



Telma Filipa Garcia da Silva

Licenciatura em Bioquímica

Variação da composição química e atividade antioxidante de própolis em função da época de colheita

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Presidente de júri: Professora Doutora Benilde Mendes, Professora associada com agregação do Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Arguente: Professora Doutora Ana Lúcia Leitão, Professora auxiliar no Departamento de Ciências de Tecnologia da Biomassa da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Orientador: Professora Doutora Margarida Gonçalves, Professora auxiliar do Departamento de Ciência e Tecnologia da Biomassa da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Varição da composição química e atividade antioxidante do própolis em função da época de colheita

Copyright © Telma Filipa Garcia da Silva, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

A mim e aos meus...

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar a minha gratidão a todos aqueles que, de forma direta e indireta, contribuíram para que este projeto se tornasse uma realidade.

Em primeiro lugar, um obrigado muito especial à professora Dra. Margarida Gonçalves pela oportunidade de participar no desenvolvimento de um projeto tão interessante, pelo apoio e orientação e pelos conhecimentos cedidos ao longo deste período.

À professora Dra. Benilde Mendes pela integração no grupo de investigação e pela sua disponibilidade para ajudar.

À Catarina Nobre pela companhia nas longas tardes de trabalho, tornando tudo mais fácil e criando um ambiente de trabalho divertido, animado e que contribuiu para que os períodos de espera se tornassem suportáveis e ligeiros. Obrigado.

A todos aqueles que foram passando pelo laboratório, mesmo que por pequenos períodos, e que tornaram os dias mais animados, apenas com dois dedos de conversa.

Aos que, diariamente trabalham e se cruzam comigo e que foram animando os meus dias, me apoiando e me incentivando durante este último ano.

Aos amigos de longe e aos amigos de perto um obrigado gigante por me terem apoiado sempre, mesmo que o nosso convívio não seja possível por circunstâncias da vida. Obrigado por ralharem comigo quando mereci. Obrigado a todos aqueles que, mesmo me conhecendo pouco, me deram sempre uma palavra de força.

Por fim, e porque o melhor vem sempre no fim, à minha família. À minha irmã Ana Rita, que me “empurrou” para este projeto, que ralhou comigo quando estava mais preguiçosa, me apoiou e me motivou sempre. À minha mãe, sempre orgulhosa, que sempre me apoiou e que fez os possíveis para que eu chegasse onde cheguei hoje. À minha irmã Sara, que aturou muitas vezes o meu mau-humor dos dias menos bons. À minha avó Mariana e ao meu avô Dionísio, que sempre me “empurraram” em frente, que mostraram sempre orgulho e tiveram sempre uma palavra positiva a dar. Aos tios Paulo e Samuel, às tias Filomena e Carina e a todos os primos, um muito obrigado por todo o apoio e paciência. Obrigado pela compreensão e, acima de tudo, pelo apoio que sempre recebi. Obrigado pelo orgulho que sempre mostraram em mim e obrigado pelo “força, já está quase”. Obrigado por terem tornado tudo mais fácil e mais leve. Obrigado por acreditarem em mim e por serem, às vezes, a força que me move. Sem vocês, tudo teria sido muito mais difícil.

Um grande obrigado ao Marco por todo o apoio e paciência durante o período de escrita da tese. E acima de tudo pelo seu apoio incondicional.

Um enorme OBRIGADO a todos.

RESUMO

O própolis é uma resina natural produzida por abelhas, que permite proteger as colmeias de agentes externos que as possam colocar em perigo e contribui para a manutenção da temperatura dentro da colmeia. É uma resina que, dependendo de vários fatores como flora, temperatura e localização da colmeia, pode apresentar uma cor que pode ir do verde ao castanho avermelhado. Tem um cheiro característico, adocicado, e tanto pode ser rígida e compacta como macia e granulosa. O própolis tem sido estudado com diversos intuitos e dados já registados indicam esta resina como um forte antioxidante e antimicrobiano.

Ao longo deste trabalho foi avaliada a variação da composição química do própolis e da sua atividade antioxidante consoante a data de colheita. Foram recolhidas amostras em três datas distintas (dezembro, março e junho) de quatro apiários (Casal Álvaro, Lagoas, São Roque e Ouca) da zona do Caramulo, e de três colmeias de cada um desses apiários. Foram feitos dois extratos etanólicos de cada amostra de própolis (extratos A e B) e submeteram-se os extratos a três testes distintos: Folin-Ciocalteu, sequestração do radical DPPH e atividade redutora FRAP.

Verificou-se que, segundo os testes de Folin-Ciocalteu e FRAP, a concentração de compostos antioxidantes quase duplicou de dezembro e março para junho. Quando ao teste de DPPH, verificou-se um aumento gradual ao longo da data de colheita. Verificou-se que a composição química do própolis é variável, de acordo com a data de recolha das amostras e que o seu poder antioxidante quase duplica de dezembro e março para junho.

Os extratos brutos das amostras de própolis foram fracionados com acetato de etilo e analisados por GC-MS. Verificou-se que a composição química varia ao longo das datas de colheita, especialmente para alguns componentes. Observou-se existirem correlações entre as propriedades antioxidantes e a abundância de alguns componentes fenólicos do própolis.

É possível verificar que, devido às suas características antioxidantes, se torna cada vez mais interessante caracterizar quimicamente o própolis. A caracterização do própolis poderá levar ao desenvolvimento de novos aditivos e suplementos alimentares bem como responder a necessidades nas áreas de microbiologia e da genética, permitindo a criação de novas drogas comercializáveis para algumas patologias.

Palavras-chave: *Resina natural, atividade antioxidante, GC-MS, composição química*

ABSTRACT

Propolis is a natural resin produced by bees, for protection of the hives from hazards that may affect them and it helps to stabilize their internal temperature. It is a resin that, depending on various factors such as flora, temperature and location of the hive, can display a color that goes from green to reddish brown. It has a distinctive sweet smell and it may be steaky or grainy. Propolis has been studied for many reasons and the data available shows that this resin as strong antioxidant and antimicrobial activities.

In this work it was studied the variation of the chemical composition and antioxidant activity of propolis as a function of the harvest date. Samples were collected on three different dates (December, March and June) from four apiaries (Álvaro Casal, Lagoas, São Roque and Ouca) of Caramulo zone, and three hives of each one of these apiaries. From each sample of propolis were produced two ethanol extracts (extracts A and B) that were subjected to three different tests: total phenolic compounds by Folin-Ciocalteu test, DPPH radical sequestration and ferric reducing antioxidant power (FRAP).

For the tests of Folin-Ciocalteu and FRAP, it was found that, the concentration of antioxidant compounds active on those tests almost doubled from December or March to June. In the case of the the DPPH test, there was a gradual increase of active compounds in the extracts with the increase of the harvest date. It was verified that the chemical composition of propolis and its antioxidant activity is variable according to the date of sampling.

The crude extracts of propolis were fractionated with ethyl acetate and analyzed by GC-MS. It has been found that the chemical composition of the extracts varies along the harvest dates, particularly for some components of the extracts. Also it is possible to identify a correlation between the concentration of some of the phenolic components of the extracts and their antioxidant properties.

You can verify that, given its antioxidant characteristics, it becomes increasingly interesting to characterize chemically propolis. The characterization of propolis may lead to the development of new food additives and supplements. It may also respond to needs in the areas of microbiology and genetic engineering, namely by contributing with new and natural medicines for some diseases.

Key Words: *Natural resin, antioxidant activity, GC-MS, chemical composition*

ÍNDICE

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| AGRADECIMENTOS | V |
| RESUMO | VII |
| ABSTRACT | IX |
| ÍNDICE | XI |
| ÍNDICE DE FIGURAS | XIII |
| ÍNDICE DE TABELAS | XV |
| ABREVIATURAS | XIX |
| CAPÍTULO I – Introdução | 1 |
| Enquadramento teórico | 1 |
| 1.1. Própolis, um subproduto das colmeias | 1 |
| 1.2. Composição do própolis | 4 |
| Geral | 4 |
| Ceras | 5 |
| Terpenos | 5 |
| Compostos fenólicos | 7 |
| 1.3. Propriedades biológicas | 10 |
| Propriedades antioxidantes | 10 |
| Propriedades antimicrobianas | 11 |
| Propriedades antiproliferativas e anti-tumorais | 12 |
| Reforço do sistema imunitário | 13 |
| 1.4. Trabalho proposto | 14 |
| CAPÍTULO II – Parte Experimental | 15 |
| CAPÍTULO III – Procedimentos Experimentais | 19 |
| 3.1. Preparação de extratos brutos de própolis com diferentes solventes | 19 |
| 3.2. Preparação de extratos brutos de própolis com etanol 96% | 19 |
| 3.3. Preparação das soluções de ácido gálico | 20 |
| 3.4. Determinação do conteúdo em fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu | 20 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.5. Determinação do conteúdo em compostos fenólicos pelo método de redução do radical DPPH | 21 |
| 3.6. Determinação do poder antioxidante de ferro pelo método de FRAP | 21 |
| 3.7. Fracionamento dos extratos brutos | 22 |
| 3.8. Preparação das frações para GC-MS | 22 |
| 3.9. Análise das frações por GC-MS | 23 |
| CAPITULO IV – Apresentação e discussão de resultados | 25 |
| 4.1. Efeito do solvente na extração dos compostos antioxidantes de própolis da Mealhada | 25 |
| 4.2. Variação da atividade antioxidante do própolis, de acordo com a data de colheita | 28 |
| 4.2.1. Rendimento de Extração | 28 |
| 4.2.2. Extrato A | 32 |
| Análise geral | 32 |
| Análise de resultados, segundo a data de colheita | 41 |
| 4.2.3. Extrato B | 48 |
| Análise geral | 48 |
| Análise de resultados, segundo a data de colheita | 56 |
| 4.2.4. Comparação Extrato A vs Extrato B | 64 |
| 4.2.5. Apresentação de resultados de cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa (GC-MS) | 68 |
| CAPITULO V – Conclusões e trabalho futuro | 79 |
| CAPITULO VI – Anexos..... | 83 |
| CAPITULO VII – Bibliografia | 99 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.1 – Abelha da espécie <i>Apis mellifera</i> e colmeias de Vendas Novas (exemplo de colmeias lusitanas)..... | 1 |
| Figura 1.2 – Unidade de isopreno, com cinco carbonos – Unidade estrutural dos terpenos | 6 |
| Figura 2.1 – Localização geográfica das amostras da zona do Caramulo: 1. Lagoas (Mira), 2. São Roque (Vagos), 3. Ouca (Vagos), 4. Casal Álvaro (Águeda)..... | 17 |
| Figura 4.1 – Representação gráfica da concentração média de compostos antioxidantes (mg EAG/g) e do rendimento médio (%), em função do solvente..... | 25 |
| Figura 4.2 - Representação gráfica dos valores médios de concentração de compostos fenólicos totais (mg EAG/g) para cada apiário, para os extratos A e B..... | 59 |
| Figura 4.3 - Representação gráfica dos valores médios de concentração de compostos com capacidade de sequestração do radical DPPH (mg EAG/g) para cada apiário, para os extratos A e B das amostras recolhidas nas diferentes datas..... | 60 |
| Figura 4.4 - Representação gráfica dos valores médios de concentração de compostos com capacidade de redução férrica (mmol/g) para cada apiário, para os extratos A e B das amostras recolhidas nas diferentes datas..... | 63 |
| Figura 4.5 - Cromatograma correspondente à fração de acetato de etilo da amostra da colmeia 2 de Ouca, recolhida em Julho (cromatograma representativo das amostras de própolis analisada)..... | 63 |
| Figura 4.6 - Identificação do composto do pico 1 por comparação com um cromatograma padrão da biblioteca digital..... | 65 |
| Figura 1.7 - Identificação dos compostos dos picos 3 e 4 por comparação com cromatogramas padrão da biblioteca digital (exemplo de um composto possível)..... | 65 |
| Figura 4.8 - Identificação dos compostos dos picos 5, 6, 7 e 8 por comparação com cromatogramas padrão da biblioteca digital (sugestão de um composto possível)..... | 66 |
| Figura 4.9 - Identificação do composto do pico 10 por comparação com um cromatograma padrão da biblioteca digital..... | 67 |
| Figura 4.10 - Identificação do composto do pico 11 por comparação com um cromatograma padrão da biblioteca digital..... | 67 |
| Figura 4.11 - Identificação do composto do pico 12 por comparação com um cromatograma padrão da biblioteca..... | 68 |
| Figura 4.12 - Identificação do composto do pico 13 por comparação com um cromatograma da biblioteca..... | 68 |
| Figura 4.13 - Identificação do composto do pico 14 por comparação com um cromatograma padrão da biblioteca..... | 69 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 4.14 - Identificação do composto do pico 15 por comparação com um cromatograma padrão da biblioteca..... | 69 |
| Figura 4.15 - Identificação do composto do pico 16 por comparação com um cromatograma padrão da biblioteca..... | 70 |
| Figura 4.12 - Identificação do composto do pico 17 por comparação com um cromatograma padrão da biblioteca..... | 70 |
| Figura 4.17 - Cromatogramas representativos da variação química do própolis nas diferentes datas de colheita. Amostra da colmeia 2 do apiário de Ouca (da esquerda para a direita: dezembro, março e junho)..... | 71 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1.1 – Composição genérica do própolis..... | 4 |
| Tabela 1.2 – Unidades de isopreno, número de carbonos e respetiva classe..... | 6 |
| Tabela 1.3 – Classificação dos ácidos fenólicos | 7 |
| Tabela 1.4 – Compostos fenólicos comumente encontrados em amostras de própolis, método de deteção dos mesmos, respetiva gama de concentrações e origem das amostras..... | 9 |
| Tabela 1.5 – Composição em fenólicos totais do própolis de diferentes origens, determinado por diferentes métodos, de acordo com estudos de vários autores..... | 10 |
| Tabela 2.1 – Amostras representativas de própolis recolhido na zona do Caramulo nas diferentes datas, em cada apiário..... | 15 |
| Tabela 2.2 – Descrição das amostras: nome, origem, coordenadas geográficas, características físicas, data de colheita e modo de recolha | 16 |
| Tabela 4.1 – Quantidade de própolis utilizado por extrato, peso do resíduo seco, rendimento de extração, rendimento médio e respetivo desvio padrão, de acordo com cada solvente utilizado para a amostra A (Mealhada, Buçaco)..... | 23 |
| Tabela 4.2 – Concentração média de compostos fenólicos totais, determinada pelo método de Folin-Ciocalteu, e concentração média de compostos com atividade antiradicalar para o DPPH, para as amostras de própolis da Mealhada..... | 24 |
| Tabela 4.3 – Rendimento médio de extração (média entre extratos A e B), de acordo com a data de colheita do própolis (da zona do Caramulo), em percentagem (massa de própolis extraído/ massa de própolis total) | 26 |
| Tabela 4.4 – Rendimento médio de extração (média entre extratos A e B), de acordo com o local de recolha do própolis, em percentagem (m/m) e o respetivo desvio padrão associado | 28 |
| Tabela 4.5 – Rendimento médio de extração das três datas de colheita, de acordo com a colmeia de recolha do própolis e o respetivo desvio padrão | 29 |
| Tabela 4.6 – Concentração média de compostos fenólicos totais (mg EAG/g) para as diferentes amostras recolhidas nas diferentes datas, obtida pelo método de Folin-Ciocalteu, para o extrato A | 30 |
| Tabela 4.7 – Apresentação da média das concentrações de compostos fenólicos totais (mg EAG/g) obtidas para os extratos A, segundo o apiário de recolha | 32 |
| Tabela 4.8 – Apresentação dos valores médios de concentração de compostos fenólicos totais obtidos (mg EAG/g) para os extratos A, de acordo com a data de recolha e o respetivo desvio padrão | 32 |
| Tabela 4.9 – Concentração média (em mg EAG/g) dos compostos com capacidade de sequestração do radical DPPH para o extrato A das amostras recolhidas nas diferentes datas | 33 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 4.10 – Apresentação dos valores médios de concentração de compostos com atividade antiradicalar para o DPPH (mg EAG/g) nos extratos A, segundo o apiário de recolha do própolis | 34 |
| Tabela 4.11 – Apresentação dos valores médios de concentração de compostos com atividade antiradicalar para o DPPH (mg EAG/g) nos extratos A, de acordo com a data de recolha do própolis | 34 |
| Tabela 4.12 – Concentração média (em mM/g) de compostos com poder antioxidante de redução férrica, pelo método de FRAP, para o extrato A | 35 |
| Tabela 4.13 – Apresentação dos valores médios de concentração de compostos com capacidade de redução férrica (mM/g) nos extratos A, segundo o apiário de recolha do própolis | 36 |
| Tabela 4.14 – Apresentação dos valores médios de concentração de compostos com capacidade de redução férrica (mM/g) nos extratos A, de acordo com a data de colheita do própolis | 36 |
| Tabela 4.15 – Valores de significância, obtidos pelo ANOVA, considerando todos os dados obtidos para o extrato A | 37 |
| Tabela 4.16 – Coeficiente da correlação de Pearson entre os diferentes testes, para o extrato A | 37 |
| Tabela 4.17 – Extrato A de dezembro: Valores médios de concentração de compostos antioxidantes obtidos pelos diferentes testes e respetivo desvio padrão | 38 |
| Tabela 4.18 – Extrato A de dezembro: Valores médios de concentração de compostos antioxidantes para cada apiário de recolha de própolis e respetivo desvio padrão | 39 |
| Tabela 4.19 – Coeficiente de correlação de Pearson, entre os testes de Folin-Ciocalteu, DPPH e FRAP para o extrato A das amostras de dezembro | 39 |
| Tabela 4.20 – Extrato A de março: Valores médios de concentração de compostos antioxidantes obtidos pelos diferentes testes e respetivo desvio padrão | 40 |
| Tabela 4.21 – Extrato A de março: Valores médios de concentração de compostos antioxidantes para cada apiário de colheita do própolis e respetivo desvio padrão | 41 |
| Tabela 4.22 – Coeficiente de correlação de Pearson entre os testes de Folin-Ciocalteu, DPPH e FRAP, para o extrato A das amostras de março | 41 |
| Tabela 4.23 – Extrato A de junho: Valores médios de concentração de compostos antioxidantes obtidos pelos diferentes testes e respetivo desvio padrão | 42 |
| Tabela 4.24 – Extrato A de junho : Valores médios de concentração de compostos antioxidantes para cada apiário de colheita do própolis e respetivo desvio padrão | 43 |
| Tabela 4.25 – Coeficiente de correlação de Pearson entre os testes de Folin-Ciocalteu, DPPH e FRAP, para o extrato A das amostras de junho | 43 |
| Tabela 4.26 – Concentração média de compostos fenólicos totais (mg EAG/g) para o extrato B das amostras recolhidas nas diferentes datas, obtida pelo método de Folin-Ciocalteu | 44 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 4.27 – Apresentação da média das concentrações de compostos fenólicos totais (mg EAG/g) obtidas para os extratos B, segundo o apiário de recolha | 45 |
| Tabela 4.28 - Apresentação dos valores médios de concentração de compostos fenólicos totais (mg EAG/g) obtidos para os extratos B, de acordo com a data de recolha e o respetivo desvio padrão | 46 |
| Tabela 4.29 - Concentração média (em mg EAG/g) de compostos com capacidade de sequestração do radical DPPH, para o extrato B das amostras recolhidas nas diferentes datas | 46 |
| Tabela 4.30 – Apresentação da média da concentração de compostos com capacidade de sequestração do radical DPPH (mg EAG/g) para os extratos B, de acordo com o apiário de recolha do própolis | 48 |
| Tabela 4.31 – Apresentação da média da concentração de compostos com capacidade de sequestração do radical DPPH (mg EAG/g) para os extratos B, de acordo com a data de colheita | 48 |
| Tabela 4.32 - Concentração média (em mM/g) de compostos com capacidade de redução férrica, para os extratos B das amostras recolhidas nas diferentes datas..... | 49 |
| Tabela 4.33 - Apresentação da média da concentração de compostos com capacidade de redução férrica (mM/g) para os extratos B, de acordo com o apiário de recolha do própolis. | 50 |
| Tabela 4.34 – Apresentação da média da concentração de compostos com capacidade de redução férrica (mM/g) para os extratos B, de acordo com a data de colheita | 50 |
| Tabela 4.35 - Valores de significância, obtidos pelo ANOVA, considerando todos os dados obtidos para os extratos B | 50 |
| Tabela 4.36 - Extrato B de dezembro: Valores médios de concentração de compostos antioxidantes obtidos pelos diferentes testes e respetivo desvio padrão | 51 |
| Tabela 4.37 - Extrato A de dezembro: Valores médios de concentração de compostos antioxidantes para cada apiário de recolha de própolis e respetivo desvio padrão | 52 |
| Tabela 4.38 - Coeficiente de correlação de Pearson, entre os testes de Folin-Ciocalteu, DPPH e FRAP para o extrato B das amostras de dezembro | 53 |
| Tabela 4.39 - Extrato B de março: Valores médios de concentração de compostos antioxidantes obtidos pelos diferentes testes e respetivo desvio padrão | 53 |
| Tabela 4.40 - Extrato B de março: Valores médios de concentração de compostos antioxidantes para cada apiário de recolha de própolis e respetivo desvio padrão | 54 |
| Tabela 4.41 - Coeficiente de correlação de Pearson, entre os testes de Folin-Ciocalteu, DPPH e FRAP para o extrato B das amostras de março | 55 |
| Tabela 4.42 - Extrato B de junho: Valores médios de concentração de compostos antioxidantes obtidos pelos diferentes testes e respetivo desvio padrão | 56 |
| Tabela 4.43 - Extrato B de junho: Valores médios de concentração de compostos antioxidantes para cada apiário de recolha de própolis e respetivo desvio padrão | 57 |
| Tabela 4.44 - Coeficiente de correlação de Pearson, entre os testes de Folin-Ciocalteu, DPPH e FRAP para o extrato B das amostras de junho | 58 |

Tabela 4.45 - Compostos tentativamente identificados na fração de acetato de etilo das amostras analisadas..... 63

ABREVIATURAS

| Abreviatura | Significado |
|--------------------|----------------------------------------------|
| DPPH | <i>2,2-diphenyl-1-picrylhidrazil</i> |
| FRAP | <i>Ferric reducing antioxidant power</i> |
| mg/g | Miligrama por grama |
| kg | Quilograma |
| Ex. | Exemplo |
| GC-MS | <i>Gas chromatography-Mass Spectroscopy</i> |
| HPLC | <i>Hight Pressure Liquide Chromatography</i> |
| TPTZ | 2,4,6-tris(2-piridil)-1,3,5-triazina |
| mL | Mililitro |
| ppm | Parte por milhão |
| mM | Milimolar |
| Rpm | Rotações por minuto |
| %(v/v) | Percentagem volume soluto/volume solução |
| SPSS | <i>Software</i> de análise estatística |
| ANOVA | <i>Analysis of Variance</i> |
| EAG | Equivalentes de ácido gálico |
| Sig. | Significância |
| vs | <i>versus</i> |
| Abs | Absorvância |

Enquadramento teórico

Desde há muitos anos que se conhecem diversas características associadas ao própolis, que se podem mostrar de grande valor em diferentes áreas como a medicina, farmácia, cosmética, alimentar, etc.

