória da própolis frente à enzima hialuronidase. Essa enzima promove ação deletéria ao ácido hialurônico, o qual é um polissacarídeo de carga negativa altamente sensível à oxidante (TAO et al., 2017) e que tem a função de proteger a cartilagem articular com a regeneração tecidual (SILVA et al., 2012). A partir da degradação do ácido hialurônico pela hialuronidase há um processo inflamatório que estimula o sistema de defesa (glóbulos brancos) junto com a ação de produtos químicos protege o organismo de agentes infecciosos, caso esse sistema esteja enfraquecido pode provocar a perda óssea e dores (PASCAL et al., 2014).

Nesse estudo todas as amostras de própolis apresentaram ação anti-inflamatória frente à enzima hialuronidase, sendo registrada a maior inibição para novembro/2013 (53,18%) e não foram encontradas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para as demais amostras (Tabela 2).

A atividade anti-inflamatória da própolis também foi investigada por Silva et al. (2012), com própolis portuguesa, e obtiveram resultados de inibição acima de 50% para amostras a 25 mg/mL. Pascoal et al. (2014) testaram a inibição da enzima hialuronidase por oito amostras de pólen de abelhas e seu maior resultado de inibição foi de  $25,17 \pm 3,18\%$ . Essa diferença entre os resultados supracitados e o desse estudo elucidada que entre os produtos apícolas, a própolis, tem um destaque quanto às ações anti-inflamatórias.

**Tabela 1.** Atividade de inibição enzimática (lipase,  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -Glucosidade, acetilcolinesterase, butirilcolinesterase) de extratos de própolis.

Amostras	Lipase IC50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\alpha$ -Amilase IC50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\alpha$ -Glucosidase IC50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Acetilcolinesterase IC50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Butirilcolinesterase IC50 ( $\mu\text{g/mL}$ )
nov/13	1,80 $\pm$ 0,22c	115,65 $\pm$ 5,05c	31,05 $\pm$ 3,5d	32,82 $\pm$ 1,81b	126,29 $\pm$ 5,18a
dez/13	1,11 $\pm$ 0,2d	174,37 $\pm$ 7,96c	37,07 $\pm$ 2,46c	29,03 $\pm$ 1,45c	110,66 $\pm$ 10,3b
jan/14	1,66 $\pm$ 0,38c	162,35 $\pm$ 4,88c	40,62 $\pm$ 1,67c	26,29 $\pm$ 2,05c	98,76 $\pm$ 2,75c
mai/14	3,48 $\pm$ 0,25a	259,18 $\pm$ 15,7a	63,03 $\pm$ 3,47a	36,75 $\pm$ 1,11a	36,75 $\pm$ 1,11d
jun/14	3,00 $\pm$ 0,24ab	228,99 $\pm$ 9,42b	60,62 $\pm$ 2,81a	39,45 $\pm$ 1,64a	39,45 $\pm$ 1,64d
jul/14	2,71 $\pm$ 0,43b	250,21 $\pm$ 6,44a	55,51 $\pm$ 1,91b	37,93 $\pm$ 2,66a	37,93 $\pm$ 2,66d
CV %	13,24	4,4	5,7	5,51	6,71

\*Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de *t* de Student.

**Tabela 2.** Atividade de inibição enzimática (tirosinase, anti-hemolítico e anti-inflamatória) de extratos de própolis.

Amostras	Tirosinase IC50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Anti-hemolítica (%)	Anti-inflamatória (%)
nov/13	65,62 $\pm$ 2,27c	82,65 $\pm$ 4,33a	53,18 $\pm$ 6,02a
dez/13	58,05 $\pm$ 6,35c	87,78 $\pm$ 2,51a	44,55 $\pm$ 2,94ab
jan/14	63,3 $\pm$ 2,39c	80,51 $\pm$ 3,84a	40,22 $\pm$ 2,96ab
mai/14	83,68 $\pm$ 3,57b	62,35 $\pm$ 2,94b	36,71 $\pm$ 5,26b
jun/14	88,49 $\pm$ 5,9ab	54,96 $\pm$ 4,67c	28,02 $\pm$ 1,96b
jul/14	93,19 $\pm$ 2,46a	66,22 $\pm$ 5,04b	34,15 $\pm$ 9,71b
CV %	5,56	5,52	5,5

\*Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de *t* de Student.

## CONCLUSÃO

A própolis produzida em apiários do entorno da Baía do Iguape, Bahia/Brasil apresentou potencial benéfico quanto à inibição das diferentes enzimas avaliadas, podendo ser explorado como matéria prima para elaboração de novos produtos com princípios ativos na formação de novos fármacos, principalmente relacionados à doenças degenerativas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEMOSUN, A.O.; OBOH, G.; BELLO, F.; AYENI, P.O. Antioxidative properties and effect of quercetin and its glycosylated form (rutin) on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities. **Journal Evidence-e Based Complementary Alternative Medicine**, v.21, n.4, p. 1-7, 2015.