Desde cremes corporais a conservantes alimentares, o própolis tornou-se numa matriz de grande interesse devido aos seus benefícios e às suas propriedades únicas em diversos estudos.

Conhecido como uma resina de aspeto e cheiro únicos, esta substância produzida por abelhas para protegerem as suas colmeias tem sido amplamente estudada de modo a que seja aplicada para diferentes fins, visto conter uma composição química única que consegue reunir moléculas orgânicas de grande interesse para os seres vivos.

Por reunir características tão singulares que torna-se importante caracterizar o própolis, de modo a poder desenvolver novas aplicações do mesmo, nomeadamente na indústria alimentar.

1.1. Própolis, um subproduto das colmeias

A palavra “própolis” é de origem grega, em que “*pro*” significa “em frente de” e “*pólis*” significa “cidade”, e traduz-se como “em frente da comunidade”, ou seja, a comunidade em primeiro lugar.



Figura 3.1 – Imagem representativa de própolis e abelha da espécie *Apis mellifera*.

O própolis (Figura 1.1) é uma resina produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera* (Figura 1.1) a partir de resinas e outros materiais ativos secretados pelas plantas ou expulsos por feridas nas mesmas (gommas, resinas, etc.) de numerosas espécies de árvores como o

choupo, bétula, pinho, amieiro, salgueiro e palma. Após a recolha desses materiais, as abelhas misturam-nos com enzimas da própria saliva (Pietta *et al*, 2002) e utilizam a resina resultante para cobrir as paredes internas da colmeia, tapar fendas e buracos, matar insetos invasores por embalsamento e envolver cadáveres das abelhas que morrem, impedindo a putrefação das mesmas (Moreira *et al*, 2008; Mello *et al*, 2009; Pietta *et al*, 2002). É o própolis que permite manter a temperatura e a assepsia da colmeia. (Castaldo *et al*, 2002; FNAP, 2010)

Ao longo de centenas de anos, o própolis tem vindo a ser utilizado como um medicamento natural. O povo egípcio conhecia bem as propriedades antissépticas desta resina e utilizava-a para embalsamar os cadáveres (Sforcin, 2007; Castaldo *et al*, 2002). Físicos gregos e romanos como Aristóteles, Dioscórides, Pliny e Galen reconheceram as suas propriedades medicinais e aplicava-se o própolis para tratar feridas ou como desinfetante bucal devido às suas propriedades antissépticas e cicatrizantes (Castaldo *et al*, 2002; Lustosa *et al*, 2008).

O própolis possui propriedades físicas variáveis, como a cor, textura e cheiro. A sua cor varia entre o verde, o vermelho e o castanho. O seu cheiro é característico: intenso e adocicado. Quanto à sua textura, o própolis demonstra propriedades adesivas, devido às fortes interações entre os óleos essenciais e as proteínas (Thirugnanasampandan *et al*, 2012). É uma substância rija e quebradiça a baixas temperaturas, mas revela-se macio, pegajoso e maleável quando está a temperaturas mais altas (Marcucci, 1994; Federação Nacional dos Apicultores de Portugal, 2010). Estas propriedades podem variar de acordo com a sua composição química, com idade do própolis, com a fauna que lhe dá origem, com o clima e com a ação enzimática que os seus constituintes sofrem durante a sua produção.

Em zonas de clima mais temperado, as abelhas recorrem ao choupo, no norte acorrem mais à bétula e na zona equatorial a plantas do género *Deschampia* (Gregoris, 2009). O própolis das zonas temperadas (Europa, América do Norte e regiões não tropicais da Ásia e da Nova Zelândia) é essencialmente produzido a partir de resinas do freixo (*Populus* spp). No norte da Rússia, a bétula (*Betula verrucosa*) é a planta mais comum. Além do freixo e da bétula, as abelhas das zonas temperadas também acorrem às coníferas (*Pinus* spp), castanheiro-da-Índia (*Aesculus hippocastanu*), todas as espécies de *Prunos* (amendoeira, damasqueiro, cerejeira, nectarina, pessegueiro ou ameixeira), salgueiro (*Salix* spp), amieiro (*Alnus* spp), quercíneas (*Quercus* spp), esteva (*Cistus* spp) e aveleira (*Corylus* spp). O própolis de zonas tropicais, como a Austrália, Brasil e outros países sul-americanos, tem origem, maioritariamente em *Acacia* spp, *Eucalyptus* spp, *Xanthorrhoea* spp e *Araucaria* spp (Falcão 2013; Federação Nacional dos Apicultores de Portugal, 2010).

Como a vegetação à qual as abelhas recorrem para recolha das resinas do própolis varia ao longo do ano (de acordo com as espécies), em países da Europa como Portugal, Espanha, Itália e Grécia a recolha é feita desde a primavera até ao início do outono. Esta época é ideal devido às temperaturas relativamente altas que tornam as resinas vegetais mais

fáceis de recolher pelas abelhas e porque há maior abundância de plantas com óleos essenciais e resinas que podem ser utilizadas na produção de própolis. Noutras zonas da Europa e zonas temperadas, a recolha apenas ocorre no verão, até início do outono. Caso o própolis não seja recolhido pelo Homem, uma colmeia gera apenas entre 50 g a 150 g. No entanto, devido às suas características únicas, criaram-se métodos que visam incentivar as abelhas a produzir mais própolis, nomeadamente a recolha do mesmo, recorrendo a malhas de plástico colocadas imediatamente abaixo da tampa da colmeia. A sua remoção fará com que as abelhas rapidamente recubram o local, de modo a manter a assepsia e segurança da colmeia. Outros métodos passam por simular a presença de invasores na colmeia (Federação Nacional dos Apicultores de Portugal, 2010).

Desde os tempos ancestrais que o própolis é utilizado para fins medicinais. Hoje sabe-se que esta substância produzida pelas abelhas tem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antibacterianas, antivirais, citotóxicas, imuno-modulatórias e anti-proliferativas, que se devem à presença de flavonóides, ácidos fenólicos e respetivos ésteres (Guo *et al*, 2011; Popova *et al*, 2010; Kalogeropoulos *et al*, 2009; Mohammadzadeh. *et al*, 2006; Valente *et al*, 2010). Alguns estudos apontam o própolis como uma substância eficiente em tratamentos médicos em humanos e animais (Dias *et al*, 2012). Atualmente, o própolis é comercializado em cápsulas (forma pura ou combinada com extratos de plantas), sob a forma de extratos (hidro-álcoolicos ou glicólicos), higienizantes orais, pastilhas para a garganta, cremes, em pó, etc. (Sforcin, 2007).

Devido às suas características únicas, o própolis é encarado como um produto de grande interesse para diversas indústrias, não só na área da medicina, mas também na indústria de aditivos alimentares, farmacêutica e cosmética, que cada vez mais procuram isolar compostos bioativos a partir de produtos naturais, por extração e purificação (Moreira *et al*, 2008). Sendo a indústria alimentar um sector de grande interesse humano, investe-se cada vez mais na pesquisa de compostos alternativos aos compostos químicos. Conhecidas as características do própolis e trabalhando no isolamento e obtenção de compostos de interesse, nomeadamente compostos fenólicos e terpénicos, poderá ser possível tornar esta substância uma fonte de inúmeros produtos de uso diário (Mello *et al*, 2009). Estudos já realizados por Dias *et al* (2012), Mohammadzadeh *et al* (2006) e Choi *et al* (2005) mostram que há, de facto, bactérias sensíveis ao própolis, nomeadamente bactérias Gram positivas no geral.

Devido às suas propriedades únicas, o própolis tem vindo a tornar-se um produto de grande interesse económico mundial, sendo que os seus maiores produtores são a Rússia, a China, os Estados Unidos da América, o Brasil e a Austrália. Na Europa, os maiores produtores desta resina são a França, a Bélgica, a Espanha, a Itália, a Alemanha e a Bulgária (Federação Nacional dos Apicultores de Portugal, 2010)

1.2. Composição do própolis

Geral

Sendo o própolis um produto das colmeias que tem despertado muito interesse científico devido às suas propriedades peculiares, são conhecidos, até à data, entre 300 e 400 constituintes do própolis, sendo que a sua composição química varia, entre outros fatores, de acordo com a variabilidade de plantas que crescem em redor da colmeia (Popova, 2010; Dias *et al*, 2012; Gómez-Caravaca *et al*, 2006).

Embora a composição química exata do própolis varie muito, este possui uma composição química geral muito semelhante, independentemente da sua origem (Miguel *et al*, 2013; Pietta *et al*, 2002), como apresentado na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 - Composição genérica do própolis (adaptado de Miguel *et al*, 2013, Pietta *et al*, 2002).

| Componente | Quantidade presente |
|----------------------------|----------------------------|
| Resinas | ≈ 50% |
| Ceras | ≈ 30% |
| Óleos essenciais | ≈ 10% |
| Pólen | ≈ 5% |
| Outras moléculas orgânicas | ≈ 5% |

Independentemente da origem, é o seu conteúdo em compostos ativos que confere as características únicas de cada tipo de própolis. Embora já tenham sido identificados muitos compostos diferentes, os perfis químicos do própolis diferem na sua composição (Popova, 2010; Sforcin, 2007) e a sua atividade biológica depende da quantidade de compostos polifenólicos, principalmente flavonóides, seguido de ácidos aromáticos, ésteres de ácidos fenólicos, terpenos, etc. (Thirugnanasampandan *et al*, 2012).

O própolis é uma matriz que não pode ser analisada no seu estado puro, pois contém muitas impurezas e a própria textura nem sempre o permite. Para tal, é necessário que as amostras de própolis sejam purificadas por extrações com solventes, de modo a remover os materiais inertes (ex.: lixos), preservando a fração fenólica e todos os restantes compostos de interesse (Volpi *et al*, 2006; Pietta, 2002).

Ceras

Representando uma fração significativa da composição geral do própolis (cerca de 30% da sua composição), as ceras são constituídas por uma mistura de resinas provenientes das plantas com ceras produzidas pelas abelhas (Salatino et al, 2011).

As ceras vegetais são uma mistura complexa de lípidos que as plantas utilizam para se proteger das perdas de água e de outros perigos do meio que as envolve. São essencialmente hidrocarbonetos, álcoois de ácidos gordos e ácidos orgânicos. Em menores quantidades possuem cetonas, álcoois secundários, dióis, aldeídos, terpenos e flavonas (Kolattukudy, 1969).

As abelhas também contribuem com uma cera própria para a composição total de ceras no própolis. As abelhas obreiras entre os 12 e os 18 dias de idade produzem, em oito glândulas cerígenas localizadas no abdômen, cerca de 0,008 gramas de cera. Com o principal objetivo de armazenamento do mel e do pólen na colmeia, desenvolvimento da criação, regulação da temperatura e discriminação dos odores, estas ceras também são uma substância que integra uma boa percentagem do própolis. Na sua composição tem hidrocarbonetos, ácidos gordos livres, monoésteres, diésteres, triésteres, derivados de ésteres e de ácidos gordos. (Manual de boas praticas na produção de cera)

Terpenos

Representando uma grande parte dos óleos essenciais, os terpenos são compostos químicos que contribuem significativamente para as características únicas do própolis. Estes compostos são encontrados em óleos essenciais de plantas no geral e contribuem para a fragância das mesmas. Considerados como moléculas naturais, os terpenos (ou terpenóides) possuem inúmeras utilizações nos dias de hoje, sendo utilizados em repelentes de insetos, inseticidas, desinfetantes, fungicidas, bactericidas, solventes e desengordurantes industriais.

Os terpenos são compostos lipídicos de fórmula geral $C_{10}H_{16}$ e desempenham um papel importante nos organismos vivos, nomeadamente a nível das membranas celulares e fisiologia das plantas (Bergamaschi, J.M.).

Os terpenos têm uma estrutura básica com um número definido de unidades isoprénicas, com cinco carbonos (Figura 1.2)

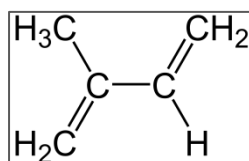


Figura 1.2 - Unidade de isopreno, com cinco carbonos - Unidade estrutural dos terpenos. (<http://temasdebioquimica.wordpress.com/2008/08/01/biosintesis-de-colesterol-iii/>)

Os principais componentes nos óleos essenciais são os monoterpenos e sesquiterpenos. Outros terpenos são mais comuns em bálsamos, resinas, ceras e borrachas. Existe uma diversidade grande de moléculas naturais como alcalóides derivados indólicos, quinonas (vitaminas K e E), vitamina A (obtida a partir do betacaroteno), fenóis e outros álcoois como terpinóis ou poliprenóis (Bergamaschi, J.M.).

Os terpenos (ou isoprenos) podem ser classificados de acordo com o número de unidades de isoprenos e o respetivo número de carbonos, como na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 - Unidade de isopreno, número de carbonos e respetiva classe.

| Terpenos | Unidades Isoprenos | Átomos de Carbono |
|-----------------|---------------------------|--------------------------|
| Monoterpenos | 2 | 10 |
| Sesquiterpenos | 3 | 15 |
| Diterpenos | 4 | 20 |
| Sesterpenos | 5 | 25 |
| Triterpenos | 6 | 30 |
| Cartenóides | 8 | 40 |

Estes óleos essenciais voláteis são aqueles que se armazenam em órgãos ou estruturas como nas flores, folhas, cascas dos caules, madeira, raízes, rizomas, frutos e sementes. Os óleos obtidos a partir das plantas podem variar de composição química, características físico-químicas e odores muito diversificados, dependendo do órgão de onde são extraídos bem como da época do ano, condições climatéricas e do solo.

Embora sejam compostos biodegradáveis pois são utilizados como substratos para alguns microrganismos, algumas destas moléculas também apresentam toxicidade contribuindo para proteção contra predadores e pragas. Alguns insetos, como as abelhas, recolhem estes óleos voláteis e utilizam-nos para proporcionar proteção das suas colónias. (Bergamaschi, J.M.)

Compostos fenólicos

A fração polifenólica é a que mais contribui para os efeitos terapêuticos desta substância natural produzida pelas abelhas (Gardana *et al*, 2006) e é a fração responsável por conferir ao própolis características antioxidantes, antivirais e anti-inflamatórias (Thirugnanasampandan *et al*, 2012; Pietta *et al*, 2002; Gómez-Caravaca *et al*, 2006).

Os compostos fenólicos são moléculas orgânicas que podem ser simples ou possuir um elevado grau de polimerização. Estão presentes nos alimentos de origem vegetal na forma livre ou ligados a proteínas ou açúcares. Estas moléculas podem dividir-se em vários grupos, de acordo com a sua abundância: pouco abundantes, polímeros e os muito abundantes (Soares, S., 2002).

No grupo dos compostos fenólicos pouco abundantes estão os fenóis simples, o catecol, a hidroquinona e o resorcinol. Podem englobar-se também nesta categoria os aldeídos derivados dos ácidos benzoicos, constituintes dos óleos essenciais que são moléculas encontradas com alguma frequência em vegetais embora em baixa concentração (Soares, S., 2002).

Os compostos fenólicos poliméricos são aqueles que não se encontram sob a forma livre nos vegetais, mas sim na forma de polímeros. A este grupo pertencem os taninos e as ligninas. Os taninos são compostos de alto peso molecular, que conferem a sensação de adstringência aos alimentos. As ligninas são polímeros complexos rígidos e de grande resistência mecânica. A hidrólise alcalina destes últimos origina uma grande quantidade de derivados de ácidos benzoico e cinâmico (Soares, S., 2002).

No grupo dos compostos fenólicos simples mais abundantes estão os flavonóides e seus derivados e ácidos fenólicos e cumarinas (Soares, S., 2002).

Os flavonóides possuem uma estrutura básica do tipo C₆-C₃-C₆, originando a maior diversidade de compostos no reino vegetal. Este grupo engloba moléculas como: antocianidinas, flavonas, flavonóis e, em menores quantidades, auronas, chalconas e isoflavonas (Soares, S., 2002).

Os ácidos fenólicos dividem-se em três subgrupos, apresentados na Tabela 1.3.

Tabela 1.3 - Classificação dos ácidos fenólicos.

| Tipo de ácido | Estrutura química |
|---------------|--------------------------------|
| Benzóico | C ₆ -C ₁ |
| Cinâmico | C ₆ -C ₃ |
| Cumarinas | Derivadas do ácido cinâmico |

Além de se apresentarem na sua forma livre, estes ácidos podem ainda conjugar-se com outros compostos.

Devido a processos de oxidação lipídica já estudados e conhecidos nos alimentos e responsáveis pela deterioração dos mesmos conferindo sabores e odores desagradáveis, a indústria alimentar tem investido na procura de compostos naturais que contrariem essa tendência e atuem como antioxidantes (Atungulu. *et al*, 2006).

No corpo humano, as espécies reativas de oxigénio são continuamente formadas pelas células, devido a processos bioquímicos e fatores externos. Quando estes radicais estão em excesso, tornam-se tóxicos para o organismo, sendo necessário eliminá-los pois a sua produção anormal pode desencadear inflamações, casos de isquemia ou presença de iões de ferro catalítico. Os antioxidantes permitem prevenir este tipo de reações adversas, neutralizando e eliminando os radicais livres formados por processos naturais no organismo (Kumazawa *et al*, 2003).

Os compostos considerados antioxidantes são todos aqueles capazes de inibir a oxidação de diversos substratos, impedindo a formação de radicais livres ou eliminando os radicais livres por doação de átomos de hidrogénio (Sousa *et al*, 2007).

Estudos científicos (Thirugnanasampandan *et al*, 2012; Sarikata *et al* 2007) mostram que os compostos fenólicos são moléculas com grande poder antioxidante pois podem funcionar como sequestrantes de radicais livres ou como quelantes de metais, atuando como inibidores de formação de radicais livres ou eliminando-os (Russo *et al*, 2004). Devido à presença de um anel aromático nos compostos fenólicos, as moléculas intermediárias originadas são relativamente estáveis por ressonância. Assim sendo, todos os compostos fenólicos e os seus derivados atuam como excelentes antioxidantes, impedindo a oxidação lipídica (Valente, 2010; Silva *et al*, 2005). No entanto, devido à toxicidade de uma grande parte destas moléculas, nem todos são permitidos pela indústria alimentar como aditivos (Soares, 2002; Mohammadzadeh *et al*, 2006).

Tabela 1.4 - Compostos fenólicos comumente encontrados em amostras de própolis, método de detecção dos mesmos, respetiva gama de concentrações e origem das amostras.

| Composto | Método de detecção | Gama de concentrações (mg/g) | Origem da amostra | Referência bibliográfica |
|---------------------------------|--------------------|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Pinocembrina | GC-MS; HPLC | 0,22 – 99,7 | Egipto, Europa, Turquia, Grécia, Chipre, Portugal, China, Argentina, Austrália, Bulgária, Hungria, EUA | Gómez-Caravaca <i>et al</i> , 2006; Guo, <i>et al</i> , 2011; Markham <i>et al</i> , 1996; Kalogeropoulos <i>et al</i> , 2009; Falcão <i>et al</i> , 2013; Pietta <i>et al</i> , 2002.; Kumazawa <i>et al</i> , 2003 |
| Galangina | GC-MS | 13,4 – 48,8 | Egipto, Europa, Turquia, China, Argentina, Austrália, Bulgária, Hungria, EUA, Chile | Gómez-Caravaca <i>et al</i> , 2006; Markham <i>et al</i> , 1996; Falcão <i>et al</i> , 2013; Pietta <i>et al</i> , 2002.; Kumazawa <i>et al</i> , 2003; Russo <i>et al</i> , 2002 |
| Crisina | GC-MS; HPLC | 0,10 – 138,6 | Egipto, Europa, Turquia, Portugal, China, Argentina, Austrália, Bulgária, Hungria, EUA | Gómez-Caravaca <i>et al</i> , 2006.; Guo, <i>et al</i> , 2011; Markham <i>et al</i> , 1996; Kalogeropoulos <i>et al</i> , 2009; Falcão <i>et al</i> , 2013; Pietta <i>et al</i> , 2002; Kumazawa <i>et al</i> , 2003 |
| Naringenina | GC-MS; HPLC | 0,07 – 12,30 | Egipto, Chipre, Grécia | Gómez-Caravaca <i>et al</i> , 2006; Guo, <i>et al</i> , 2011; Kalogeropoulos <i>et al</i> , 2009; Pietta <i>et al</i> , 2003 |
| Ácido <i>p</i>-coumárico | GC-MS; HPLC | 0,07 – 77,71 | Egipto, Turquia, Nova Zelândia, Grécia, Chipre, Portugal, China, Chile, Argentina, Austrália, Bulgária, Hungria, EUA | Gómez-Caravaca <i>et al</i> , 2006; Guo <i>et al</i> , 2011.; Kalogeropoulos <i>et al</i> , 2009; Falcão <i>et al</i> , 2002; Kumazawa <i>et al</i> , 2003; Russo <i>et al</i> , 2002 |
| Ácido cinâmico | GC-MS; HPLC | 0,04 – 10,43 | Egipto, Turquia, Nova Zelândia, Brasil, Bulgária, Chipre, Grécia, Portugal, China, Argentina, Austrália, Bulgária, Hungria, EUA | Gómez-Caravaca <i>et al</i> , 2006; Guo <i>et al</i> , 2011; Markham <i>et al</i> , 1996; Kalogeropoulos <i>et al</i> , 2009; Falcão <i>et al</i> , 2013; Pietta <i>et al</i> , 2003; Kumazawa <i>et al</i> , 2003 |
| Ácido felúrico | GC-MS; HPLC | 0,10 – 10,03 | Egipto, Turquia, Brasil, Bulgária, Grécia, Chipre, Portugal, Chile | Gómez-Caravaca <i>et al</i> , 2006; Guo <i>et al</i> , 2011; Mello <i>et al</i> , 2009; Kalogeropoulos <i>et al</i> , 2009; Falcão <i>et al</i> , 2013; Russo <i>et al</i> , 2002 |
| Catequina | HPLC | 0,06 – 24,43 | Grécia, Chipre | Guo, <i>et al</i> , 2011; Kalogeropoulos <i>et al</i> , 2009 |
| Ácido cafeico (ou ACPE*) | GC-MS; HPLC | 0,15 – 33,94 | Egipto, Turquia, Brasil, Bulgária, Portugal, China, Argentina, Austrália, Bulgária, Hungria, EUA | Gómez-Caravaca <i>et al</i> , 2006; Guo <i>et al</i> , 2011; Mello <i>et al</i> , 2009; Kalogeropoulos <i>et al</i> , 2009; Falcão <i>et al</i> , 2013; Kumazawa <i>et al</i> , 2003 |
| Ácido gálico | HPLC | 0,04 – 8,65 | Chipre, Grécia | Guo <i>et al</i> , 2011; Kalogeropoulos <i>et al</i> , 2009 |
| Quercetina | HPLC | 0,05 – 1,53 | Chipre, Grécia | Guo <i>et al</i> , 2011; Kalogeropoulos <i>et al</i> , 2009 |
| Caempferol | GC-MS; HPLC | 0,08 – 10,9 | Grécia, Chipre, Portugal, China, Argentina, Austrália, Bulgária, Hungria, EUA | Gómez-Caravaca <i>et al</i> , 2006; Guo <i>et al</i> , 2011; Kalogeropoulos <i>et al</i> , 2009; Falcão <i>et al</i> , 2013; Pietta <i>et al</i> , 2003; Kumazawa <i>et al</i> , 2003 |

*Ácido cafeico prenil éster (derivado mais comum do ácido cafeico)

Embora não seja uma tarefa fácil estabelecer uma constituição padrão do própolis, existem compostos fenólicos que estão presentes na maioria de amostras de própolis de diferentes origens (Tabela 1.4), em concentrações variáveis.

Estudos concretizados por diversos autores revelam que é possível estabelecer uma relação entre os compostos fenólicos e a qualidade do própolis. Quando uma amostra possui uma concentração total de compostos fenólicos inferior a 11%, é considerado um própolis de baixa qualidade enquanto todo o própolis que contenha mais de 17% de compostos fenólicos será classificado como própolis de boa qualidade (Gardana *et al*, 2007; Marcucci, M. *et al* (2011), Bonvehí, J.S. *et al* (2011))

1.3. PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

Propriedades antioxidantes

Como já descrito, o própolis é um produto resinoso de origem nas colmeias, rico em compostos fenólicos que lhe conferem propriedades antioxidantes.

Antioxidantes são todas as moléculas que conseguem prevenir, proteger ou reduzir a extensão dos danos oxidativos, e que estão normalmente presentes em concentrações inferiores às do substrato que poderá ser oxidado (Sousa *et al*, 2007).

Dado o grande interesse e importância deste tipo de moléculas, têm sido realizados ensaios no âmbito do estudo do poder antioxidante do própolis em diferentes amostras e por diferentes métodos. Na Tabela 1.5, estão apresentadas a origem geográfica dos extratos, o tipo de extrato utilizado, o método e a respetiva gama de resultados obtidos.

Tabela 1.5- Composição em fenólicos totais do própolis de diferentes origens, determinado por diferentes métodos, de acordo com estudos de vários autores.

| Origem geográfica | Extrato | Método | | | Referência bibliográfica |
|-------------------|------------|---------------------------------|-------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | Folin-Ciocalteu | DPPH | FRAP | |
| Brasil | Etanólico | 120 EAG ¹ | 30% ³ | 528 – 2068 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ | Kumazawa <i>et al</i> , 2003, Moreira <i>et al</i> , 2008.; Sarikaya <i>et al</i> , 2007 |
| Portugal | Metanólico | 151 – 329 EAG ¹ | 6 – 52 mg EAG ¹ /L | 0,009 – 0,055 mg/ml EC ₅₀ | Moreira <i>et al</i> , 2008 |
| China | Etanólico | 174 – 300 EAG ¹ | 80% ³ | ----- | Kumazawa <i>et al</i> , 2003 |
| | Aquoso | 10,05 – 377,25 EAG ¹ | 0,28 – 3,29 IAA ⁴ | ----- | Guo <i>et al</i> , 2011 |
| País Basco | Etanólico | 200 – 340 EAG ¹ | 19– 40 % ³ | 2,312 – 4,669 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ | Bonvehí <i>et al</i> , 2011 |
| Grécia | Etanólico | 80,2 – 338,5 EAC ² | 0,45 – 1,11 mmol Trolox/g | 2,14 – 3,35 mmol/g AAsc ⁶ | Kalogeropoulos <i>et al</i> , 2009 |

¹ EAG – Equivalentes de ácido gálico em mg/g.

² EAC – Equivalentes de ácido cafeico em mg/g

³ I – Inibição

⁴ IAA – Índice de atividade antioxidante

⁵ EC₅₀ – Concentração do extrato que inibe 50%

⁶ AAsc. – Ácido Ascórbico

Vários métodos analíticos permitem determinar quantitativamente a composição em compostos fenólicos de matrizes naturais. Os mais usuais são os métodos colorimétricos, em que é determinada a concentração deste tipo de compostos por formação de complexos com cor, a medição da respetiva absorvância e a comparação com uma reta de calibração, efetuada através da determinação da absorvância de soluções padrão de concentração conhecida. Entre os testes mais comuns encontram-se o método de Folin-Ciocalteu, método de redução do radical DPPH e de redução de ferro (FRAP).

O método de Folin-Ciocalteu é um método que envolve um reagente específico (reagente de Folin-Ciocalteu) que contém tungstato, molibdato e ácido fosfórico (Zaia *et al*, 1998). Este reagente tem uma cor amarela (forma oxidada) e, na presença de compostos fenólicos, reduz-se formando um complexo de cor azul (Roesler *et al*, 2007; Sousa *et al*, 2007). Este é um método colorimétrico, em que é medida a intensidade de cor do composto reduzido e compara-se este valor com o obtido com um padrão. As soluções variam a sua cor de amarelo para verde e depois para azul esverdeado, sendo a intensidade da cor proporcional à concentração de compostos fenólicos na amostra. A cor azul esverdeada resulta da mistura da cor amarela do reagente com a cor azul do complexo formado.

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é um radical livre estável de azoto cuja cor muda de roxo para amarelo quando este radical sofre redução, por doação de um átomo de hidrogénio ou de um eletrão, formando-se assim um complexo estável. A presença de compostos antioxidantes leva à redução deste radical e, conseqüentemente, à mudança de cor da solução. Quanto maior for a concentração de compostos antioxidantes, menos roxa será a solução pelo que a sua absorvância será menor (Falcão *et al*, 2013; Alves *et al*, 2010).

O método de FRAP, poder antioxidante de redução de ferro, mede a capacidade antioxidante de uma matriz por redução de um complexo férrico, de Fe(III)-TPZ a Fe(II)-TPZ em meio ácido. O complexo de Fe(II) tem cor azul e absorve a um comprimento de onda máximo de 593 nm (Sucupira *et al*, 2012).

Propriedades antimicrobianas

Utilizado pelas abelhas para manter a assepsia dentro das colmeias, o própolis tem sido testado devido às suas propriedades antibacterianas, diretamente relacionadas com a sua composição química e o seu teor em compostos fenólicos.

Vários testes *in vitro* têm sido realizados ao longo dos anos, para avaliar o efeito de extratos de própolis em determinadas espécies de microrganismos. *Escherichia coli* (Gram negativa), *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativa), *Staphylococcus aureus* (Gram positiva), *Staphylococcus epidermidis* (Gram positiva), *Candida albicans* (Fungo), *Bacillus*

subtilis (Gram positiva produtora de esporos) são alguns dos microrganismos já estudados para os quais o própolis apresentou atividade antimicrobiana mesmo em extratos com baixas concentrações (Silva *et al*, 2012; Mohammadzadeh *et al*, 2007; Popova *et al*, 2013; Marghitas *et al*, 2013; Marcucci, 1994).

Sendo o própolis um produto natural produzido por abelhas, estas características tornam-se relevantes do ponto de vista científico no fabrico de conservantes alimentares, medicamentos, produtos de higiene e de beleza, etc. visto atuar sobre um largo espectro de microrganismos.

Propriedades anti-proliferativas e anti-tumorais

As propriedades anti-proliferativas de alguns compostos prendem-se com o facto de atuarem sobre as células, impedindo que se multipliquem ou abrandando a sua taxa de divisão.

Dado à composição química do própolis, os extratos do mesmo têm sido estudados no sentido de explorar as suas propriedades de retardamento ou inibição de proliferação celular.

Os estudos levados a cabo assentam em dois passos distintos: isolamento dos compostos ativos do própolis e teste da ação de cada um destes na multiplicação celular, em diferentes gamas de concentração. Os testes são realizados, maioritariamente, em linhas de células cancerígenas devido à sua relevância do ponto de vista médico e os resultados são apresentados em EC_{50} , ou seja, concentração necessária para reduzir para metade a proliferação celular (Banksota *et al*, 2001; Russo 2004).

Compostos ativos como a crisina, a galangina, a pinocembrina, o ácido felúrico e o ácido cinâmico possuem capacidade antiproliferativa, sendo que o seu valor EC_{50} varia de acordo com o tipo de célula em questão (Banskota *et al*, 2001; Russo *et al*, 2004).

Essencialmente, os compostos ativos do própolis atuam como inibidores da incorporação de aminoácidos nas células cancerígenas, o que leva à inibição da síntese do ADN impedindo, deste modo, a multiplicação celular. Alguns estudos focam-se na ação de ésteres fenílicos de ácido cafeico (EFAC), que se mostram ser efetivamente citotóxicos para células virais e tumorais, por inibição dos agentes promotores de tumores e/ou por estimulação de anticorpos e ativação de macrófagos (Burdock, 1997; Lustosa *et al*, 2008).

Reforço do sistema imunitário

Partindo de um conhecimento geral de que vírus, bactérias e outros microrganismos podem debilitar o sistema imunitário do organismo hospedeiro e dadas as características

únicas do própolis, tem sido estudada a ação desta resina no fortalecimento do sistema imunitário.

Estudos sugerem que extratos de própolis podem atuar como moduladores de uma resposta imunitária não específica, por ativação de macrófagos (células de grandes dimensões existentes nos tecidos adiposos, responsáveis por processos de fagocitose). Alguns estudos demonstraram que alguns compostos do própolis aumentam a motilidade e propagação deste tipo de células, facilitando a resposta a elementos intrusos; outros relatam o decréscimo da produção de peróxido de hidrogênio por parte de macrófagos, sob ação de reduzidas concentrações de própolis (Sforcin, 2007; Lustosa *et al*, 2008).

No entanto, e devido à variabilidade química do própolis, é difícil estabelecer, com exatidão, valores de concentrações ativas. Ou seja, um extrato de própolis pode ser eficaz no aumento da resposta imunitária com uma concentração muito baixa, enquanto outro poderá apresentar o mesmo efeito apenas em concentrações mais elevadas (Hegazi, *et al*, 2001).













1.4. Trabalho proposto

Sabe-se que a localização geográfica e a época de colheita influenciam decisivamente a qualidade do própolis na medida em que condicionam as espécies vegetais disponíveis para a sua produção. O trabalho proposto no âmbito da realização desta tese foi efetuar uma caracterização química da variação da composição do própolis bem como da sua atividade antioxidante, em função da data de colheita. Para tal, foram utilizadas amostras de própolis recolhidas em quatro apiários diferentes da zona do Caramulo. Todas as amostras são originárias dos mesmos apiários, das mesmas colmeias de cada apiário e foram todas recolhidas no mesmo dia, em dezembro, março e junho. As amostras foram extraídas com solventes orgânicos e soluções aquosas para comparar a respetiva eficiência de extração de compostos fenólicos. Os extratos etanólicos foram submetidos a três testes colorimétricos diferentes, de modo a determinar a sua atividade antioxidante: quantificação dos compostos fenólicos totais (método de Folin-Ciocalteu), determinação da capacidade de sequestração do radical DPPH (atividade antiradicalar, método de DPPH) e determinação da capacidade redutora do ião ferro (atividade antioxidante, método de FRAP). Os compostos fenólicos foram isolados por extração com acetato de etilo e estas frações foram caracterizadas por cromatografia gasosa e espectrometria de massa. As diferenças significativas e as correlações entre resultados foram estatisticamente avaliadas recorrendo ao programa informático SPSS.

Amostras

Na Tabela 2.1 apresentam-se imagens ilustrativas da diferença do própolis da zona do Caramulo, nas diferentes datas de recolha (as imagens são correspondentes ao própolis recolhido da colmeia nº 2 de cada apiário).

Tabela 2.1 – Amostras representativas de própolis recolhido na zona do Caramulo nas diferentes datas, em cada apiário.

| Amostra | Dezembro | Março | Junho |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Casal Álvaro |  |  |  |
| Ouca |  |  |  |
| São Roque |  |  |  |
| Lagoas |  |  |  |

Na Tabela 2.2 apresentam-se descritas as amostras de própolis, nomeadamente a sua origem (localidade e coordenadas geográficas), características físicas e data e modo de recolha do própolis.

Tabela 2.2 - Descrição das amostras: nome, origem, coordenadas geográficas, características físicas, data de colheita e modo de recolha.

| Nome da amostra | Origem | Coordenadas geográficas | Características físicas | Data de colheita | Modo de recolha |
|------------------------|-------------------|--------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------|------------------------|
| M | Mealhada (Buçaco) | N.D. | Amarelo acastanhado, pegajoso e compacto | 04/2013 | Recolha em Tela |
| CA | Casal Álvaro | 40,583846; -8,477809 | Acastanhado, maleável e pegajoso, granuloso | 15/12/2013 16/03/2014 | Raspagem |
| | | | Vermelho, pegajoso e maleável | 25/06/2014 | |
| O | Ouça | 4,505295; -8,646552 | Amarelo acastanhado, maleável e pegajoso, arenoso | 15/12/2013 16/03/2014 | Raspagem |
| | | | Vermelho, pegajoso e maleável | 25/06/2014 | |
| SR | São Roque | 40,502405; -8,656613 | Amarelo acastanhado, maleável, pegajoso, granuloso | 15/12/2013 16/03/2014 | Raspagem |
| | | | Vermelho, pegajoso, maleável | 25/06/2014 | |
| L | Lagoas | 40,500796; -8,776366 | Castanho claro, maleável, granuloso, seco | 15/12/2013 16/03/2014 | Raspagem |
| | | | Vermelho, pegajoso, maleável | 25/06/2014 | |

3.1. Preparação de extratos brutos de própolis com diferentes solventes

A preparação dos extratos brutos foi efetuada em duas etapas distintas. Na primeira etapa, prepararam-se extratos com diferentes solventes a partir de uma única amostra de própolis de forma a comparar o efeito do solvente de extração no teor de fenólicos extraído. Em cada extração pesaram-se cerca de 5 g de própolis (anotando o valor exato) aos quais se adicionaram cerca de 100 mL de um destes solventes: etanol comercial a 96%, 80% e 70% (Panreac©) e acetona comercial pura, a 80% e 70% (Panreac©). As misturas foram tapadas de modo a evitar perdas de solvente por evaporação e colocadas no escuro à temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período, homogeneizaram-se as misturas e filtraram-se os extratos para balões volumétricos de 250 mL com papel de filtro e perfez-se o volume com o respetivo solvente. Os extratos brutos filtrados foram devidamente identificados e guardados no frio. Os resíduos resultantes da filtração dos extratos foram secos à temperatura ambiente, ainda no papel de filtro, durante cerca de 24h, após o que foram cuidadosamente raspados para frascos de plástico com tampa, previamente tarados. Os frascos foram novamente pesados com os resíduos, determinando-se a quantidade de resíduo insolúvel de cada amostra de própolis. A massa de extrato foi calculada como a diferença entre a massa inicial de própolis e a massa de resíduo insolúvel. Todos os extratos foram feitos em duplicado.

3.2. Preparação de extratos brutos de própolis com etanol 96%

Para este estudo, os extratos brutos foram preparados em três etapas distintas. Na primeira etapa, pesou-se cerca de 1 g de própolis numa balança analítica (Mettler Toledo AB204-S) para um Erlenmeyer de 50 mL, anotando-se o valor exato de massa de própolis. De seguida, adicionaram-se cerca de 30 mL de etanol 96% (Panreac©) e, com uma vareta, desfez-se o própolis o máximo possível. Taparam-se e vedaram-se os balões de modo a evitar perdas de solvente por evaporação e foram guardados no escuro à temperatura ambiente por 72 horas. Os extratos foram feitos em duplicado e designados como extrato A e extrato B.

Na segunda etapa de preparação, filtrou-se a maior parte dos extratos para balões de 50 ml e e adicionou-se ao resíduo sólido que ficou no Erlenmeyer o volume de solvente suficiente para o cobrir. Os Erlenmeyers com o resíduo foram novamente tapados e reservados por mais 24 horas no escuro à temperatura ambiente enquanto os papéis de filtro foram devidamente identificados e guardados num local seco. Os extratos filtrados, foram devidamente identificados e reservados no frio (a cerca de 4°C).

Após 24 horas, filtrou-se de novo o resíduo utilizando os mesmos papéis de filtro e tanto os Erlenmeyers como os papéis de filtro foram lavados com pequenos volumes de etanol para maximizar a recuperação dos compostos fenólicos. Combinaram-se os extratos, aferiu-se o volume com o mesmo solvente e reservaram-se os extratos no frio. Os papéis de filtro com o resíduo sólido foram guardados em local seco, à temperatura ambiente. Após estarem completamente secos, o resíduo foi raspado e foi determinada a sua massa. Tal como no caso anterior, a massa de extrato foi calculada como a diferença entre a massa inicial de própolis e a massa de resíduo insolúvel.

3.3. Preparação das soluções padrão de ácido gálico

O ácido gálico foi utilizado como padrão antioxidante para os testes de de Folin-Ciocalteu e do DPPH por ser um antioxidante natural (David *et al*, 2010). Pesaram-se 61,5 mg de ácido gálico (Sigma-Aldrich©) para um balão de 50 mL e fez-se o volume com metanol comercial (99,97%, Panreac©), obtendo-se assim a solução-mãe com a concentração de 1,23 mg/mL. A partir desta solução, fizeram-se várias diluições, obtendo-se as soluções de trabalho com as concentrações de 184,5 mg/L, 123 mg/L, 61,5 mg/L, 30,75 mg/L e 12,3 mg/L. As soluções foram devidamente identificadas e reservadas no frio.

3.4. Determinação do conteúdo em fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu

As condições de aplicação do método de Folin-Ciocalteu foram as descritas por Shinomura *et al* (2012), com algumas alterações.

Os extratos brutos foram equilibrados com a temperatura ambiente e alguns precipitados formados durante o armazenamento no frio foram removidos por filtração. Uma pequena fração do extrato filtrado foi diluída com metanol comercial, numa proporção de 1:50. Em tubos de ensaio, juntou-se 0,5 mL deste extrato diluído ou 0,5 mL de solução padrão, 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (Chem-Lab©) e 5 mL de carbonato de sódio a 2% (NaCO₃). Esta mistura foi colocada no escuro à temperatura ambiente por 30 minutos. Após este tempo, determinou-se a absorvância a 765 nm em célula de quartzo. Entre cada determinação, a célula foi lavada abundantemente com metanol. Os ensaios foram feitos em triplicado para os extratos A e B.

A concentração de compostos fenólicos foi avaliada utilizando curvas de calibração construídas com soluções padrão de ácido gálico (Anexo I), na gama de 12,3 mg/L a 184,5 mg/L e analisadas em condições idênticas às utilizadas para os extratos de própolis diluídos.

3.5. Determinação do conteúdo em compostos fenólicos pelo método de redução do radical DPPH

Para a preparação da solução mãe de DPPH (Fluka®), pesou-se cerca de 30 mg deste padrão, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL e fez-se o volume com metanol comercial obtendo-se uma solução com a concentração de cerca de 300 mg/L. A solução mãe foi reservada no frio, enrolada em papel de alumínio devido à sensibilidade do DPPH à luz e preparou-se diariamente a solução de trabalho por diluição da solução mãe, numa proporção de 1:5, obtendo-se uma solução com uma concentração aproximada de 60 mg/L. O volume de solução diluída preparado em cada dia correspondeu ao que seria necessário utilizar no total de ensaios desse dia.

O branco deste método é uma mistura de 0,5 mL de metanol com 5 mL de solução de DPPH (diluída de 1:5). Mediu-se a absorvância do branco a 517 nm.

Para a construção da recta de calibração utilizaram-se soluções padrão de ácido gálico, na gama de 12,5 mg/L a 46 mg/L (Anexo II). Em cada ensaio, juntou-se 0,5 mL de cada solução padrão com 5 mL da solução diluída de DPPH e incubou-se esta mistura no escuro à temperatura ambiente durante 15 minutos. A absorvância foi lida a 517 nm.