AL-HARIRI, M.T.; ELDIN, T.A.G.; AL-HARB, M.M. Protective effect and potential mechanisms of própolis on streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Taibah University Medical Sciences**, v.11, n.1, p.7-12, 2016.

ARAÚJO, K. S. S.; JUNIOR, J. F. S.; SATO, M. O.; FINCO, F. D. B. A.; SOARES, I. M.; BARBOSA, R.S.; ALVIM, T.C.; ASCÊNICO, S.M.; MARIANO, S.M.B. Physicochemical properties and antioxidant capacity of própolis of stingless bees (Meliponinae) and *Apis* from two regions of Tocantins, Brazil. **Acta Amazonica**, v.46, n.1, p.61-68, 2016.

BAO, K.; DAI, Y.; ZHU, Z.B.; FENG-JUAN, T.; ZHENG, WG. YAO, XS. Design and synthesis of biphenyl derivatives as mushroom tyrosinase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, n.18, p. 6708–6714, 2010.

BIRARI, R.; BHUTANI, K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. **Drug Discov Today**, v.12, p.879-889, 2007.

BITTENCOURT, M.L.F.; RIBEIRO, P.R.; FRANCO, R.L.P.; HILHORST, H.W.M.; CASTRO, R.D.; FERNANDEZ, L.G. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. **Food Research International**, v.76, n.3, p.449–457, 2015.

BOUZAIENE, N.N.; CHAABANE, F.; SASSI, A.; CHEKIR-GHEDIRA, L.; GHEDIRA, K. Effect of apigenin-7-glucoside, genkwanin and naringenin on tyrosinase activity and melanin synthesis in B16F10 melanoma cells. **Life Sciences**, v.144, p.80-85, 2016.

BUENO-SILVA, B.; FRANCHIN, M.; ALVES, C.F.; DENNY, C.; COLÓN, D.F.; CUNHA, T.M.; ALENCAR, S.M.; NAPIMOGA, M.H.; ROSALEN, P.L. Main pathways of action of Brazilian red propolis on the modulation of neutrophils migration in the inflammatory process. **Phytomedicine**, v.23, n.13, p.583–1590, 2016.

CATCHPOLE, O.; MITCHELL, K.; BLOOR, E.; DAVIS, P.; SUDDER, A. Antiproliferative activity of New Zealand propolis and phenolic compounds vs human colorectal adenocarcinoma cells. **Fitoterapia**, v.106, p.167–174, 2015.

ELISSA, L.A.; ELSHERBINY, N.M.; MAGMOMAH, A.O. Propolis restored adiponectin level in type 2 diabetes through PPAR $\gamma$  activation. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**, v.2, n.4, p.318–32, 2015.

FINUCANE, M.M., STEVENS, G.A., COWAN, M.J., DANAEI, G., LIN, J.K., PACIOREK, C. J., SINGH, G.M.; GUTIERREZ, H.R.; LU, Y.; BAHALIM, A.N.; FARZADFAR, F.; RILEY, L.M.; EZZAGI, E. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. **The Lancet**, v.377, n.9765, p.557–567, 2011.

GAO, H.; HUANG, Y.N.; GAO, B. XU, P.; INAGAKI, C.; KAWABATA, J. a-Glucosidase inhibitory effect by the flower buds of *Tussilago farfara* L. **Food Chemistry**, v.106, n.3, p.1195–1201, 2008.

GUIMARÃES, N.S.S.; MELLO, J.C.; PAIVA, J.S.; BUENO, P.C.P.; BERRETTA, A.A.; TORQUATO, R.J.; NANTES, I.L.; RODRIGUES, T. *Baccharis dracunculifolia*, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p. 1091-1097, 2012.

HAN, Y.K.; PARK, Y.J.; HA, Y.M.; PARK, D.; LEE, J.Y.; LEE, N.; YOON, J.H.; MOON, H.R.; CHUNG, H.Y. Characterization of a novel tyrosinase inhibitor, (2RS,4R)-2-(2,4-dihydroxyphenyl) thiazolidine-4-carboxylic acid (MHY384), **Biochimica Biophysica Acta**, v.1820, n.4, p.542-9, 2012.

HU, B.; CUI, F., YIN, F., ZENG, X., SUN, Y., LI, Y. Caffeoylquinic acids competitively inhibit pancreatic lipase through binding to the catalytic triad. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p.529-535, 2015.