Para determinação da absorvância das amostras, juntou-se 0,5 mL de extrato diluído numa proporção adequada, com 5 mL da solução diluída de DPPH, incubou-se no escuro por 15 minutos à temperatura ambiente e mediu-se a absorvância ao mesmo comprimento de onda. A diluição dos extratos teve de ser constantemente ajustada às diferentes amostras devido à heterogeneidade das mesmas. Todas as determinações foram efetuadas em triplicado.

3.6. Determinação do poder antioxidante de ferro pelo método de FRAP

As soluções constituintes do reagente FRAP (poder antioxidante de redução férrica), nomeadamente o tampão acetato, a solução de cloreto de ferro e a solução ácida de TPTZ foram preparadas de acordo com o Anexo III e mantidas refrigeradas e ao abrigo da luz.

O reagente de FRAP foi preparado diariamente, a partir de 25 mL de tampão acetato, 2,5 mL de cloreto de ferro e 2,5 mL de solução ácida de TPTZ, ou múltiplos destas proporções de acordo com o volume total necessário em cada dia.

O padrão utilizado para construir a reta de calibração foi o sulfato de ferro nas concentrações de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1 mM e o branco foi preparado com metanol (Anexo IV).

Em cada ensaio adicionou-se a um tubo de ensaio 0,1 mL de solução padrão, ou de extracto ou de metanol (branco) e 3 mL de reagente de FRAP previamente aquecido em banho de água

a 37°C; a mistura foi incubada a esta temperatura durante 20 minutos após o que se mediu a absorvância a 593 nm.

Tal como no método do DPPH, a diluição dos extratos teve de ser ajustada a cada amostra, por razões de heterogeneidade. Todas as determinações foram realizadas em triplicado.

3.7. Fracionamento dos extratos brutos

Num tubo de centrífuga colocaram-se 5 mL de extrato bruto de própolis previamente equilibrado com a temperatura ambiente; adicionou-se 1 mL de hexano puro (Fisher Chemical©) e 3 mL de solução salina saturada (cloreto de sódio 99,5%, Panreac©). Agitou-se esta mistura e levou-se à centrífuga (EBA20, Hettich) por um minuto a 1000 rpm. Com uma pipeta de Pasteur, removeu-se cuidadosamente a fase superior (fase orgânica) para um tubo limpo e devidamente identificado. À fase aquosa, adicionou-se mais 1 mL de hexano, homogeneizou-se e colocou-se na centrífuga por mais um minuto a 1000 rpm. A fase superior foi novamente removida cuidadosamente para o respetivo tubo.

À fase inferior (fase aquosa) adicionou-se 1,5 mL de acetato de etilo (99,8% Fisher Chemical©) e 3 mL de solução salina saturada. Agitou-se e levou-se à centrífuga por um minuto a 1000 rpm. A fase superior foi removida para um novo tubo e devidamente identificada. À fase inferior adicionou-se 1,5 mL de acetato de etilo, levou-se à centrífuga nas mesmas condições e fez-se uma nova separação das fases. Repetiu-se este processo até o volume total de acetato de etilo ser de 4 mL.

Sempre que houve dificuldade na formação de duas fases completamente distintas com o acetato de etilo em alguns extratos, adicionou-se uma pequena quantidade de cloreto de sódio sólido, aumentando a força iónica e promovendo uma rápida separação de fases.

Os tubos contendo as fases de hexano e de acetato de etilo foram reservados no frio. A fase aquosa foi rejeitada.

3.8. Preparação das frações para GC-MS

As frações de acetato de etilo foram retiradas do frio e deixadas a equilibrar à temperatura ambiente. Após uns dias de repouso no frio, pequenas quantidades de água ainda restantes nestas frações depositaram-se no fundo do tubo. Essa fase formada por repouso foi cuidadosamente removida com pipeta de Pasteur. De modo a remover toda a água, adicionou-se sulfato de sódio anidro puro (Labsolve©) em quantidade considerável. Com o auxílio de uma proveta, mediu-se o volume final da fração de acetato de etilo. Filtrou-se (com algodão e sulfato

de sódio anidro) cerca de 2 mL para um vial do mesmo volume. Encapsulou-se e reservou-se no frio até à sua utilização.

3.9. Análise das frações por GC-MS

Os extratos de acetato de etilo foram analisados num aparelho de cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC-MS, PolarisQ e Focus GC AS 2000), equipado com uma coluna DB5-MS com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme. As amostras (2 µL) foram injetadas com um amostrador automático (AS2000), num injetor com repartição de fluxo, a 270 °C, mantendo a válvula de repartição fechada durante 2 min. A interface foi mantida a 280 °C e a fonte iónica a 240 °C.

O forno cromatográfico foi programado a 40 °C durante 1 min seguido de 4 rampas de aquecimento: até 120 °C a 20°C/min, até 160 °C a 15°C/min, até 200°C a 5°C/min e finalmente até 280 °C a 2°C/min.

Os espectros foram adquiridos em modo de corrente iónica total e a identificação dos compostos foi efectuada por comparação com as bibliotecas de espectros NIST e WILEY.

4.1. Efeito do solvente na extração dos compostos antioxidantes de própolis da Mealhada

Como ensaio preliminar e de modo a estudar o efeito dos solventes na extração dos compostos fenólicos de uma matriz de própolis (da Mealhada), procedeu-se à extração destes compostos com etanol e acetona em diferentes diluições (96%, 80% e 70% (v/v) em água). Posterior à extração, determinou-se o rendimento de extração segundo cada solvente, utilizando o resíduo sólido restante no papel de filtro, após a filtração dos extratos puros.

Tabela 4.1 – Quantidade de própolis utilizado por extrato, peso do resíduo seco, rendimento de extração, rendimento médio de extração de extração e respetivo desvio padrão, de acordo com cada solvente utilizado para a amostra A (Mealhada, Buçaco).

| Solvente | Própolis (g) | Resíduo (g) | Rendimento (%) | Rendimento médio (%) | Desvio padrão |
|-----------------|--------------|-------------|----------------|----------------------|---------------|
| Etanol 70% (1) | 5,4 | 1,1733 | 78,27 | 82,16 | 5,49 |
| Etanol 70% (2) | 5,4 | 0,7539 | 86,04 | | |
| Etanol 80% (1) | 5,5 | 0,7212 | 86,89 | 85,75 | 1,60 |
| Etanol 80% (2) | 5,5 | 0,8460 | 84,62 | | |
| Etanol 96% (1) | 5,4 | 0,6236 | 88,45 | 88,96 | 0,72 |
| Etanol 96% (2) | 5,4 | 0,5686 | 89,47 | | |
| Acetona 70% (1) | 5,6 | 0,9714 | 82,65 | 86,34 | 5,22 |
| Acetona 70% (2) | 5,7 | 0,5681 | 90,03 | | |
| Acetona 80% (1) | 5,6 | 0,5914 | 89,44 | 89,04 | 0,57 |
| Acetona 80% (2) | 5,6 | 0,6364 | 88,64 | | |
| Acetona 96% (1) | 5,5 | 0,5049 | 90,82 | 91,11 | 0,41 |
| Acetona 96% (2) | 5,5 | 0,4729 | 91,40 | | |

De acordo com os valores determinados e apresentados na Tabela 4.1, pode verificar-se que todos os solventes são eficazes na separação da fase solúvel da insolúvel (resíduo) pois os rendimentos são elevados.

Tendo em conta o rendimento médio, é possível verificar que o rendimento é mais alto quanto menor for a quantidade de água no solvente. O coeficiente de variação existente entre os valores médios do rendimento variou entre 0,45 e 6,68%.

Posteriormente à determinação dos rendimentos de extração e de modo a confirmar a extração dos compostos fenólicos do própolis e proceder à respetiva quantificação, efetuaram-se dois métodos colorimétricos distintos: quantificação dos compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu e quantificação de compostos com capacidade antiradicalar, por sequestração do radical DPPH.

Por medição da absorvância foi possível determinar a concentração dos compostos fenólicos nos extratos, através de uma reta padrão previamente efetuada a partir de soluções de ácido gálico de concentração conhecida. Cada método requereu a sua própria reta de calibração visto serem distintos, pelo que os valores determinados estão de acordo com a respetiva reta. Cada extrato foi feito em duplicado separadamente (1 e 2) e, por sua vez, cada teste foi feito em triplicado para cada extrato. O teor em compostos fenólicos totais (teste de Folin-Ciocalteu) e a concentração de compostos com atividade antiradicalar para o DPPH apresentam-se em equivalentes de ácido gálico.

Tabela 4.2 – Concentração média de compostos fenólicos totais, determinada pelo método de Folin-Ciocalteu, e concentração média de compostos com atividade antiradicalar para o DPPH, para as amostras de própolis da Mealhada.

| Solvente | Folin-Ciocalteu | | DPPH | |
|-----------------|-----------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------|
| | Concentração ¹ (mg EAG/g) | Concentração média (mg EAG/g) | Concentração ¹ (mg EAG/g) | Concentração média (mg EAG/g) |
| Etanol 70% (1) | 206,70 ± 0,55 | 184,35 ± 31,60 | 171,49 ± 1,41 | 159,52 ± 16,93 |
| Etanol 70% (2) | 162,01 ± 2,15 | | 147,55 ± 0,78 | |
| Etanol 80% (1) | 172,06 ± 0,48 | 174,85 ± 3,95 | 195,13 ± 1,60 | 199,75 ± 6,53 |
| Etanol 80% (2) | 177,65 ± 1,55 | | 204,37 ± 1,51 | |
| Etanol 96% (1) | 216,62 ± 1,48 | 215,62 ± 1,41 | 218,48 ± 0,75 | 217,67 ± 1,15 |
| Etanol 96% (2) | 214,62 ± 2,64 | | 216,85 ± 2,28 | |
| Acetona 70% (1) | 221,74 ± 1,19 | 203,65 ± 25,58 | 237,01 ± 5,46 | 214,10 ± 32,41 |
| Acetona 70% (2) | 185,56 ± 3,55 | | 191,18 ± 1,55 | |
| Acetona 80% (1) | 183,94 ± 1,00 | 188,50 ± 6,46 | 194,03 ± 1,50 | 192,69 ± 1,90 |
| Acetona 80% (2) | 193,07 ± 2,62 | | 191,34 ± 2,25 | |
| Acetona 96% (1) | 222,27 ± 2,09 | 205,02 ± 24,40 | 167,07 ± 2,28 | 165,13 ± 2,74 |
| Acetona 96% (2) | 187,77 ± 4,53 | | 163,19 ± 2,08 | |

¹Valores médios de concentração.

Embora os dois métodos aplicados permitam quantificar os compostos fenólicos existentes numa matriz, cada um dos reagentes específico de cada método interage de modo diferente com estes compostos. Dado que todas as amostras foram previamente diluídas (de igual modo) em metanol antes de qualquer um dos testes, as diferenças entre os valores assentam no solvente de extração utilizado.

Analisando os resultados obtidos para ambos os testes, é possível verificar que o solvente que permitiu extrair maior quantidade de compostos fenólicos da matriz de própolis foi o etanol a 96%, apresentando um valor médio de 215,62 mg de compostos fenólicos totais por grama de fração solúvel, pelo método de Folin-Ciocalteu e um valor médio de compostos com atividade antiradicalar de 217,67 mg por grama de fração solúvel. Sendo os extratos 1 e 2 duplicados entre si, foram considerados como um único extrato, e tem-se que o coeficiente de variação dos resultados obtidos para as amostras varia entre 0,65% (extrato de própolis em etanol a 96%) e 17,14% (extrato de própolis em etanol a 70%) para o teste de Folin-Ciocalteu e para o teste de sequestração do DPPH, o coeficiente de variação variou entre 0,53% (extrato de própolis em etanol a 96%) e 15,14% (extrato de própolis em acetona pura).

Analisando o rendimento obtido para cada solvente de extração em conjunto com os resultados obtidos para os métodos colorimétricos, é possível verificar que um rendimento mais alto não implica, necessariamente, uma maior concentração de compostos extraídos da matriz, pelo que o rendimento não está diretamente relacionado com a quantidade de compostos ativos extraídos do própolis (figura 4.1).

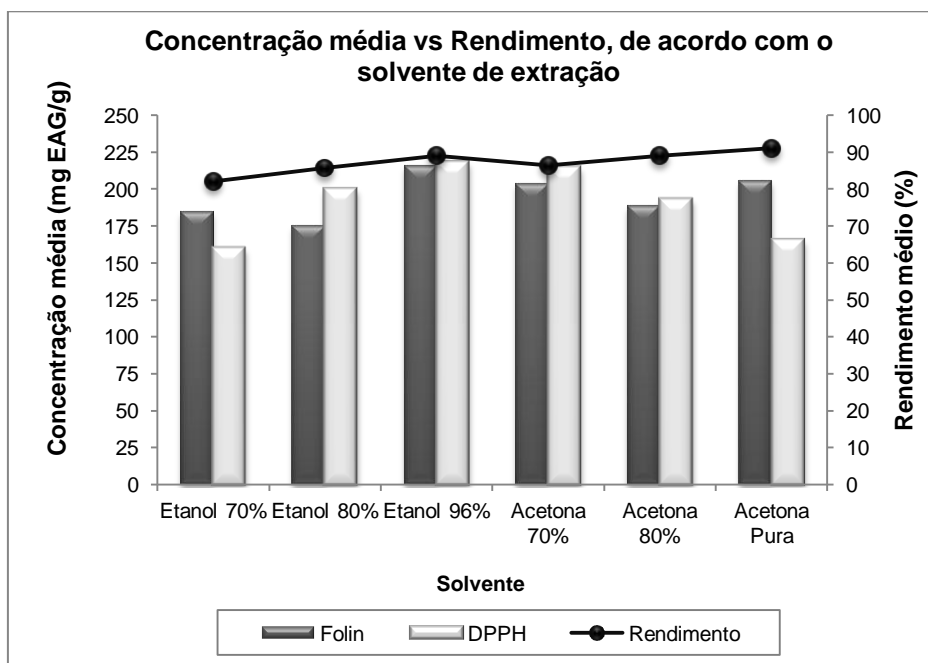


Figura 4.1 - Representação gráfica da concentração média de compostos antioxidantes (mg EAG/g) e do rendimento médio (%), em função do solvente.

4.2. Variação da atividade antioxidante do própolis, de acordo com a data de colheita

4.2.1. Rendimento de extração

O rendimento de extração é um parâmetro importante de estudo pois permite saber qual a eficácia do método de extração e permite analisar as diferenças entre as diferentes amostras de própolis. Foram feitos dois extratos de cada amostra de própolis (extrato A e B) e o rendimento apresentado na tabela 4.3 é um valor médio resultante de ambos, em percentagem massa de fração solúvel por massa de própolis.

Tabela 4.3 – Rendimento médio de extração (média entre extratos A e B), de acordo com a data de colheita do própolis (zona do Caramulo), em percentagem (massa de própolis extraído/massa própolis total).

| Apiário | Colmeia | Rendimento (%m/m) | | | | | |
|--------------|---------|------------------------|---------------|-----------------------|---------------|------------------------|---------------|
| | | 15 de Dezembro de 2013 | Desvio Padrão | 16 de Março de 2014 | Desvio Padrão | 25 de Junho de 2014 | Desvio Padrão |
| Casal Álvaro | 1 | 47,72 ^{ab} | 1,10 | 56,44 ^{cde} | 3,53 | 94,25 ^{pq} | 0,79 |
| | 2 | 59,36 ^{de} | 1,24 | 63,49 ^{ef} | 5,43 | 92,44 ^{opq} | 0,36 |
| | 3 | 59,61 ^{de} | 1,24 | 72,73 ^{hi} | 0,88 | 84,78 ^{ilmno} | 1,32 |
| Lagoas | 1 | 58,11 ^{cde} | 1,34 | 52,95 ^{bcd} | 1,94 | 74,84 ^{hi} | 1,18 |
| | 2 | 44,94 ^{ab} | 0,83 | 51,14 ^{abc} | 1,48 | 73,75 ^{hi} | 0,57 |
| | 3 | 64,01 ^{efg} | 3,80 | 52,30 ^{bcd} | 3,22 | 73,69 ^{hi} | 0,48 |
| São Roque | 1 | 63,71 ^{efg} | 1,53 | 61,81 ^{ef} | 0,16 | 85,52 ^{lmno} | 0,05 |
| | 2 | 53,42 ^{bc} | 13,49 | 78,44 ^{ijlm} | 0,16 | 86,09 ^{mno} | 0,69 |
| | 3 | 61,75 ^{ef} | 6,17 | 75,73 ^{hi} | 0,35 | 86,69 ^{nop} | 0,22 |
| Ouca | 1 | 71,61 ^{ghi} | 0,28 | 73,58 ^{hi} | 1,56 | 77,61 ^{ij} | 0,82 |
| | 2 | 79,06 ^{ijlmn} | 1,50 | 74,61 ^{hi} | 0,04 | 95,40 ^q | 0,78 |
| | 3 | 68,28 ^{fgh} | 1,50 | 77,08 ^{ij} | 0,45 | 84,22 ^{ilmno} | 0,93 |

*médias referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05)

Analisando os dados apresentados da tabela acima (tabela 4.3), verifica-se que o rendimento médio das amostras colhidas em dezembro varia entre 44,94±0,83 mg EAG/g (amostra da colmeia 2 do apiário de Lagoas) e 79,06±1,50 mg EAG/g (amostra da colmeia 2 do apiário de Ouca). Tendo em conta os valores médios do rendimento obtido para as amostras de própolis, verificaram-se diferenças significativas entre colmeias do mesmo apiário, à exceção do apiário de Ouca, em que os resultados obtidos têm semelhanças entre si. O desvio

padrão varia num intervalo de valores entre 0,28 e 13,49 mg EAG/g e o coeficiente de variação das amostras apresentou valores compreendidos entre 0,39% (da amostra de própolis da colmeia 1 do apiário de Ouca) e 25,26% (da amostra colhida da colmeia 2 do apiário de São Roque).

Relativamente às amostras de própolis recolhidas em março, o rendimento médio de extração encontra-se numa gama de valores entre $51,14 \pm 1,48\%$, da amostra da colmeia 2 do apiário de Lagoas, e $78,44 \pm 0,16\%$, da amostra da colmeia 2 de São Roque. É possível verificar que o rendimento médio de extração da amostra da colmeia 3 do apiário de Casal Álvaro é superior ao rendimento médio das outras duas colmeias do mesmo apiário. Os apiários de Lagoas e Ouca apresentam semelhança entre os respetivos valores de rendimento médio de extração. No apiário de São Roque, destaca-se a colmeia 1 com um rendimento médio de extração inferior ao das colmeias 2 e 3. Para esta data de recolha, o desvio padrão varia numa gama mais pequena de valores (entre 0,04 e 5,43). O coeficiente de variação encontra-se compreendido entre 0,06%, correspondente à amostra da colmeia 2 do apiário de Ouca, e 8,56%, correspondente à amostra da colmeia 2 do apiário de Casal Álvaro.

O rendimento médio das amostras recolhidas em junho varia entre $73,69 \pm 0,48\%$, da amostra da colmeia 3 de Lagoas, e $95,40 \pm 0,78\%$ da colmeia 2 de Ouca. Enquanto os apiários de Lagoas e São Roque apresentam valores semelhantes entre as amostras das diferentes colmeias do mesmo apiário, a colmeia 3 de Casal Álvaro apresenta um rendimento médio de extração inferior ao das restantes colmeias do mesmo local. Contudo, a colmeia 2 do apiário de Ouca destaca-se por ser a amostra que apresenta maior rendimento médio de extração, quer seja em comparação com as colmeias do mesmo apiário como em comparação com as restantes colmeias dos outros apiários. Tendo em conta as amostras colhidas em junho, o desvio padrão apresenta valores muito baixos (valores compreendidos entre 0 e 1,4) e o coeficiente de variação variou entre 0,05% (relativo à amostra da colmeia 2 de Casal Álvaro) e 1,58% (relativo à amostra da colmeia 1 de Lagoas).

Observando o conjunto global de valores médios de rendimento de extração para as três amostras dos diferentes apiários, verificou-se um aumento significativo nas amostras colhidas em junho para alguns apiários, nomeadamente Casal Álvaro e Lagoas. O apiário de São Roque apresentou um aumento gradual dos valores médios de rendimento de extração.

Tabela 4.4 - Rendimento médio de extração (média entre extratos A e B), de acordo com o local de recolha do própolis, em percentagem (m/m), e o respetivo desvio padrão associado.

| Apiário | Data de colheita | | | | | |
|--------------|--------------------|---------------|---------------------|---------------|---------------------|---------------|
| | Dezembro | Desvio padrão | Março | Desvio padrão | Junho | Desvio padrão |
| Casal Álvaro | 55,56 ^a | 6,15 | 64,22 ^{ab} | 7,87 | 90,48 ^d | 4,55 |
| Lagoas | 55,68 ^a | 8,92 | 52,14 ^a | 1,99 | 74,09 ^{bc} | 0,85 |
| São Roque | 56,53 ^a | 10,06 | 71,99 ^b | 7,86 | 86,10 ^{cd} | 0,62 |
| Ouca | 72,98 ^b | 5,03 | 75,06 ^{bc} | 1,79 | 85,74 ^{cd} | 8,07 |

*médias referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Se os dados apresentados na Tabela 4.3 forem organizados de modo a se distinguirem apenas pelas datas de colheita das amostras (Tabela 4.4), verifica-se que, para dezembro, o apiário de Casal Álvaro apresenta menor valor médio de rendimento (55,56%), considerando as três colmeias como um todo, sendo Ouca que se mantém com um maior rendimento médio de extração (72,98%), sendo significativamente diferente dos restantes apiários. O coeficiente de variação compreendeu-se entre 6,89% (apiário de Ouca) e 16,02% (apiário de Lagoas).

Para março, o rendimento médio de extração mais baixo pertence ao apiário de Lagoas e o mais alto pertence ao apiário de Ouca. O coeficiente de variação variou entre 2,37% (apiário de Ouca) e 12,25% (do apiário de Casal Álvaro).

Para junho, o apiário de Lagoas apresenta menor rendimento médio de extração enquanto o apiário de Casal Álvaro apresenta maior rendimento médio de extração. O coeficiente de variação variou entre 0,72% (do apiário de São Roque) e 9,41%, correspondente ao apiário de Ouca.

Observando a tabela 4.4, verifica-se que existe um aumento significativo no rendimento médio dos apiários de Casal Álvaro e Lagoas; o apiário de São Roque apresenta um aumento gradual do rendimento médio de extração ao longo das datas de colheita. O apiário de Ouca apresentou sempre um valor médio de rendimento de extração relativamente elevado.

Organizando os dados anteriores apenas por localização do apiário, tem-se que os apiários se apresentam, por ordem crescente de valor de rendimento médio global de extração, pela seguinte ordem: Lagoas, com 60,64%, Casal Álvaro, com 70,09%, São Roque, com 71,46% e Ouca, com 77,93%. Não existe qualquer correlação entre os apiários de Lagoas e Ouca, no entanto cada um destes se relaciona com os restantes (Casal Álvaro e São Roque). Segundo a análise estatística ANOVA, verificaram-se diferenças significativas.

Estabelecendo a média dos rendimentos de extração, de acordo com a colmeia de colheita das amostras de própolis, obtêm-se os seguintes resultados:

Tabela 4.5- Rendimento médio de extração das três datas de colheita, de acordo com a colmeia de recolha do própolis e respetivo desvio padrão.

| Apiário | Colmeia | Rendimento médio (%) | Desvio padrão |
|--------------|---------|----------------------|---------------|
| Casal Álvaro | 1 | 66,13 ^{ab} | 22,19 |
| | 2 | 71,76 ^{ab} | 16,31 |
| | 3 | 72,37 ^{ab} | 11,30 |
| Lagoas | 1 | 61,96 ^{ab} | 10,30 |
| | 2 | 56,61 ^a | 13,58 |
| | 3 | 63,34 ^{ab} | 9,82 |
| São Roque | 1 | 70,34 ^{ab} | 11,80 |
| | 2 | 72,65 ^{ab} | 20,00 |
| | 3 | 74,72 ^{ab} | 11,50 |
| Ouça | 1 | 74,24 ^{ab} | 2,86 |
| | 2 | 83,02 ^b | 9,81 |
| | 3 | 76,52 ^{ab} | 7,19 |

*médias referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Analisando os dados organizados (Tabela 4.5) segundo a colmeia de colheita da amostra de própolis (não distinguindo datas de recolha), verifica-se que a colmeia 2 de Ouça apresenta maior rendimento médio de extração sendo a colmeia 2 do apiário de Lagoas a que apresenta menor valor de rendimento médio de extração. É possível observar que todos os valores médios de rendimento de extração se correlacionam entre si, à exceção dos valores limite (inferior e superior).

O rendimento médio determinado por colmeia representa o rendimento médio que um apicultor obteria da recolha do própolis, independentemente da data em que o faria sendo que obteria um valor médio de rendimento na ordem dos 70%, qualquer que fosse a colmeia de recolha.

Como se verificou alguma variabilidade no rendimento de extração dos duplicados e na sua composição, o tratamento do conjunto de resultados referentes aos extratos A e B iria produzir conjuntos de resultados médios que poderiam não corresponder de forma adequada à composição das amostras pelo que se optou por efetuar separadamente a análise destes dois extratos de própolis.

4.2.2. Extrato A

Análise geral

A concentração de compostos fenólicos presente nas amostras de própolis analisadas foi calculada por recorrência a uma reta de calibração obtida através de soluções padrão de ácido gálico e as concentrações apresentadas são representadas em miligramas de compostos fenólicos (em equivalentes de ácido gálico) por grama de fração solúvel de própolis. Recorrendo ao *software* estatístico SPSS, foi possível estabelecer algumas relações entre os dados obtidos para o extrato A, nomeadamente entre diferentes testes, diferentes datas e diferentes apiários.

Quantificação dos compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu

Considerando todos os dados obtidos para o método de Folin-Ciocalteu, que permite determinar a concentração total em compostos fenólicos nas diferentes amostras, foram obtidos os seguintes valores médios de concentração organizados na tabela 4.6.

Tabela 4.6- Concentração média de compostos fenólicos totais (mg EAG/g) para as diferentes amostras recolhidas nas diferentes datas, obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu, para o extrato A.

| Amostra | | Folin-Ciocalteu | | | | | |
|--------------|---------|----------------------------|---------------|----------------------------|---------------|----------------------------|---------------|
| Apiário | Colmeia | 15 de Dezembro de 2013 | | 16 de Março de 2014 | | 25 de Junho de 2014 | |
| | | Concentração média* (mg/g) | Desvio padrão | Concentração média* (mg/g) | Desvio padrão | Concentração média* (mg/g) | Desvio padrão |
| Casal Álvaro | 1 | 162,64 ^{bcd} | 9,35 | 171,81 ^e | 5,76 | 306,70 ^{ghi} | 7,72 |
| | 2 | 168,15 ^{cde} | 3,15 | 167,86 ^{cde} | 7,78 | 291,67 ^g | 2,51 |
| | 3 | 167,03 ^{cde} | 18,90 | 158,66 ^{abcde} | 1,68 | 304,19 ^{gh} | 8,15 |
| Lagoas | 1 | 137,30 ^a | 10,17 | 148,63 ^{abcd} | 10,35 | 308,89 ^{ghi} | 3,75 |
| | 2 | 147,97 ^{abc} | 5,43 | 167,10 ^{cde} | 11,00 | 335,64 ^{jk} | 4,94 |
| | 3 | 174,72 ^{ef} | 10,79 | 161,15 ^{bcd} | 3,80 | 314,23 ^{hij} | 4,34 |
| São Roque | 1 | 160,45 ^{bcd} | 3,70 | 170,96 ^{de} | 6,87 | 327,40 ^{ij} | 6,60 |
| | 2 | 180,62 ^{ef} | 5,41 | 168,14 ^{cde} | 3,58 | 287,22 ^g | 3,90 |
| | 3 | 142,29 ^{ab} | 4,02 | 172,31 ^{ef} | 4,08 | 314,33 ^{hij} | 5,75 |
| Ouca | 1 | 173,65 ^{ef} | 3,84 | 166,41 ^{cde} | 6,82 | 308,01 ^{ghi} | 7,94 |
| | 2 | 168,24 ^{cde} | 6,72 | 174,89 ^{ef} | 3,75 | 352,02 ^k | 2,71 |
| | 3 | 194,34 ^f | 5,76 | 168,45 ^{cde} | 2,58 | 309,13 ^{ghi} | 1,22 |

*médis referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05)

Analisando os dados apresentados na tabela 4.6, é possível verificar que os valores das amostras colhidas em dezembro e em março apresentam alguma semelhança entre si. No entanto, os dados referentes às amostras de junho revelaram-se mais elevados e relativamente parecidos entre si, distinguindo-se muito dos dados de dezembro e março. É possível verificar que os valores determinados para as amostras de junho são significativamente diferentes dos valores determinados para as amostras colhidas em dezembro e março. Os valores da quantidade de compostos fenólicos totais determinados para dezembro e para março revelam algumas semelhanças entre si, sendo que os valores relativos a junho quase duplicam.

Relativamente aos resultados obtidos para as amostras recolhidas em dezembro, verifica-se que existem diferenças significativas na quantidade de compostos fenólicos totais entre colmeias do mesmo apiário. Os apiários de Lagoas e São Roque apresentam uma colmeia que se mostra significativamente diferente das restantes quanto à quantidade de compostos fenólicos totais. Para esta data, o coeficiente de variação está compreendido entre 3,15% (amostra da colmeia 2 do apiário de Casal Álvaro) e 18,90% (da amostra 3 do apiário de Casal Álvaro).

Observando os resultados obtidos para as amostras de março, existe correlação entre a concentração de compostos fenólicos totais determinada para as diferentes colmeias do mesmo apiário. Para esta data de colheita do própolis, o coeficiente de variação variou entre 1,68% (amostra da colmeia 3 do apiário de Casal Álvaro) e 11,00% (amostra de própolis da colmeia 2 do apiário de Lagoas).

Quanto aos valores médios de concentração de compostos fenólicos totais das amostras colhidas em junho, verificou-se que aumentaram para quase o dobro em relação às outras datas de colheita do própolis, existindo semelhanças entre os valores obtidos, quer para as colmeias do mesmo apiário, quer entre apiários. Os apiários de São Roque e Ouca mostraram resultados significativamente diferentes entre colmeias quanto à sua composição de compostos fenólicos totais. Os valores do coeficiente de variação diminuíram ligeiramente para um intervalo de valores entre 1,21% (amostra de própolis da colmeia 3 de Ouca) e 7,94% (amostra da colmeia 1 do apiário de Ouca).

De modo a determinar qual o melhor apiário de recolha de própolis no semestre considerado (de dezembro a junho), organizaram-se os dados da tabela anterior por apiário de recolha (Tabela 4.7) verificando-se que, neste período, Ouca é o apiário que contém própolis com maior concentração média de compostos fenólicos totais.

No entanto, se se agruparem os resultados médios de todas as amostras de acordo com a data de recolha é possível verificar que há diferenças significativas entre a data de colheita do própolis, sendo que em junho a matriz apresenta maior composição total em compostos fenólicos, 313,29 mg EAG/g (Tabela 4.8), tornando esta data a melhor para recolher própolis mais rico. No último caso, os desvios padrão são inferiores pois há menor dispersão entre os

dados obtidos para amostras da mesma data, embora os valores médios obtidos serem significativamente diferentes.

Tabela 4.7 - Apresentação da média das concentrações de compostos fenólicos totais obtidas (mg EAG/g) para os extratos A, segundo o apiário de recolha.

| Apiário | Concentração média* (mg EAG/g) | Desvio padrão |
|----------------|---------------------------------------|----------------------|
| Casal Álvaro | 210,97 ^a | 65,38 |
| Lagoas | 210,62 ^a | 79,78 |
| São Roque | 213,75 ^a | 70,65 |
| Ouca | 223,91 ^a | 73,00 |

*médias referenciadas com letras distintas são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Tabela 4.8 - Apresentação dos valores médios de concentração de compostos fenólicos totais obtidos (mg EAG/g) para extratos A, de acordo com a data de recolha e o respetivo desvio padrão.

| Data de recolha | Concentração média* (mg EAG/g) | Desvio padrão |
|------------------------|---------------------------------------|----------------------|
| Dezembro | 164,79 ^a | 17,24 |
| Março | 166,36 ^a | 8,72 |
| Junho | 313,29 ^b | 17,98 |

*médias referenciadas com letras distintas são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Quantificação dos compostos com atividade antiradicalar para DPPH

Considerando o segundo teste, atividade de sequestração do radical DPPH (para determinar a atividade antioxidante e antiradicalar da matriz), obtiveram-se os resultados organizados na tabela 4.9.

Tabela 4.9 - Concentração média (em mg EAG/g) dos compostos com atividade de sequestração do radical DPPH, para o extrato A das amostras recolhidas nas diferentes datas.

| Amostra | | DPPH | | | | | |
|--------------|---------|----------------------------|---------------|----------------------------|---------------|----------------------------|---------------|
| Apiário | Colmeia | 15 de Dezembro de 2013 | | 16 de Março de 2014 | | 25 de Junho de 2014 | |
| | | Concentração média* (mg/g) | Desvio padrão | Concentração média* (mg/g) | Desvio padrão | Concentração média* (mg/g) | Desvio padrão |
| Casal Álvaro | 1 | 20,99 ^{ab} | 0,39 | 52,02 ^{fgh} | 2,03 | 132,65 ^p | 1,95 |
| | 2 | 46,36 ^{efg} | 1,24 | 75,73 ^{lm} | 3,00 | 168,29 ^t | 4,76 |
| | 3 | 34,89 ^{cd} | 0,80 | 67,26 ^{ijkl} | 0,44 | 152,06 ^{qr} | 1,48 |
| Lagoas | 1 | 31,39 ^{bc} | 1,16 | 87,31 ⁿ | 0,51 | 156,44 ^{rs} | 8,01 |
| | 2 | 20,08 ^a | 0,84 | 80,36 ^{mn} | 1,65 | 134,07 ^p | 4,58 |
| | 3 | 45,62 ^{efg} | 1,51 | 86,71 ⁿ | 0,85 | 109,18 ^o | 1,30 |
| São Roque | 1 | 42,77 ^{def} | 1,33 | 70,18 ^{klm} | 1,05 | 162,38 ^{rst} | 3,00 |
| | 2 | 19,67 ^a | 0,59 | 64,53 ^{ijk} | 0,77 | 142,07 ^{pq} | 5,62 |
| | 3 | 21,94 ^{ab} | 0,88 | 66,92 ^{ikl} | 0,56 | 119,44 ^o | 5,49 |
| Ouça | 1 | 33,23 ^{cd} | 1,31 | 57,69 ^{ij} | 0,30 | 162,59 st | 6,29 |
| | 2 | 46,02 ^{efg} | 3,12 | 55,14 ^{ghi} | 1,16 | 223,03 ^v | 4,27 |
| | 3 | 38,05 ^{cde} | 0,76 | 55,25 ^{ghi} | 0,18 | 202,39 ^u | 9,01 |

*médias referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05)

Tendo em conta os dados presentes na Tabela 4.9, é possível verificar que a concentração de compostos antioxidantes (com capacidade antiradicalar) vai aumentando de dezembro para junho, sendo mais elevados na última data de colheita do própolis. É de notar que existem diferenças significativas entre colmeias do mesmo apiário.

Em relação a dezembro, a concentração de compostos antioxidantes é variável, sendo que existem colmeias com valores elevados e outras com valores mais baixos dentro do mesmo apiário. O coeficiente de variação oscilou entre 0,39% (colmeia 1 do apiário de Casal Álvaro) e 3,12% (da colmeia 2 do apiário de Ouça).

Em março, a concentração de compostos antioxidantes determinada entre colmeias do mesmo apiário já apresentam maior semelhança entre si, com a exceção do apiário de Casal Álvaro,

no qual os valores médios de concentração de compostos antirradicais são muito distintos entre colmeias. O coeficiente de variação para cada amostra variou entre 0,18% (amostra da colmeia 3 do apiário de Ouca) e 3,00% (amostra da colmeia 2 do apiário de Casal Álvaro).

Em junho, os valores da concentração de antioxidantes são superiores aos valores referentes a dezembro e março. Tal como nos casos anteriores, verificam-se diferenças significativas entre colmeias do mesmo apiário para todos os apiários. O coeficiente de variação, para as amostras colhidas em junho, variou entre 1,30% (amostra da colmeia 3 de Lagoas) e 9,01% (da amostra da colmeia 3 de Ouca).

Organizando os dados da tabela 4.9 de acordo com os apiários de recolha das amostras (Tabela 4.10), verifica-se que não existem diferenças significativas entre os diferentes apiários, pelo que qualquer um dos apiários se torna um bom local de colheita de própolis com uma quantidade relativamente elevada de compostos com atividade antirradicalar. Como esperado e devido à grande diferença da concentração de compostos antirradicais ao longo do tempo, o desvio padrão apresenta valores elevados, variando entre 44 e 74%.

Organizando os dados segundo a data em que as amostras foram recolhidas (Tabela 4.11), verifica-se que nenhuma relação pode ser estabelecida entre os valores médios de todas as amostras recolhidas em cada uma das datas. É possível, também, constatar que os valores médios de concentração vão aumentando consideravelmente de dezembro para junho. Junho revelou-se a melhor época de recolha de própolis com maior concentração de compostos antioxidantes com ação antirradicalar.

Tabela 4.10 – Apresentação dos valores médios de concentração de compostos com atividade antirradicalar para o DPPH (mg EAG/g) nos extratos A, segundo o apiário de recolha do própolis.

| Apiário | Concentração média* (mg EAG/g) | Desvio padrão |
|----------------|---------------------------------------|----------------------|
| Casal Álvaro | 83,36 ^a | 51,85 |
| Lagoas | 83,46 ^a | 44,04 |
| São Roque | 78,88 ^a | 49,38 |
| Ouca | 97,04 ^a | 73,31 |

*médias referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05)

Tabela 4.11 - Apresentação dos valores médios de concentração de compostos com atividade antioxidante para o DPPH (mg EAG/g) nos extratos A, de acordo com a data de colheita do própolis.

| Data de recolha | Concentração média* (mg EAG/g) | Desvio padrão |
|-----------------|--------------------------------|---------------|
| Dezembro | 33,42 ^a | 10,38 |
| Março | 68,26 ^b | 11,92 |
| Junho | 155,38 ^c | 31,88 |

*médias referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Quantificação de compostos com poder antioxidante de redução férrica (FRAP)

Foi realizado um terceiro teste aos extratos A, que permitiu quantificar a concentração de compostos com atividade antioxidante por redução do ião ferro.

Tabela 4.12 – Concentração média (mmol/g) de compostos com poder antioxidante de redução férrica, pelo método de FRAP, para os extratos A das amostras recolhidas nas diferentes datas.

| Amostra | | FRAP | | | | | |
|--------------|---------|------------------------------|---------------|------------------------------|---------------|------------------------------|---------------|
| Apiário | Colmeia | 15 de dezembro de 2013 | | 16 de março de 2014 | | 25 de junho de 2014 | |
| | | Concentração média* (mmol/g) | Desvio padrão | Concentração média* (mmol/g) | Desvio padrão | Concentração média* (mmol/g) | Desvio padrão |
| Casal Álvaro | 1 | 3,71 ^m | 0,03 | 2,07 ^{cde} | 0,20 | 5,33 ^{op} | 0,18 |
| | 2 | 3,55 ^{lm} | 0,16 | 2,25 ^{cde} | 0,10 | 4,34 ⁿ | 0,13 |
| | 3 | 2,76 ^{gh} | 0,07 | 2,27 ^{cde} | 0,17 | 5,00 ^o | 0,03 |
| Lagoas | 1 | 2,44 ^{efg} | 0,03 | 1,99 ^{bcd} | 0,17 | 3,74 ^m | 0,08 |
| | 2 | 2,86 ^{ghi} | 0,18 | 2,38 ^{def} | 0,10 | 3,62 ^{lm} | 0,05 |
| | 3 | 3,26 ^{ijl} | 0,25 | 3,02 ^{hij} | 0,03 | 3,42 ^{ilm} | 0,06 |
| São Roque | 1 | 2,18 ^{cde} | 0,04 | 2,21 ^{cde} | 0,17 | 6,21 ^q | 0,16 |
| | 2 | 1,94 ^{bcd} | 0,22 | 2,04 ^{bcd} | 0,15 | 5,61 ^p | 0,11 |
| | 3 | 1,29 ^a | 0,13 | 2,27 ^{cde} | 0,12 | 5,56 ^p | 0,05 |
| Ouça | 1 | 2,28 ^{cde} | 0,04 | 1,84 ^{bc} | 0,08 | 6,39 ^q | 0,24 |
| | 2 | 2,73 ^{gh} | 0,06 | 1,63 ^{ab} | 0,08 | 5,25 ^{op} | 0,22 |
| | 3 | 2,07 ^{cde} | 0,08 | 2,29 ^{de} | 0,17 | 6,51 ^q | 0,07 |

*médias referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Observando os valores apresentados na tabela 4.12, é possível verificar que existe alguma dispersão dos resultados obtidos entre colmeias do mesmo apiário. Observou-se que, para as amostras colhidas em dezembro, a concentração média de compostos com atividade

antioxidante variou entre 1,29 mmol/g e 3,71 mmol/g, sendo que o coeficiente de variação oscilou entre 0,81% (amostra da colmeia 1 de Casal Álvaro) e 11,33% (amostra da colmeia 2 do apiário de São Roque).

Relativamente às amostras colhidas em março, algumas apresentaram decréscimo da concentração de compostos antioxidantes, comparativamente com as respetivas amostras colhidas em dezembro. Contudo, existe maior dispersão dos resultados obtidos para as amostras desta data. O coeficiente de variação compreendeu-se entre 0,99% (amostra da colmeia 3 de Lagoas) e 9,67% (amostra da colmeia 1 de Casal Álvaro).

Quanto às amostras de junho, verificou-se um aumento significativo da concentração de compostos antioxidantes em relação às duas datas anteriores de colheita de própolis. As amostras de própolis provenientes do apiário de Lagoas foram aquelas que apresentaram menor aumento, sendo que as amostras dos restantes apiários quase duplicaram para esta data. Para este conjunto de amostras, o coeficiente de variação situou-se em valores entre 0,61% (amostra da colmeia 3 de Casal Álvaro) e 4,18% (amostra da colmeia 2 de Ouca).

Organizando os valores da tabela anterior segundo os apiários de recolha das amostras de própolis, é possível verificar que, pelo teste de FRAP, a concentração média de compostos redutores do ião ferro é semelhante entre apiários pois os valores obtidos são muito próximos entre si (tabela 4.13), mostrando que qualquer um dos apiários é um bom local de colheita de própolis com compostos com capacidade redutora de ferro. Organizado os dados acima apresentados segundo a data de recolha dos mesmos (sem distinção de apiários), verificou-se que junho se destaca das outras datas de recolha do própolis, apresentando um valor de concentração média de compostos antioxidantes de quase o dobro dos restantes, tornando-se a melhor data de colheita de própolis.