IKEDA, R.; YANAGISAWA, M.; TAKAHASHI, N.; KAWADA, T.; KUMAZAWA, S.; YAMAOTSU, N.; NAKAGOME, I.; HIRONO, S.; TSUDA, T. Brazilian propolis-derived components inhibit TNF- $\alpha$ -mediated downregulation of adiponectin expression via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, n.7, p.695–703, 2011.

JEONG, E.J.; JEGAL, J.; AHN, J.; KIM, J.; YANG, M.H. Anti obesity Effect of *Dioscorea oppositifolia* Extract in High-Fat Diet Induced Obese Mice and Its Chemical Characterization. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v.39, n.3, p.409-14, 2016.

LEWCZUK, P.; MROCZKO, B.; FAGAN, A.; KORNHUBER, J. Biomarkers of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: A current perspective. **Advances in Medical Sciences**, v. 60, n.1, p. 76-82, 2015.



LING, S.K.; TANAKA, T.; KOUNO, I. Effects of iridoids on lipoxygenase and hyaluronidase activities and their activation by beta-glucosidase in the presence of amino acids. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.26, n.3, p.352-356, 2003.

LOIZZO, M.R.; PUGLIESE, A.; BONESI, M.; DE LUCA, D.; O'BRIEN, N.; MANICHINI, F.; TUNDIS, R. Influence of drying and cooking process on the phytochemical content, antioxidant and hypoglycaemic properties of two bell *Capsicum annum* L. cultivars. **Food and Chemical Toxicology**, v.53, p.392-401, 2013.

MACHADO, B.A.S., SILVA, R.P.D., BARRETO, G.A., COSTA, S.S., SILVA, D.F., BRANDÃO, H.N., ROCHA, J.L.C., DELLAGOSTIN, O.A., HENRIQUES, J.A.P., UMSZA-GUEZ, M.A.; PADILHA, F.F. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. **Plos One**, v.8, p.1-26, 2016.

MACIEL, R.M.; CARVALHO, F.B.; OLABIYI, A.A.; SCHMATZ, R.; GUTIERRES, J.M.; STENELLO, N.; ZANINI, D.; ROSA, M.M.; ANDRADE, C.M.; RUBIN, M.A.; SCHETINGER, M.R.; MORSCH, V.M.; DANESI, C.C.; LOPES, S.T.A. Neuroprotective effects of quercetin on memory and anxiogenic-like behavior in diabetic rats: Role of ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.84, p.559-568, 2016.

MAYUR, B.; SANDESH, S.; SHRUTI, S.; SUNG-YUM, S. Antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory properties of *Carpesium abrotanoides* L. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.4, n.15, p.1547-1553, 2010.

MIGUEL, M.G.; DOUGHMI, O.; AZZA, S.; ANTUNES, D.; LYOUSSI, B. Antioxidant, anti-inflammatory and acetylcholinesterase inhibitory activities of propolis from different regions of Morocco. **Food Science Biotechnology**, v.23, n.1, p.313-322, 2014.

NABAVI, S.M.; EBRAHIMZADEH, M.A.; NABAVI, S.F., ESLAMI, B.; DEHPOUR, A.A. Antioxidant and antihemolytic activities of *Ferula foetida* regel (Umbelliferae). **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v.15, n.2, p. 157-164, 2011.

NAGARANI, G.; ABIRAMI, A.; SIDDHURAJU, P. A comparative study on antioxidant potentials, inhibitory activities against key enzymes related to metabolic syndrome, and anti-inflammatory activity of leaf extract from different *Momordica* species. **Food Science and Human Wellness**, v.3, n.1, p. 36-46, 2014.

NEAGU, E.; PAUN, G.; ALBU, C.; RADU, G.L. Assessment of acetylcholinesterase and tyrosinase inhibitory and antioxidant activity of *Alchemilla vulgaris* and *Filipendula ulmaria* extracts. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v.52, p.1–6, 2015.

NEVES, M.V.M.; SILVA, T.M.S.; LIMA, E.O.; CUNHA, E.V.L.; OLIVEIRA, E.J. Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.47, n.1, p.159–166, 2016.

ORHAN, I. E.; KHAN, M.T.H. Flavonoid derivatives as potent tyrosinase inhibitors—a survey of recent findings between 2008-2013. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.14, n.12, p.1486-1493, 2014.

PARK, Y. K., IKEGARI, M., ABREU, J. A. S., & ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.3, p.313-318, 1998.

PASCOAL, A.; RODRIGUES, S.; TEIXEIRA, A.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L.M. Biological activities of commercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. **Food and Chemical Toxicology**, v.63, p.233–239, 2014.

PROST, CATHÉRINE. Resex marinha versus polo naval na Baía do Iguape. **Novos Cadernos- NAEA**, v.13, n.1, p. 47-70, 2010.