Tabela 4.13 – Apresentação dos valores médios de concentração de compostos com capacidade de redução férrica (mmol/g) nos extratos A, segundo o apiário de recolha de própolis.

| Apiário | Concentração média* (mmol/g) | Desvio Padrão |
|----------------|-------------------------------------|----------------------|
| Casal Álvaro | 3,48 ^a | 1,18 |
| Lagoas | 2,97 ^a | 0,59 |
| São Roque | 3,26 ^a | 1,86 |
| Ouca | 3,44 ^a | 1,93 |

*médias referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05)

Tabela 4.14 - Apresentação dos valores médios de concentração de compostos com capacidade de redução férrica (mmol/g) nos extratos A, de acordo com a data de colheita do própolis.

| Data de recolha | Concentração média* (mmol/g) | Desvio padrão |
|-----------------|------------------------------|---------------|
| Dezembro | 2,59 ^a | 0,69 |
| Março | 2,19 ^a | 0,35 |
| Junho | 5,08 ^b | 1,06 |

*médias referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Analisando os dados obtidos para o extrato A em conjunto (data de recolha, apiários, colmeias), é possível verificar através do ANOVA (Tabela 4.15) que existem diferenças significativas entre os grupos. No entanto, analisando de acordo com o apiário, verifica-se que não há diferenças significativas entre grupos para o teste de Folin e FRAP mas que há para o teste do DPPH. Quando organizados segundo datas de recolha, verifica-se que há, de facto, diferenças significativas, como constatado anteriormente.

Tabela 4.15 - Valores de significância, obtidos pelo ANOVA, considerando todos os dados obtidos para os extratos A.

| Grupos | Teste de Folin (sig.) | Teste do DPPH (sig.) | Teste do FRAP (sig.) |
|-----------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| Todos os dados | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Apiário | 0,282 | 0,021 | 0,585 |
| Data de recolha | 0,000 | 0,000 | 0,000 |

Observando o conjunto de resultados analisado até agora, é possível estabelecer relações entre os testes realizados. Considerando apenas os valores da correlação de Pearson superiores a 0,6 (sendo 0,6 a 0,9 classificado como correlação forte e 0,9 a 1 como correlação muito forte), verifica-se que os testes possuem uma correlação forte entre si.

Tabela 4.16 - Coeficiente da correlação de Pearson entre os diferentes testes, para os extratos A.

| | | Folin | DPPH | FRAP |
|--------------|-----------------|--------------|--------------|--------------|
| Folin | Valor | 1 | 0,891 | 0,885 |
| | Sig. (2-tailed) | | 0,000 | 0,000 |
| DPPH | Valor | | 1 | 0,765 |
| | Sig. (2-tailed) | | | 0,000 |
| FRAP | Valor | | | 1 |
| | Sig. (2-tailed) | | | |

A heterogeneidade dos resultados obtidos, quer entre localizações quer entre apiários e colmeias, demonstra a heterogeneidade do própolis.

Análise de resultados, segundo a data de colheita do própolis

Dezembro

Tomou-se como grupo de análise estatística apenas os dados referentes às amostras de própolis recolhidas em dezembro, nos quatro apiários (três colmeias de cada apiário). Na tabela 4.17 apresentam-se os valores de concentração médios, obtidos para as amostras de própolis colhidas em dezembro.

Tabela 4.17 – Extrato A de dezembro: Valores médios da concentração de compostos antioxidantes, obtidos pelos diferentes testes e respetivo desvio padrão.

| Apiário | Colmeia | Teste | | | | | |
|--------------|---------|----------------------------|---------------|----------------------------|---------------|------------------------------|---------------|
| | | Folin | | DPPH | | FRAP | |
| | | Concentração média* (mg/g) | Desvio padrão | Concentração média* (mg/g) | Desvio padrão | Concentração média* (mmol/g) | Desvio padrão |
| Casal Álvaro | 1 | 162,64 ^{bcd} | 9,35 | 20,99 ^a | 0,390 | 3,71 ^g | 0,03 |
| | 2 | 168,16 ^{cd} | 3,15 | 46,36 ^d | 1,24 | 3,55 ^{fg} | 0,16 |
| | 3 | 167,03 ^{bcd} | 18,91 | 34,89 ^{bc} | 0,80 | 2,76 ^{de} | 0,07 |
| Lagoas | 1 | 137,30 ^a | 10,17 | 31,39 ^b | 1,16 | 2,44 ^{cd} | 0,03 |
| | 2 | 147,97 ^{abc} | 5,43 | 20,08 ^a | 0,84 | 2,86 ^e | 0,18 |
| | 3 | 174,72 ^{de} | 10,79 | 45,62 ^d | 1,51 | 3,26 ^f | 0,25 |
| São Roque | 1 | 160,45 ^{abcd} | 3,69 | 42,77 ^d | 1,33 | 2,18 ^{bc} | 0,04 |
| | 2 | 180,62 ^{de} | 5,41 | 19,67 ^a | 0,59 | 1,94 ^b | 0,22 |
| | 3 | 142,29 ^{ab} | 4,02 | 21,94 ^a | 0,88 | 1,29 ^a | 0,13 |
| Ouça | 1 | 173,65 ^{de} | 3,84 | 33,23 ^b | 1,31 | 2,28 ^{bc} | 0,04 |
| | 2 | 168,24 ^{cd} | 6,72 | 46,02 ^d | 3,12 | 2,73 ^{de} | 0,06 |
| | 3 | 194,34 ^e | 5,76 | 38,05 ^c | 0,76 | 2,07 ^{bc} | 0,08 |

*médias referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Analisando os dados é possível verificar que não há grande dispersão dos valores médios dentro do mesmo teste, para todas as amostras recolhidas. No teste de Folin-Ciocalteu, destacam-se (por excesso) as colmeias 3 ($194,34 \pm 5,76$ mg EAG/g) do apiário de Ouça e colmeia 2 ($180,62 \pm 5,41$ mg EAG/g) do apiário de São Roque; no teste de sequestração do radical DPPH há destaque para a colmeia 2 ($46,36 \pm 1,24$ mg EAG/g) de Casal Álvaro, colmeia 3 ($45,62 \pm 1,51$ mg/g) de Lagoas e colmeia 2 ($46,02 \pm 3,12$ mg EAG/g) de Ouça; no teste do FRAP,

destaque para as colmeias 1 ($3,71 \pm 0,02$ mmol/g) e 2 ($3,55 \pm 0,09$ mmol/g) de Casal Álvaro e para a colmeia 3 ($3,26 \pm 0,15$ mmol/g) de Lagoas. Segundo a análise ANOVA, verificam-se diferenças significativas entre o grupo de dados selecionado. À exceção do apiário de Casal Álvaro, todos os outros apiários revelaram uma amostra significativamente diferente das restantes.

É notável o comportamento dos compostos para cada teste. Enquanto os valores se mantiveram sem grandes dispersões para os métodos de Folin-Ciocalteu e FRAP, o teste de atividade antiradicalar para o DPPH revelou oscilações grandes entre os valores de concentração média das diferentes colmeias.

Para o extrato A das amostras recolhidas em dezembro, podem comparar-se as concentrações médias de cada apiário. De acordo com a tabela 4.18, para o teste de Folin, o apiário de Ouca continua a apresentar maior concentração média de compostos fenólicos totais. O teste do radical DPPH confirma as conclusões obtidas no teste de Folin, em que o apiário de Ouca apresenta, em média, valores mais elevados. Para o teste de FRAP, o apiário de Casal Álvaro destacou-se com o maior valor médio de concentração. Assim sendo, o própolis do apiário de Ouca mostrou-se mais rico em compostos antioxidantes, sendo um bom local de colheita desta resina no mês de dezembro (inverno).

Tabela 4.18 – Extrato A de dezembro: Valores médios de concentração de compostos antioxidantes, para cada apiário de recolha do própolis e respetivo desvio padrão.

| Apiário | Teste | | | | | |
|--------------|-------------------------------|---------------|-------------------------------|---------------|---------------------------|---------------|
| | Folin* | | DPPH* | | FRAP* | |
| | Concentração média (mg EAG/g) | Desvio padrão | Concentração média (mg EAG/g) | Desvio padrão | Concentração média (mM/g) | Desvio padrão |
| Casal Álvaro | 165,94 ^{ab} | 10,96 | 34,08 ^a | 11,03 | 3,34 ^c | 0,45 |
| Lagoas | 153,33 ^a | 18,47 | 32,36 ^a | 11,13 | 2,85 ^{bc} | 0,39 |
| São Roque | 161,12 ^{ab} | 17,04 | 28,13 ^a | 11,06 | 1,80 ^a | 0,42 |
| Ouca | 178,74 ^b | 12,86 | 39,10 ^a | 5,86 | 2,36 ^b | 0,30 |

*médias referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Tendo em conta o coeficiente de correlação de Pearson (tabela 4.19), não se verifica correlações significantes entre os diferentes testes, para a mesma data de colheita.

Tabela 4.19 - Coeficiente de correlação de Pearson, entre testes de Folin, DPPH e FRAP para os extratos A das amostras de dezembro.

| | | Folin | DPPH | FRAP |
|--------------|-----------------|-------|-------|-------|
| Folin | Valor | 1 | 0,315 | 0,071 |
| | Sig. (2-tailed) | | 0,964 | 0,007 |
| DPPH | Valor | | 1 | 0,271 |
| | Sig. (2-tailed) | | | 0,130 |
| FRAP | Valor | | | 1 |
| | Sig. (2-tailed) | | | |

Março

Agrupando todos os dados referentes ao extrato A de março, e determinando as respectivas concentrações médias, obtiveram-se os seguintes resultados apresentados na tabela 4.20:

Tabela 4.20 – Extrato A de março: Valores médios da concentração de compostos antioxidantes obtidos pelos diferentes testes e respetivo desvio padrão.

| Apiário | Colmeia | Teste | | | | | |
|---------------------|---------|-------------------------------|---------------|-------------------------------|---------------|-----------------------------|---------------|
| | | Folin* | | DPPH* | | FRAP* | |
| | | Concentração média (mg EAG/g) | Desvio padrão | Concentração média (mg EAG/g) | Desvio padrão | Concentração média (mmol/g) | Desvio padrão |
| Casal Álvaro | 1 | 171,81 ^b | 5,08 | 52,02 ^a | 2,02 | 2,07 ^{bc} | 0,20 |
| | 2 | 167,86 ^b | 7,78 | 75,73 ^e | 3,00 | 2,25 ^c | 0,10 |
| | 3 | 158,66 ^{ab} | 1,68 | 67,26 ^{cd} | 0,44 | 2,27 ^c | 0,17 |
| Lagoas | 1 | 148,63 ^a | 10,35 | 87,31 ^g | 0,51 | 1,99 ^{abc} | 0,17 |
| | 2 | 167,10 ^{ab} | 11,00 | 80,36 ^f | 1,65 | 2,38 ^c | 0,10 |
| | 3 | 161,15 ^{ab} | 3,80 | 86,71 ^g | 0,85 | 3,02 ^d | 0,03 |
| São Roque | 1 | 170,96 ^b | 6,87 | 70,18 ^d | 1,04 | 2,21 ^{bc} | 0,17 |
| | 2 | 168,14 ^b | 3,58 | 64,53 ^c | 0,77 | 2,04 ^{bc} | 0,15 |
| | 3 | 172,31 ^b | 4,08 | 66,92 ^{cd} | 0,56 | 2,27 ^c | 0,12 |
| Ouca | 1 | 166,41 ^{ab} | 6,82 | 57,68 ^b | 0,30 | 1,84 ^{ab} | 0,08 |
| | 2 | 174,90 ^b | 3,75 | 55,14 ^{ab} | 1,16 | 1,62 ^a | 0,08 |
| | 3 | 168,45 ^b | 2,58 | 55,25 ^{ab} | 0,18 | 2,29 ^c | 1,17 |

*médias referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05)

Observando os valores médios obtidos em cada método, pode verificar-se que existe maior dispersão entre os dados no teste do radical DPPH, existindo diferenças significativas entre colmeias do mesmo apiário. Verifica-se uma grande homogeneidade nos valores médios de concentração de compostos fenólicos determinados pelo teste de Folin. O teste de FRAP, por seu lado, apresentou pequenas dispersões pontuais.

Convertendo os resultados da Tabela 4.20 em valores médios de cada apiário (sem distinção entre colmeias), verifica-se que, nas amostras recolhidas em março, São Roque apresenta maior quantidade média de compostos fenólicos totais (pelo teste de Folin). Contudo, Lagoas apresenta maior poder sequestrante anti-radicalar (pelo teste do DPPH) e maior poder redutor de ferro (pelo teste de FRAP) – Tabela 4.21. existem mais diferenças significativas entre os resultados do teste de DPPH, relativamente aos outros dois testes efetuados.

Em março, como é possível verificar na tabela 4.21, Lagoas é um bom local de recolha de própolis rico em compostos antiradicalares e compostos redutores. Contudo, se o objetivo é recolher própolis rico em compostos fenólicos, o apiário mais indicado nesta altura (início da primavera) é o de São Roque.

Tabela 4.21 – Extrato A de março: Valores médios de concentração de compostos antioxidantes para cada apiário de colheita do própolis e respetivo desvio padrão.

| Apiário | Teste | | | | | |
|---------------------|---------------------------|---------------|---------------------------|---------------|-----------------------------|---------------|
| | Folin* | | DPPH* | | FRAP* | |
| | Concentração média (mg/g) | Desvio padrão | Concentração média (mg/g) | Desvio padrão | Concentração média (mmol/g) | Desvio padrão |
| Casal Álvaro | 166,11 ^{ab} | 7,51 | 65,00 ^b | 10,56 | 2,20 ^{ab} | 0,17 |
| Lagoas | 158,96 ^a | 11,29 | 84,80 ^c | 3,47 | 2,46 ^b | 0,46 |
| São Roque | 170,47 ^b | 4,75 | 67,21 ^b | 2,56 | 2,17 ^{ab} | 0,17 |
| Ouca | 169,92 ^b | 5,61 | 56,03 ^a | 1,39 | 1,92 ^a | 0,31 |

*médias referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05)

Segundo a análise ANOVA, março apresenta dados significativamente diferentes entre si. Estabelecendo a correlação de Pearson (Tabela 4.22), verifica-se que há uma fraca correlação entre os dados obtidos pelos diferentes testes realizados, de igual modo, a todas as amostras desta data de colheita.

Tabela 4.22 – Coeficiente de correlação de Pearson entre os testes de Folin-Ciocalteu, DPPH e FRAP, para os extratos A das amostras de março.

| | | Folin | DPPH | FRAP |
|-------|-----------------|-------|--------|--------|
| Folin | Valor | 1 | -0,526 | -0,116 |
| | Sig. (2-tailed) | | 0,534 | 0,500 |
| DPPH | Valor | | 1 | 0,544 |
| | Sig. (2-tailed) | | | 0,860 |
| FRAP | Valor | | | 1 |
| | Sig. (2-tailed) | | | |

Junho

Tomando como grupo de estudo estatístico apenas os dados das amostras colhidas em junho, podem apresentar-se os seguintes valores médios:

Tabela 4.23 – Extrato A de junho: Valores médios de concentração de compostos antioxidantes obtidos pelos diferentes testes e respetivo desvio padrão.

| Apiário | Colmeia | Teste | | | | | |
|--------------|---------|---------------------------|---------------|---------------------------|---------------|-----------------------------|---------------|
| | | Folin* | | DPPH * | | FRAP * | |
| | | Concentração média (mg/g) | Desvio padrão | Concentração média (mg/g) | Desvio padrão | Concentração média (mmol/g) | Desvio padrão |
| Casal Álvaro | 1 | 306,70 ^{bc} | 7,72 | 132,65 ^{bc} | 1,95 | 6,42 ^{ef} | 0,21 |
| | 2 | 291,67 ^{ab} | 2,52 | 168,29 ^f | 4,76 | 5,23 ^{bc} | 0,16 |
| | 3 | 304,19 ^{bc} | 8,15 | 152,06 ^{de} | 1,47 | 6,03 ^{de} | 0,04 |
| Lagoas | 1 | 308,89 ^c | 3,75 | 156,44 ^{def} | 8,00 | 5,62 ^{cd} | 0,12 |
| | 2 | 335,64 ^e | 4,94 | 134,07 ^{bc} | 4,58 | 5,45 ^{bc} | 0,08 |
| | 3 | 314,23 ^{cd} | 4,34 | 109,18 ^a | 1,30 | 5,15 ^b | 0,08 |
| São Roque | 1 | 327,40 ^{cd} | 6,60 | 162,38 ^{ef} | 2,99 | 7,50 ^g | 0,20 |
| | 2 | 287,22 ^a | 3,90 | 142,07 ^{cd} | 5,62 | 6,77 ^f | 0,14 |
| | 3 | 314,33 ^{cd} | 5,75 | 119,44 ^{ab} | 5,49 | 6,71 ^f | 0,07 |
| Ouça | 1 | 308,01 ^c | 7,94 | 162,59 ^{ef} | 6,29 | 5,14 ^b | 0,19 |
| | 2 | 352,02 ^f | 2,71 | 223,03 ^h | 4,27 | 4,22 ^a | 0,18 |
| | 3 | 309,13 ^c | 1,22 | 202,39 ^g | 9,01 | 5,23 ^{bc} | 0,06 |

*médias referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05)

Observando os dados apresentados na Tabela 4.23 é possível verificar que, no teste de Folin-Ciocalteu, a concentração de compostos fenólicos totais presentes nas amostras desta data são muito superiores aos obtidos para o mesmo teste, nas datas anteriores (dezembro e março). Apenas o apiário de Casal Álvaro apresenta resultados com algumas semelhanças sendo que os restantes apiários apresentam uma colmeia que se destaca das restantes, apresentando resultados significativamente diferentes.

No teste do DPPH há uma maior diferença entre as médias obtidas e verifica-se que em todos os apiários há diferenças significativas entre médias das colmeias, pois há dispersão dos resultados. Existem semelhanças pontuais entre colmeias de apiários diferentes.

No caso do teste de FRAP, verifica-se uma dispersão relativamente grande, havendo colmeias do mesmo apiário significativamente diferentes.

Organizando os dados obtidos apenas segundo o apiário (sem distinção de colmeias), é possível verificar que, para o teste de Folin-Ciocalteu se destaca o apiário de Ouca com maior valor médio de compostos fenólicos totais, estando significativamente diferente apenas o valor médio obtido para o apiário de Casal Álvaro. No teste do radical DPPH também se destaca o apiário de Ouca mostrando diferenças significativas em relação aos restantes apiários. Para o teste de FRAP, os apiários apresentam algumas diferenças significativas entre si.

Tabela 4.24 – Extrato A de junho: Valores médios de concentração de compostos antioxidantes de cada apiário de colheita e respetivo desvio padrão.

| Apiário | Teste | | | | | |
|---------------------|---------------------------|---------------|---------------------------|---------------|---------------------------|---------------|
| | Folin* | | DPPH* | | FRAP* | |
| | Concentração média (mg/g) | Desvio padrão | Concentração média (mg/g) | Desvio padrão | Concentração média (mM/g) | Desvio padrão |
| Casal Álvaro | 300,86 ^a | 9,04 | 151,00 ^a | 15,68 | 5,90 ^b | 0,54 |
| Lagoas | 319,58 ^{ab} | 12,83 | 133,23 ^a | 21,00 | 5,41 ^{ab} | 0,22 |
| São Roque | 309,65 ^{ab} | 18,39 | 141,30 ^a | 19,07 | 6,99 ^c | 0,40 |
| Ouca | 323,06 ^b | 22,14 | 196,00 ^b | 27,25 | 4,86 ^a | 0,50 |

*médias referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$)~

Segundo a análise ANOVA, os resultados obtidos são, de facto, significativamente diferentes, não havendo correlações entre os testes (tabela 4.25) como mostra a correlação de Pearson.

Tabela 4.25 – Coeficiente de correlação de Pearson entre Foli-Ciocalteu, DPPH e FRAP para o extrato A das amostras de junho.

| | | Folin | DPPH | FRAP |
|--------------|-----------------|--------------|-------------|-------------|
| Folin | Valor | 1 | 0,329 | -0,297 |
| | Sig. (2-tailed) | | 0,058 | 0,630 |
| DPPH | Valor | | 1 | -0,466 |
| | Sig. (2-tailed) | | | 0,011 |
| FRAP | Valor | | | 1 |
| | Sig. (2-tailed) | | | |

4.2.3. Extrato B

Análise geral dos resultados obtidos

Quantificação dos compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu

Analogamente ao extrato A, procedeu-se aos testes de quantificação e caracterização do extrato B. primeiramente realizou-se o teste de Folin-Ciocalteu que permite quantificar os compostos fenólicos totais existentes num extrato, utilizando a colorimetria. Traçou-se uma reta de calibração com soluções de ácido gálico com concentrações compreendidas entre 12,3 mg/L e 123 mg/L de modo a estabelecer uma relação direta entre a absorvância medida e as concentrações, permitindo assim quantificar os compostos nas amostras. De modo a diminuir o erro associado à medição da absorvância de cada amostra, os ensaios do extrato B, tal como para o extrato A, foram feitos em triplicado, pelo que a Tabela 4.26 apresenta a média dos resultados obtidos a partir dos triplicados, em miligramas de compostos fenólicos por grama de fração solúvel de própolis em cada extrato, apresentados em equivalentes de ácido gálico.

Tabela 4.26 - Valores de concentração médios de compostos fenólicos totais (mg EAG/g) para o extrato B das amostras recolhidas nas diferentes datas, obtida pelo método de Folin-Ciocalteu.

| Amostra | | Teste de Folin-Ciocalteu | | | | | |
|--------------|---------|--------------------------------|---------------|--------------------------------|---------------|--------------------------------|---------------|
| Apiário | Colmeia | 15 de Dezembro de 2013 | | 16 de Março de 2014 | | 25 de Junho de 2014 | |
| | | Concentração média* (mg EAG/g) | Desvio padrão | Concentração média* (mg EAG/g) | Desvio padrão | Concentração média* (mg EAG/g) | Desvio padrão |
| Casal Álvaro | 1 | 187,16 ^{ghi} | 6,46 | 159,85 ^{cde} | 4,09 | 301,22 ^{kl} | 4,43 |
| | 2 | 138,12 ^{ab} | 4,88 | 193,64 ⁱ | 4,26 | 326,02 ^{mn} | 7,45 |
| | 3 | 166,42 ^{cdef} | 2,25 | 163,58 ^{cdef} | 6,63 | 286,21 ^{jk} | 3,19 |
| Lagoas | 1 | 128,80 ^a | 6,31 | 136,10 ^{ab} | 4,20 | 284,21 ^{jk} | 1,60 |
| | 2 | 160,67 ^{cde} | 11,11 | 148,27 ^{abc} | 7,56 | 281,08 ^j | 4,08 |
| | 3 | 181,48 ^{fghi} | 5,86 | 151,22 ^{bcd} | 2,85 | 334,67 ⁿ | 6,19 |
| São Roque | 1 | 175,27 ^{efghi} | 4,57 | 167,92 ^{defg} | 1,47 | 340,27 ⁿ | 6,10 |
| | 2 | 167,08 ^{cdef} | 3,56 | 169,94 ^{defgh} | 5,77 | 314,71 ^{lm} | 4,24 |
| | 3 | 166,01 ^{cdef} | 9,52 | 178,72 ^{efghi} | 7,54 | 320,91 ^{mn} | 5,37 |
| Ouça | 1 | 176,53 ^{efghi} | 3,05 | 180,94 ^{fghi} | 4,82 | 289,74 ^{ik} | 12,63 |
| | 2 | 171,75 ^{efgh} | 2,28 | 162,08 ^{cdef} | 5,56 | 328,04 ^{mn} | 6,27 |
| | 3 | 175,25 ^{efghi} | 1,97 | 187,85 ^{hi} | 3,71 | 321,33 ^{mn} | 11,15 |

*médias referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05)

Tomando a tabela 4.26 como objeto de análise, é possível verificar que os valores médios de compostos fenólicos variam mais entre datas do que dentro do grupo de resultados da mesma data de colheita. Verificam-se diferenças significativas para amostras de colmeias dos apiários de Casal Álvaro e de Lagoas. Para esta data de colheita das amostras de própolis, o coeficiente de variação entre amostras oscilou entre 0,32% (amostra da colmeia 3 de Ouca) e 1,34% (amostra da colmeia 1 de Lagoas).

Relativamente às amostras de própolis recolhido em março, a concentração média de compostos fenólicos totais variou entre 136,10±4,20 mg EAG/g (da colmeia 1 do apiário de Lagoas) e 193,64±4,26 mg EAG/g (da colmeia 2 do apiário de Casal Álvaro). Neste caso, apenas os apiários de Casal Álvaro e Ouca revelaram diferenças significativas entre colmeias. O coeficiente de variação compreendeu-se entre 0,18% (amostra da colmeia 1 de Lagoas) e 1,20% (amostra da colmeia 1 de São Roque).

As amostras de própolis colhido em junho apresentaram uma concentração média de compostos fenólicos totais mais elevada do que o verificado nas datas anteriores. Para esta data, a concentração média de compostos fenólicos totais compreendeu-se entre 281,09±4,08 mg EAG/g e 328,04±6,27 mg EAG/g, sendo que em todos os apiários houve uma colmeia com concentração média significativamente diferente das restantes. O coeficiente de variação das amostras variou entre 0,56% (amostra da colmeia 1 de Lagoas) e 4,36% (amostra da colmeia 1 de Ouca).

Agrupando os valores anteriores segundo o apiário, verifica-se que a concentração média verificada para os quatro locais de colheita quase não variam entre si, estando compreendidos entre 200,77±74,57 mg EAG/g do apiário Lagoas e 229,66±13,87 mg/g do apiário de São Roque (Tabela 4.27). São Roque revelou-se, assim, um bom apiário de colheita de própolis, considerando o seu teor em compostos antioxidantes.

Se se organizarem os dados da tabela acima segundo a data de colheita das amostras de própolis, verifica-se então um aumento significativo da concentração média de compostos fenólicos totais de dezembro e março para junho, quase duplicando a quantidade de compostos presentes no própolis (tabela 4.28).

Tabela 4.27 – Apresentação da média das concentrações obtidas para os extratos B (mg EAG/g), segundo o apiário de recolha.

| Apiário | Concentração média* (mg EAG/g) | Desvio padrão |
|--------------|--------------------------------|---------------|
| Casal Álvaro | 213,58 ^a | 68,07 |
| Lagoas | 200,77 ^a | 74,57 |
| São Roque | 222,31 ^a | 74,74 |
| Ouca | 221,50 ^a | 67,25 |

*médias referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05)

Tabela 4.28 – Apresentação dos valores médios de concentração obtidos (mg EAG/g) para extratos B, de acordo com a data de recolha e o respetivo desvio padrão.

| Data de recolha | Concentração média* (mg/g) | Desvio padrão |
|-----------------|----------------------------|---------------|
| Dezembro | 166,21 ^a | 25,21 |
| Março | 166,68 ^a | 16,92 |
| Junho | 310,74 ^b | 21,25 |

Quantificação dos compostos com atividade antiradicalar para o DPPH

Tome-se agora como grupo de análise os dados obtidos para o teste do radical DPPH (Tabela 4.29), que tem como finalidade determinar quantitativamente a capacidade de sequestração do radical DPPH, por colorimetria. O padrão usado foi, como anteriormente e análogo ao extrato A, o ácido gálico apresentando-se a concentração de compostos com capacidade antiradicalar em equivalentes de ácido gálico.

Tabela 4.29 – Concentração média (mg EAG/g) dos compostos com capacidade de sequestração do radical DPPH para o extrato B das amostras recolhidas nas diferentes datas.

| Amostra | | DPPH | | | | | |
|--------------|---------|----------------------------|---------------|----------------------------|---------------|----------------------------|---------------|
| Apiário | Colmeia | 15 de Dezembro de 2013 | | 16 de Março de 2014 | | 25 de Junho de 2014 | |
| | | Concentração média* (mg/g) | Desvio padrão | Concentração média* (mg/g) | Desvio padrão | Concentração média* (mg/g) | Desvio padrão |
| Casal Álvaro | 1 | 37,62 ^{ab} | 1,10 | 48,27 ^{abcdefg} | 0,84 | 167,53 ^{op} | 6,15 |
| | 2 | 39,06 ^{abc} | 2,44 | 56,05 ^{efghi} | 2,22 | 150,34 ⁿ | 6,01 |
| | 3 | 45,04 ^{abcde} | 1,45 | 53,02 ^{defgh} | 1,16 | 177,78 ^{pq} | 8,51 |
| Lagoas | 1 | 41,81 ^{abcd} | 1,97 | 72,53 ^{jk} | 2,31 | 158,01 ^{no} | 4,91 |
| | 2 | 38,38 ^{abc} | 1,81 | 56,44 ^{efghi} | 1,48 | 125,95 ^{lm} | 3,74 |
| | 3 | 56,10 ^{efghi} | 1,81 | 81,67 ^k | 1,94 | 133,88 ^m | 7,60 |
| São Roque | 1 | 47,90 ^{abcdefg} | 1,44 | 64,97 ^{hij} | 1,36 | 162,57 ^{no} | 12,80 |
| | 2 | 37,20 ^a | 0,63 | 45,94 ^{abcdef} | 0,50 | 165,10 ^{op} | 7,76 |
| | 3 | 36,02 ^a | 1,19 | 41,85 ^{abcd} | 0,83 | 115,60 ^l | 1,78 |
| Ouça | 1 | 49,24 ^{abcdefg} | 0,85 | 61,13 ^{ghij} | 0,76 | 149,34 ⁿ | 7,28 |
| | 2 | 50,91 ^{bcdefg} | 0,57 | 67,27 ^{ij} | 0,57 | 236,47 ^f | 5,94 |
| | 3 | 51,84 ^{cdefgh} | 0,44 | 59,39 ^{fghij} | 0,34 | 185,03 ^q | 4,26 |

*médias referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Os valores médios de concentração de compostos com ação antiradicalar nas amostras de própolis, para dezembro, variam entre 36,02±1,19 mg EAG/g (extrato de São Roque, colmeia 3) e 56,10±1,80 mg EAG/g (extrato de Lagoas, colmeia 3). Para as amostras desta data não houve diferenças significativas. O coeficiente de variação variou entre 1,93% (da amostra da colmeia 3 de Ouça) e 15,09% (amostra da colmeia 2 de Casal Álvaro).

Para março, a concentração média de compostos com ação antiradicalar variou entre 41,85±0,50 mg EAG/g (extrato da colmeia 3 de São Roque) e 81,67±1,94 mg EAG/g (extrato da colmeia 3 de Lagoas). Para esta data de colheita das amostras, houve diferenças significativas entre os valores médios de concentração das colmeias dos apiários de Lagoas e São Roque. O coeficiente de variação oscilou entre 0,18% (amostra da colmeia 1 de Lagoas) e 1,20% (amostra da colmeia 1 de São Roque). Verificou-se que ocorreu um aumento da concentração média de compostos antiradicalares, em relação a dezembro.

Para junho, a concentração média de compostos com atividade antiradicalar varia entre 115,60±1,78 mg EAG/g (extrato da colmeia 3 de São Roque) e 236,47±5,96 mg EAG/g (extrato

da colmeia 2 de Ouca). Para este conjunto de amostras, verificou-se a existência de diferenças significativas entre as amostras das colmeias dos diferentes apiários. A concentração média aumenta relativamente a março. O coeficiente de variação das amostras estabeleceu-se entre 1,59% e 8,06%.

Analisando o conjunto de dados apresentados na tabela anterior, verifica-se que há um aumento gradual da concentração de compostos com atividade antiradicalar nas amostras, de dezembro para junho. embora o aumento da concentração seja pouco acentuado nas amostras de março em relação às de dezembro. As amostras de junho revelaram um grande aumento em relação às outras datas apresentando, em alguns casos, valores três vezes maiores.

Agrupando os valores da Tabela 4.29 de acordo com o apiário de recolha do própolis, é notório que, embora os valores médios por colmeia sejam compreendidos entre $139,28 \pm 15,27$ mg EAG/g e $190,28 \pm 38,28$ mg EAG/g, existem médias significativamente diferentes nesta pequena gama, nomeadamente entre os valores mínimo e máximo de compostos com capacidade antiradical (Tabela 4.30). O apiário de Ouca é o melhor apiário para recolher própolis em março, de modo a se obter uma maior concentração de compostos antiradicalares.

Agrupando, desta feita, o mesmo conjunto de dados, por data de colheita, verifica-se que, de facto, há diferenças significativas entre os valores globais médios entre as alturas de recolha do própolis. Observa-se um aumento significativo ao longo das diferentes datas de colheita (Tabela 4.31).

Tabela 4.30 – Apresentação da média de concentrações de compostos com capacidade de sequestração do radical DPPH (mg EAG/g) para os extratos B, de acordo com o apiário de colheita do própolis.

| Apiário | Concentração média* (mg EAG/g) | Desvio padrão |
|--------------|--------------------------------|---------------|
| Casal Álvaro | 165,18 ^{ab} | 13,49 |
| Lagoas | 139,28 ^a | 15,27 |
| São Roque | 147,76 ^a | 25,29 |
| Ouca | 190,28 ^b | 38,28 |

*médias referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Tabela 4.31 – Apresentação da média de concentração de compostos com capacidade de sequestração do radical DPPH (mg EAG/g) para os extratos B, de acordo com a data de colheita do própolis.

| Data de colheita | Concentração média* (mg EAG/g) | Desvio padrão |
|------------------|--------------------------------|---------------|
| Dezembro | 42,26 ^a | 14,54 |
| Março | 59,04 ^b | 21,35 |
| Junho | 156,63 ^c | 30,73 |

*médias referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Quantificação de compostos com capacidade antioxidante do ião ferro - FRAP

Por fim, procedeu-se ao teste de quantificação dos compostos com capacidade antioxidante de ferro (FRAP), obtendo-se os valores médios apresentados na Tabela 4.32. A concentração apresenta-se em mmol Fe²⁺ por grama de fração solúvel de própolis.

Analisando os dados da referida tabela, constata-se que a concentração média de compostos antioxidantes nas amostras recolhidas em dezembro varia numa gama de valores entre 1,68±0,02 mmol/g (extrato de São Roque, colmeia 3) e 2,47±0,10 mmol/g (extrato de Ouca, colmeia 3). Para esta data, apenas se verificaram diferenças significativas entre as colmeias do apiário de Ouca, sendo que há muita semelhança entre os valores médios de concentração obtidos para todas as amostras. O coeficiente de variação das amostras variou entre 0,50% (amostra da colmeia 3 de Casal Álvaro) e 8,69% (amostra da colmeia 1 de São Roque).

Em março os valores médios de concentração de compostos antioxidantes situam-se entre 1,50±0,14 mmol/g (extrato de São Roque, colmeia 1) e 2,44±0,07 mmol/g (extrato de São Roque, colmeia 3). Houve diferenças significativas entre as colmeias dos apiários de Casal Álvaro, São Roque e Ouca. Para o extrato B das amostras de março, o coeficiente de variação situou-se entre 1,37% (amostra da colmeia 3 de Lagoas) e 9,31% (amostra da colmeia 1 de São Roque).

Quanto às amostras de junho, a gama de valores de concentração média é superior, variando entre 4,24±0,17 mmol/g (extrato de São Roque, colmeia 3) e 5,66±0,32 mmol/g (extrato de São Roque, colmeia 1). Comparando os resultados obtidos para todas as amostras, verifica-se alguma semelhança entre colmeias de apiários diferentes; no entanto, existem alguns casos em que existem diferenças significativas entre colmeias do mesmo apiário. O coeficiente de variação das amostras variou entre 0,22% (amostra da colmeia 1 de Casal Álvaro) e 8,45% (amostra da colmeia 2 de Lagoas).

Tabela 4.32 – Concentração média (mmol/g) de compostos com capacidade de redução férrica, para os extratos B das amostras recolhidas nas diferentes datas.

| Amostra | | FRAP | | | | | |
|--------------|---------|------------------------------|---------------|------------------------------|---------------|------------------------------|---------------|
| Apiário | Colmeia | 15 de Dezembro de 2013 | | 16 de Março de 2014 | | 25 de Junho de 2014 | |
| | | Concentração média* (mmol/g) | Desvio padrão | Concentração média* (mmol/g) | Desvio Padrão | Concentração média* (mmol/g) | Desvio Padrão |
| Casal Álvaro | 1 | 2,15 ^{cdefgh} | 0,17 | 1,58 ^{ab} | 0,08 | 4,57 ^{ij} | 0,01 |
| | 2 | 2,00 ^{abcdegh} | 0,01 | 2,39 ^{gh} | 0,18 | 5,21 ^{lm} | 0,21 |
| | 3 | 1,98 ^{abcdegh} | 0,14 | 1,70 ^{abcd} | 0,05 | 5,62 ^{mn} | 0,16 |
| Lagoas | 1 | 1,71 ^{abcd} | 0,04 | 1,75 ^{abcde} | 0,11 | 5,23 ^{lmn} | 0,32 |
| | 2 | 2,21 ^{defgh} | 0,18 | 1,85 ^{abcdef} | 0,15 | 4,62 ^{ij} | 0,39 |
| | 3 | 2,23 ^{efgh} | 0,09 | 2,19 ^{cdefgh} | 0,06 | 4,32 ^{ij} | 0,23 |
| São Roque | 1 | 2,07 ^{bcdefgh} | 0,18 | 1,50 ^a | 0,14 | 5,66 ^{mn} | 0,32 |
| | 2 | 1,74 ^{abcde} | 0,10 | 2,25 ^{efgh} | 0,04 | 4,81 ^{ij} | 0,21 |
| | 3 | 1,68 ^{abc} | 0,02 | 2,44 ^h | 0,07 | 4,24 ⁱ | 0,17 |
| Ouça | 1 | 1,91 ^{abcdefg} | 0,06 | 2,33 ^{fgh} | 0,15 | 5,21 ^{lm} | 0,05 |
| | 2 | 2,18 ^{cdefgh} | 0,04 | 1,88 ^{abcdef} | 0,07 | 5,72 ⁿ | 0,15 |
| | 3 | 2,47 ^h | 0,10 | 2,11 ^{cdefgh} | 0,03 | 5,59 ^{mn} | 0,14 |

*médias referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Analogamente ao efetuado para os testes anteriores, compararam-se os dados segundo o apiário de colheita das amostras de própolis, verificando-se que os resultados obtidos deste modo são todos semelhantes entre si (entre 2,90 mmol/g e 3,27 mmol/g) – Tabela 4.33 – mostrando que qualquer um dos apiários será um bom ponto de colheita de própolis durante o semestre estudado (dezembro a junho).

Tendo em consideração apenas a data de recolha das amostras de própolis, verifica-se um pequeno decréscimo na concentração, de dezembro para março, sendo que, para junho, a concentração média é, aproximadamente, o dobro – Tabela 4.34, tornando esta altura na época ideal de colheita de própolis mais rico em compostos com capacidade redutora de ferro.

Tabela 4.33 – Apresentação da média da concentração de compostos com capacidade de redução férrica (mmol/g) para os extratos B, de acordo com o apiário de recolha do própolis.

| Apiário | Concentração média* (mmol/g) | Desvio padrão |
|--------------|------------------------------|---------------|
| Casal Álvaro | 3,02 ^a | 1,56 |
| Lagoas | 2,90 ^a | 1,35 |
| São Roque | 2,93 ^a | 1,49 |
| Ouca | 3,27 ^a | 1,63 |

*médias referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05)

Tabela 4.34 – Apresentação da média da concentração de compostos com capacidade de redução férrica (mmol/g) para os extratos B, de acordo com a data de colheita.

| Data de recolha | Concentração média* (mmol/g) | Desvio padrão |
|-----------------|------------------------------|---------------|
| Dezembro | 2,03 ^a | 0,25 |
| Março | 2,00 ^a | 0,33 |
| Junho | 5,07 ^b | 0,55 |

De modo a estabelecer uma relação entre os dados obtidos, procedeu-se à análise de significância ANOVA. Primeiramente comparam-se os todos os valores médios obtidos segundo cada teste, seguindo-se uma comparação segundo os apiários e, por fim, segundo as datas de colheita (Tabela 4.35).

De entre todas as comparações feitas, apenas existe concordância entre os dados obtidos pelos testes de Folin e FRAP, quando analisados os valores médios de concentração de compostos antioxidantes segundo o apiário. De acordo com esta análise, verifica-se que existem diferenças significativas entre os valores médios de concentração, quer se estudem os dados globais como um grupo ou se agrupem os dados por data de colheita do própolis.

Tabela 4.35- Valores de significância, obtidos pelo ANOVA, considerando todos os dados obtidos para os extratos B.

| Grupos | Teste de Folin (sig.) | Teste do DPPH (sig.) | Teste do FRAP (sig.) |
|-----------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| Todos os dados | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Apiário | 0,486 | 0,007 | 0,810 |
| Data de recolha | 0,000 | 0,000 | 0,000 |

Análise de acordo com a data de recolha do própolis

Dezembro

Tomando como grupo de estudo estatístico apenas os dados correspondentes aos extratos B das amostras de própolis colhidas em dezembro (Tabela 4.36), verifica-se que, para o teste de Folin-Ciocalteu, a concentração média de compostos fenólicos totais varia entre $126,80 \pm 6,31$ mg EAG/g (extrato de Lagoas, colmeia 1) e $233,21 \pm 5,71$ mg EAG/g (extrato de São Roque, colmeia 2).

Para o teste de sequestração do radical DPPH, os valores médios de concentração de compostos com ação antiradicalar se encontram entre 68,86 mg EAG/g (extrato de São Roque, colmeia 3) e 110,84 mg EAG/g (extrato de Lagoas, colmeia 3).

No teste do poder antioxidante do ferro (FRAP), os resultados obtidos situam-se entre 1,68 mmol/g (extrato da colmeia 3 de São Roque) e 2,47 mmol/g (extrato da colmeia 3 de Ouca)

Tabela 4.36 – Extrato B de dezembro: valores médios de concentração de compostos antioxidantes obtidos pelos diferentes testes, e respetivo desvio padrão.

| Apiário | Colmeia | Teste | | | | | |
|--------------|---------|-------------------------------|---------------|-------------------------------|---------------|-----------------------------|---------------|
| | | Folin* | | DPPH* | | FRAP* | |
| | | Concentração média (mg EAG/g) | Desvio padrão | Concentração média (mg EAG/g) | Desvio padrão | Concentração média (mmol/g) | Desvio padrão |
| Casal Álvaro | 1 | 187,16 ^d | 6,46 | 37,62 ^{ab} | 1,10 | 2,15 ^{cd} | 0,17 |
| | 2 | 138,12 ^a | 4,88 | 39,06 ^{ab} | 2,44 | 2,00 ^{abc} | 0,01 |
| | 3 | 166,42 ^{bc} | 2,25 | 45,04 ^{cd} | 1,45 | 1,99 ^{abc} | 0,14 |
| Lagoas | 1 | 128,80 ^a | 6,31 | 41,81 ^{bc} | 1,97 | 1,71 ^a | 0,04 |
| | 2 | 160,67 ^b | 11,11 | 38,38 ^{ab} | 1,81 | 2,21 ^{cd} | 0,18 |
| | 3 | 181,48 ^{cd} | 5,86 | 56,10 ^f | 1,81 | 2,23 ^{cd} | 0,09 |
| São Roque | 1 | 175,27 ^{bcd} | 4,57 | 48,90 ^{de} | 1,44 | 2,07 ^{bc} | 0,18 |
| | 2 | 167,08 ^{bc} | 3,56 | 37,20 ^a | 0,63 | 1,74 ^{ab} | 0,10 |
| | 3 | 166,01 ^{bc} | 9,51 | 36,02 ^a | 1,19 | 1,68 ^a | 0,02 |
| Ouca | 1 | 176,53 ^{bcd} | 3,04 | 49,24 ^{de} | 0,85 | 1,91 ^{abc} | 0,06 |
| | 2 | 171,75 ^{bcd} | 2,28 | 50,91 ^e | 0,57 | 2,18 ^{cd} | 0,04 |
| | 3 | 175,25 ^{bcd} | 1,97 | 51,84 ^e | 0,44 | 2,47 ^d | 0,10 |

*médias referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Como é notório nos valores apresentados na tabela anterior, existem, para qualquer um dos métodos, diferenças significativas entre colmeias do mesmo apiário, registando-se ainda semelhanças entre colmeias de apiários com localizações distintas.