ROH, C.; JUNG, U. Screening of crude plant extracts with anti-obesity activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, n.2, p.1710-1719, 2012.

ROQUETTO, A.R.; MONTEIRO, N.E.S.; MOURA, C.S.; TORETI, V.C.; PACE, F.; SANTOS, A.; PARK, Y.K.; AMAYA-FARFAN, J. Green propolis modulates gut microbiota, reduces endotoxemia and expression of TLR4 pathway in mice fed a high-fat diet. **Food Research International**, v.76, n.3, p.796–803, 2015.

SANCHETI, S.; SANCHETI, S.; SEO, S.Y. Evaluation of antiglycosidase and anticholinesterase activities of *Boehmeria nivea*. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.23, n.2, p.236-240, 2010.

SENOL, F.S.; ORHAN, I.; CELEP, F.; KAHRAMAN, A.; DOĞAN, M.; YILMAZ, G.; SENER, B. Survey of 55 Turkish *Salvia* taxa for their acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities. **Food Chemistry**, v.120, n.1, p.34–43, 2010.

SILVA, J.C.; RODRIGUES, S.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L.M. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of própolis. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p.1790–1795, 2012.

SOUSA, G.F.; AGUILAR, M.G.; TAKAHASHI, J.A.; ALVES, T.M.A.; KOHLHOFF, M.; FILHO, S.A.V.; SILVA, G.D.F.; DUARTE, L.P. Flavonol triglycosides of leaves from *Maytenus robusta* with acetylcholinesterase inhibition. **Phytochemistry Letters**, v.19, p. 34-38, 2017.

TAO, L.; SONG, F.; XU, N.; LI, D.; LINHARDT, R.J.; ZHANG, Z. New insights into the action of bacterial chondroitinase ac i and hyaluronidase on hyaluronic acid. **Carbohydrate Polymers**, v.158, n.20, p.85–92, 2017.

TARTIK, M.; DARENDELIOGLU, E.; AYKUTOGLU, G.; BAYDAS, G. Turkish propolis supresses MCF-7 cell death induced by homocysteine. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.82, p.704-712, 2016.

UYSAL, S.; AKTUMSEK, A. A phytochemical study on *Potentilla anatolica*: An endemic Turkish plant. **Industrial Crops and Product**, v.76, p.1001-1007, 2015.

VALENTE, M.J.; BALTAZAR, A.F.; HENRIQUE, R.; ESTEVINHO, L.; CARVALHO, M. Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth *in vitro*. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, n.1, p.86-92, 2011.

VONGSAK, B.; KONGKIATPAIBOON, S.; JAISAMUT, S.; MACHANA, S.; PATTARAPANICH, C. *In vitro* alpha glucosidase inhibition and free-radical scavenging activity of propolis from Thai stingless bees in mangosteen orchard. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.25, n.5, p.445-450, 2015.

WANG, A.; COSTELLO, S.; COCKBURN, M.; ZHANG, X.; BRONSTEIN, J.; RITZ, B. Parkinson's disease risk from ambient exposure to pesticides. **Journal Epidemiol**, v.26, n.7, p. 547-55, 2011.

YUE S, WU J, ZHANG J, LIU L, CHEN L. The relationship between betatrophin levels in blood and t2dm: a systematic review and meta-analysis. **Dis Markers**, v.2016, p.9391837, 2016.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A criação de abelhas nas comunidades do entorno da Baía do Iguape é caracterizada por ser uma atividade alternativa, que tem como principal produto de exploração o mel. As informações contidas nesse estudo trazem a própolis como uma nova alternativa de produto rendável a ser explorado pelos apicultores da região, uma vez que a produção do mel vem sofrendo queda ao longo dos anos devido ao desmatamento e o avanço da pecuária.

A própolis em estudo apresenta qualidade nutracêutica, devendo ser cada vez mais racionalmente explorada. A própolis produzida em apiários no entorno da Baía do Iguape apresentou qualidade físico-química e compostos fenólicos que propiciaram ações enzimáticas significativas demonstrando seu potencial em ações biológicas. A partir dessa experiência fica evidente que essa região é promissora na exploração desse produto. No entanto, novos experimentos visando o aumento da produção (melhoramento genético de abelhas com aptidão para a produção de própolis), detecção de plantas resiníferas e controle de qualidade devem e podem ser realizados.

Existe a possibilidade da exploração racional da própolis na região. A geração de um produto alimentar seguro, rico em compostos bioativos, poderá fortalecer a apicultura, tornando-a uma atividade economicamente viável e sustentável para os agricultores de economia familiar presentes na área de atuação desse estudo.