Organizando os dados referentes às amostras colhidas em dezembro de acordo com o apiário de recolha das amostras de própolis, nota-se que o apiário de Ouca apresenta uma concentração média de compostos fenólicos totais superior aos restantes apiários, sendo que Lagoas é o apiário que detém o menor valor. Para o teste de DPPH, Ouca é o apiário que apresenta maior concentração média de compostos com capacidade de sequestração do radical DPPH e São Roque o local que apresenta menor valor. O apiário que apresenta maior concentração média de compostos com atividade redutora é o de Ouca, sendo que São Roque apresenta menor quantidade de compostos antioxidantes, identificados pelo teste de FRAP – Tabela 4.37. É evidente que, neste caso, os testes de DPPH e FRAP se assemelham, na medida em que os apiários de organizam do mesmo modo (de forma crescente dos resultados obtidos: São Roque, Casal Álvaro, Lagos e Ouca).

Tabela 4.37 – Extrato B de dezembro: Valores médios de concentração de compostos antioxidantes, para cada apiário de recolha de própolis e respetivo desvio padrão.

| Apiário | Teste | | | | | |
|---------------------|-------------------------------|---------------|-------------------------------|---------------|-----------------------------|---------------|
| | Folin* | | DPPH* | | FRAP* | |
| | Concentração média (mg EAG/g) | Desvio padrão | Concentração média (mg EAG/g) | Desvio padrão | Concentração média (mmol/g) | Desvio padrão |
| Casal Álvaro | 163,90 ^a | 21,73 | 40,57 ^a | 3,73 | 2,04 ^{ab} | 0,13 |
| Lagoas | 156,98 ^a | 24,03 | 45,43 ^{ab} | 8,30 | 2,05 ^{ab} | 0,27 |
| São Roque | 169,45 ^a | 7,09 | 40,38 ^a | 5,75 | 1,83 ^a | 0,21 |
| Ouca | 174,51 ^a | 3,03 | 50,66 ^b | 1,27 | 2,19 ^b | 0,25 |

*médias referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Segundo a análise de significância ANOVA, verifica-se que há, de facto, diferenças significativas entre os resultados obtidos para as amostras, segundo os diferentes testes. O teste de correlação de Pearson confirma que não é possível estabelecer uma correlação entre os resultados obtidos com os diferentes testes (Tabela 4.38).

Tabela 4.38 – Coeficiente de correlação de Pearson, entre os testes de Folin-Ciocalteu, DPPH e FRAP para o extrato B das amostras de dezembro.

| | | Folin | DPPH | FRAP |
|-------|-----------------|-------|-------|-------|
| Folin | Valor | 1 | 0,374 | 0,372 |
| | Sig. (2-tailed) | | 0,753 | 0,976 |
| DPPH | Valor | | 1 | 0,523 |
| | Sig. (2-tailed) | | | 0,000 |
| FRAP | Valor | | | 1 |
| | Sig. (2-tailed) | | | |

Março

Efetuada os diferentes testes colorimétricos de quantificação da atividade antioxidante aos extratos B das amostras de própolis colhido em março, apresenta-se na Tabela 4.39 os valores médios das respectivas concentrações de compostos que cada teste identifica.

Tabela 4.39 – Extrato B de março: Valores médios de concentração de compostos antioxidantes obtidos pelos diferentes testes e respetivo desvio padrão.

| Apiário | Colmeia | Teste | | | | | |
|--------------|---------|-------------------------------|---------------|-------------------------------|---------------|-----------------------------|---------------|
| | | Folin* | | DPPH* | | FRAP* | |
| | | Concentração média (mg EAG/g) | Desvio padrão | Concentração média (mg EAG/g) | Desvio padrão | Concentração média (mmol/g) | Desvio padrão |
| Casal Álvaro | 1 | 159,85 ^{bcd} | 4,09 | 48,27 ^b | 0,84 | 1,58 ^{ab} | 0,08 |
| | 2 | 193,64 ^g | 4,26 | 56,05 ^{cd} | 2,22 | 2,39 ^{ef} | 0,18 |
| | 3 | 163,58 ^{cde} | 6,63 | 53,02 ^c | 1,16 | 1,70 ^{ab} | 0,05 |
| Lagoas | 1 | 136,10 ^a | 4,20 | 72,53 ^h | 2,31 | 1,75 ^{ab} | 0,11 |
| | 2 | 148,28 ^{ab} | 7,56 | 56,44 ^{cd} | 1,48 | 1,85 ^{bc} | 0,15 |
| | 3 | 151,22 ^{abc} | 2,85 | 81,67 ⁱ | 1,94 | 2,19 ^{def} | 0,06 |
| São Roque | 1 | 167,92 ^{def} | 1,47 | 64,97 ^{ef} | 1,36 | 1,50 ^a | 0,14 |
| | 2 | 169,94 ^{def} | 5,77 | 45,94 ^b | 0,50 | 2,25 ^{ef} | 0,04 |
| | 3 | 178,72 ^{efg} | 7,54 | 41,85 ^a | 0,83 | 2,44 ^f | 0,07 |
| Ouça | 1 | 180,94 ^{fg} | 4,81 | 61,13 ^{ef} | 0,76 | 2,33 ^{ef} | 0,15 |
| | 2 | 162,08 ^{bcd} | 5,56 | 67,27 ^g | 0,57 | 1,88 ^{bcd} | 0,07 |
| | 3 | 187,85 ^g | 3,70 | 59,39 ^{de} | 0,37 | 2,11 ^{cde} | 0,03 |

*médias referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Pode, então, observar-se que, para o teste de Folin-Ciocalteu, a quantidade média de compostos fenólicos totais está estabelecida entre 136,10±4,20 mg EAG/g (extrato da colmeia 1 de Lagoas) e 193,64±4,26 mg EAG/g (extrato da colmeia 2 de Casal Álvaro). Verifica-se também uma maior semelhança entre os valores obtidos para os apiários de Lagoas e de São Roque. A colmeia 3 do apiário de Casal Álvaro destaca-se das outras colmeias do mesmo local pois apresenta uma concentração média de compostos fenólicos significativamente superior. Por sua vez, a colmeia 2 do apiário de Ouca destaca-se das outras duas do mesmo local por apresentar uma concentração significativamente inferior.

Para o teste de sequestração do radical DPPH, verifica-se que a gama de variação de concentração média dos compostos com capacidade antiradicalar situa-se entre 41,85±0,83 mg EAG/g (extrato da colmeia 3 de São Roque) e 81,67±1,94 mg EAG/g (extrato da colmeia 3 de Lagoas). O apiário de Lagoas apresenta valores médios de concentração de compostos antiradicalares ligeiramente superiores aos valores obtidos para as amostras dos restantes apiários; no entanto, para o apiário de Lagoas, existe uma colmeia que apresenta uma concentração média inferior às restantes colmeias. À exceção de Lagoas, os apiários apresentam valores médios de concentração mais próximos entre si, embora se verifique uma grande dispersão entre todos os valores obtidos, revelando diferenças significativas entre colmeias do mesmo apiário.

De acordo com o teste de quantificação de antioxidantes de ferro (FRAP), a concentração média de compostos com capacidade antioxidante compreende-se entre 1,50±0,14 mmol/g (extrato da colmeia 1 de São Roque) e 2,44±0,07 mmol/g (extrato da colmeia 3 de São Roque). Como é notório, os valores extremos (superior e inferior) pertencem a colmeias diferentes de um mesmo apiário. Esta situação ocorre com todas as amostras testadas, dos quatro apiários: duas colmeias de cada apiário apresentam valores que se relacionam entre si e uma colmeia apresenta uma concentração média de antioxidantes significativamente diferente das restantes.

Tabela 4.40 - Valores da concentração média determinados por cada método para os extratos B, de acordo com cada apiário.

| Apiário | Teste | | | | | |
|---------------------|-------------------------------|---------------|-------------------------------|---------------|-----------------------------|---------------|
| | Folin* | | DPPH* | | FRAP* | |
| | Concentração média (mg EAG/g) | Desvio padrão | Concentração média (mg EAG/g) | Desvio padrão | Concentração média (mmol/g) | Desvio padrão |
| Casal Álvaro | 172,36 ^b | 16,65 | 52,45 ^{ab} | 3,64 | 1,89 ^a | 0,39 |
| Lagoas | 145,20 ^a | 8,30 | 70,21 ^c | 11,19 | 1,93 ^a | 0,22 |
| São Roque | 172,19 ^b | 6,91 | 50,92 ^a | 10,72 | 2,06 ^a | 0,44 |
| Ouca | 176,96 ^b | 12,26 | 62,60 ^{bc} | 3,62 | 2,10 ^a | 0,21 |

*médias referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05)

Na Tabela 4.40 estão apresentados os valores médios de concentração obtidos, de acordo com o apiário de colheita das amostras de própolis no mês de março.

Verifica-se que Ouca é o apiário que apresenta maior concentração média de compostos fenólicos totais (teste de Folin). Quanto à concentração média de compostos com atividade antiradicalar, é o apiário de Lagoas que apresenta maior quantidade., Ouca é o apiário que apresenta maior concentração média de compostos com capacidade redutora.

De acordo com a análise de significância ANOVA, verifica-se que apenas o teste de FRAP não apresenta diferenças significativas entre os valores obtidos. Através da correlação de Pearson, verifica-se que os testes se relacionam pouco entre si, sendo que o DPPH é o teste que não revela qualquer correlação com os restantes testes, tendo em consideração os dados obtidos para as amostras de própolis colhidas em março (Tabela 4.41).

Tabela 4.41 - Coeficiente de correlação de Pearson, entre os testes de Folin-Clocalteu, DPPH e FRAP, para os extratos B das amostras de março.

| | | Folin | DPPH | FRAP |
|--------------|-----------------|-------|--------|--------|
| Folin | Valor | 1 | -0,429 | 0,527 |
| | Sig. (2-tailed) | | 0,236 | 0,001 |
| DPPH | Valor | | 1 | -0,192 |
| | Sig. (2-tailed) | | | 0,001 |
| FRAP | Valor | | | 1 |
| | Sig. (2-tailed) | | | |

Junho

Analogamente às amostras de dezembro e março, as amostras de junho foram submetidas aos três diferentes testes, obtendo-se os resultados médios apresentados na Tabela 4.42.

Tabela 4.42 – Extrato B de junho: Valores médios de concentração de compostos antioxidantes obtidos pelos diferentes testes e respetivo desvio padrão.

| Apiário | Colmeia | Teste | | | | | |
|--------------|---------|-------------------------------|---------------|-------------------------------|---------------|-----------------------------|---------------|
| | | Folin* | | DPPH* | | FRAP* | |
| | | Concentração média (mg EAG/g) | Desvio padrão | Concentração média (mg EAG/g) | Desvio padrão | Concentração média (mmol/g) | Desvio padrão |
| Casal Álvaro | 1 | 301,23 ^{bc} | 4,44 | 167,53 ^{cde} | 6,14 | 4,57 ^{ab} | 0,01 |
| | 2 | 326,02 ^{de} | 7,45 | 150,24 ^{bc} | 6,01 | 5,21 ^{bcd} | 0,21 |
| | 3 | 286,21 ^{ab} | 3,19 | 177,78 ^{de} | 8,51 | 5,62 ^d | 0,16 |
| Lagoas | 1 | 284,62 ^{ab} | 1,60 | 158,01 ^{cd} | 4,91 | 5,22 ^{cd} | 0,32 |
| | 2 | 281,09 ^a | 4,08 | 125,95 ^b | 3,75 | 4,62 ^{abc} | 0,39 |
| | 3 | 334,66 ^e | 6,19 | 133,88 ^{ab} | 7,60 | 4,32 ^a | 0,23 |
| São Roque | 1 | 340,27 ^e | 6,10 | 162,57 ^{cd} | 12,80 | 5,66 ^d | 0,32 |
| | 2 | 314,71 ^{cd} | 4,24 | 165,10 ^{cde} | 7,76 | 4,80 ^{abc} | 0,21 |
| | 3 | 320,91 ^{cde} | 5,37 | 115,60 ^a | 1,78 | 4,24 ^a | 0,17 |
| Ouça | 1 | 289,74 ^{ab} | 12,63 | 149,34 ^{bc} | 7,28 | 5,21 ^{bcd} | 0,05 |
| | 2 | 321,34 ^{de} | 6,27 | 236,47 ^f | 5,93 | 5,72 ^d | 0,15 |
| | 3 | 328,04 ^{de} | 11,15 | 185,03 ^e | 4,26 | 5,59 ^d | 0,14 |

*médias referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05)

Tomando os valores do teste de Folin-Ciocalteu da tabela 4.42 como elemento de análise, verifica-se que a composição média das amostras em compostos fenólicos totais varia entre 281,09±4,08 mg EAG/g de fração solúvel (extrato da colmeia 2 de Lagoas) e 340,27±6,10 mg EAG/g (extrato da colmeia 1 de São Roque). Embora a variação entre o valor mínimo e o máximo não seja muito elevada, é notório que existem diferenças significativas entre amostras de um mesmo apiário. Contudo, é possível constatar que, de cada apiário, apenas uma colmeia apresenta um valor médio que se distingue significativamente dos restantes.

Relativamente ao teste do DPPH, a concentração média de compostos com ação antiradicalar nas amostras situa-se numa gama de valores compreendida entre 115,60±7,76 mg EAG/g de fração solúvel de própolis (extrato da colmeia 3 de São Roque,) e 236,47±5,94 mg EAG/g (extrato da colmeia 2 de Ouca,). Tal como aconteceu para o teste de Folin, também neste caso há destaque para uma colmeia de cada apiário, que revela um valor significativamente diferente dos restantes.

Tendo em conta os valores obtidos relativamente ao teste de antioxidantes FRAP, a concentração média nas amostras de própolis varia de 4,24±0,17 mmol/g de fração solúvel (Extrato da colmeia 3 de São Roque) e 5,72±0,15 mmol/g (extrato da colmeia 2 de Ouca). Com a exceção do apiário de Ouca, todos os outros apiários têm uma colmeia que se destaca das restantes.

Apresenta-se na tabela 4.43 a média entre os valores médios de concentração de compostos antioxidantes obtidos, de acordo com apiário de colheita do própolis em junho.

Tabela 4.43 – Extrato B de junho: Valores médios de concentração de compostos antioxidantes para cada apiário de recolha de própolis e respetivo desvio padrão.

| Apiário | Teste | | | | | |
|---------------------|---------------------------|---------------|---------------------------|---------------|-----------------------------|---------------|
| | Folin* | | DPPH* | | FRAP* | |
| | Concentração média (mg/g) | Desvio padrão | Concentração média (mg/g) | Desvio padrão | Concentração média (mmol/g) | Desvio padrão |
| Casal Álvaro | 304,48 ^a | 18,01 | 165,18 ^{ab} | 13,49 | 5,13 ^{ab} | 0,48 |
| Lagoas | 300,12 ^a | 26,23 | 139,28 ^a | 15,27 | 4,72 ^a | 0,49 |
| São Roque | 325,30 ^a | 12,42 | 147,76 ^a | 25,29 | 4,90 ^{ab} | 0,65 |
| Ouca | 313,04 ^a | 19,86 | 190,28 ^b | 38,28 | 5,51 ^b | 0,25 |

*médias referenciadas com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05)

Verifica-se, então, que os resultados obtidos para os diferentes apiários são relativamente próximos e semelhantes para o teste de Folin, atribuindo-se a menor concentração de compostos fenólicos ao apiário de Lagoas e a maior ao apiário de São Roque. Quanto à concentração média de compostos com atividade antiradicalar, Ouca destaca-se como sendo o apiário com maior concentração destes compostos, sendo Lagoas o apiário que apresenta menor concentração. Os valores de concentração média de compostos com atividade redutora variam do mesmo modo que os valores médios de concentração obtidos para o teste de DPPH.

Segundo a análise do ANOVA, o único teste que apresenta diferenças significativas entre os dados obtidos é o teste antiradicalar do DPPH. Estabelecendo correlações entre os testes, apenas se verifica, como constatado anteriormente, relação entre os testes de DPPH e FRAP (Tabela 4.44).

Tabela 4.44 – Coeficiente de correlação de Pearson, entre os testes de Folin-Ciocalteu, DPPH e FRAP, para os extratos B das amostras de junho.

| | | Folin | DPPH | FRAP |
|--------------|-----------------|--------------|-------------|--------------|
| Folin | Valor | 1 | 0,162 | 0,040 |
| | Sig. (2-tailed) | | 0,352 | 0,813 |
| DPPH | Valor | | 1 | 0,700 |
| | Sig. (2-tailed) | | | 0,000 |
| FRAP | Valor | | | 1 |
| | Sig. (2-tailed) | | | |

4.2.4. Comparação Extrato A vs Extrato B

Tendo sido feita a análise de cada extrato (A e B) em separado, é essencial proceder à comparação de ambos por serem extratos duplicados entre si, pertencentes ao apiário e às mesmas colmeias (teoricamente iguais).

Em análise geral dos resultados obtidos para o método de Folin-Ciocalteu, existem diferenças visíveis entre os extratos de dezembro/março e os extratos de junho. Verifica-se que, embora existam pequenas diferenças entre extratos, ambos se comportam do mesmo modo, quando comparados todos os extratos das diferentes datas de colheita. Quanto às amostras recolhidas em junho, o extrato A do apiário de Lagoas apresenta maior concentração média de compostos fenólicos totais. Para a mesma data, o extrato B de São Roque é o que se destaca por superioridade (Figura 4.2).

A concentração média de compostos fenólicos presentes nas amostras de dezembro variou entre 128,80 mg EAG/g e 194,34 mg EAG/g; para as amostras de março, a concentração média de compostos fenólicos oscilou entre 136,10 mg EAG/g e 193,64 mg EAG/g e para as amostras de junho, a concentração média de compostos fenólicos apresentou valores compreendidos entre 281,08 mg EAG/g e 352,02 mg EAG/g. Estudos realizados em Portugal apontam uma concentração média de compostos fenólicos entre 87,15 mg EAG/g e 329 mg EAG/g (Moreira *et al*, 2008; Cruz *et al*, 2011; Silva *et al*, 2012), variando de acordo com a localização geográfica e as respetivas datas de colheita. Comparando os valores obtidos para o própolis nacional com os mesmos valores determinados para própolis de outros países, tem-se que a concentração média de compostos fenólicos no própolis do Brasil varia entre 48 mg EAG/g e 87 mg EAG/g (Sarıkaya *et al*, 2007; Mello *et al*, 2009) e para o própolis da China, a concentração média destes compostos varia entre 10 mg EAG/g e 377 mg EAG/g (Choi *et al*, 2006; Guo *et al*, 2011).

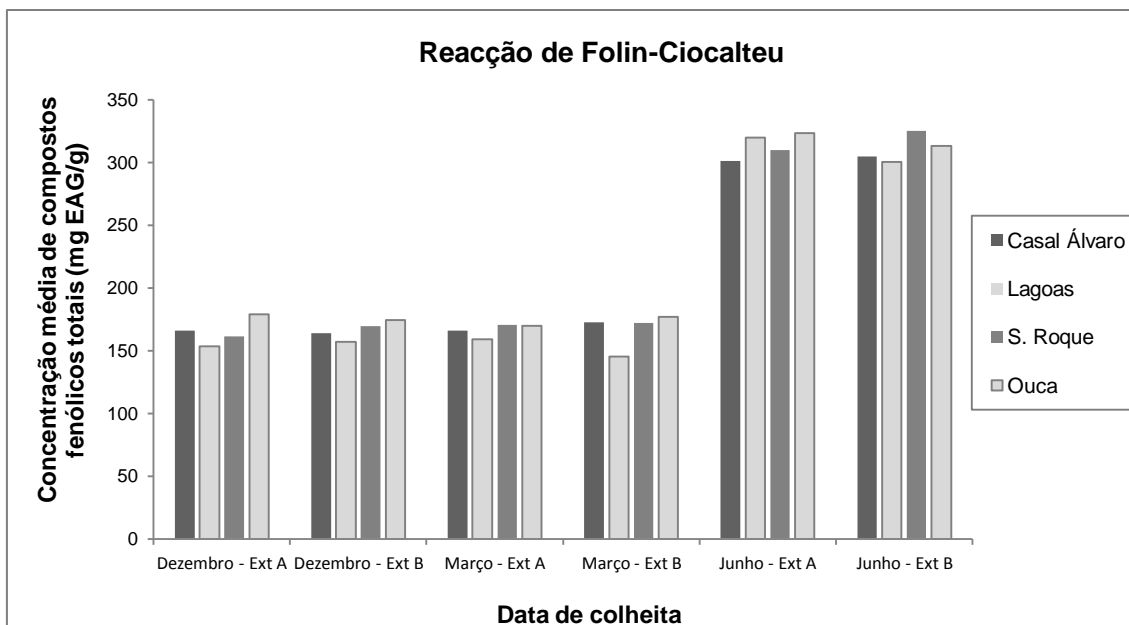


Figura 4.2 - Representação gráfica dos valores médios de concentração de compostos fenólicos totais (mg EAG/g) para cada apiário, para os extratos A e B.

De acordo com o teste de DPPH, em que é feita uma quantificação de compostos com capacidade antirradicalar, é possível verificar que existem diferenças entre extratos A e B de uma mesma amostra, embora assumam um comportamento semelhante. Independentemente do valor médio da concentração de compostos antirradicalares presentes nos diferentes extratos das amostras de março e junho, a ordem crescente da concentração destes compostos é a mesma. As amostras de dezembro mostram algumas diferenças na organização crescente do valor médio de concentração (figura 4.3).

Tendo em conta o tipo de compostos identificados por esse método, verificou-se que as amostras de dezembro apresentaram valores entre 19,67 mg EAG/g e 56,10 mg EAG/g, as amostras de março apresentaram concentrações médias com valores entre 41,85 mg EAG/g e 87,31 mg EAG/g e as amostras de junho variaram entre 109,18 mg EAG/g e 236,47 mg EAG/g. Cruz *et al* (2011) determinou, para o própolis nacional, uma concentração média de compostos com ação sequestrante do radical DPPH de 50,46 mg EAG/g.

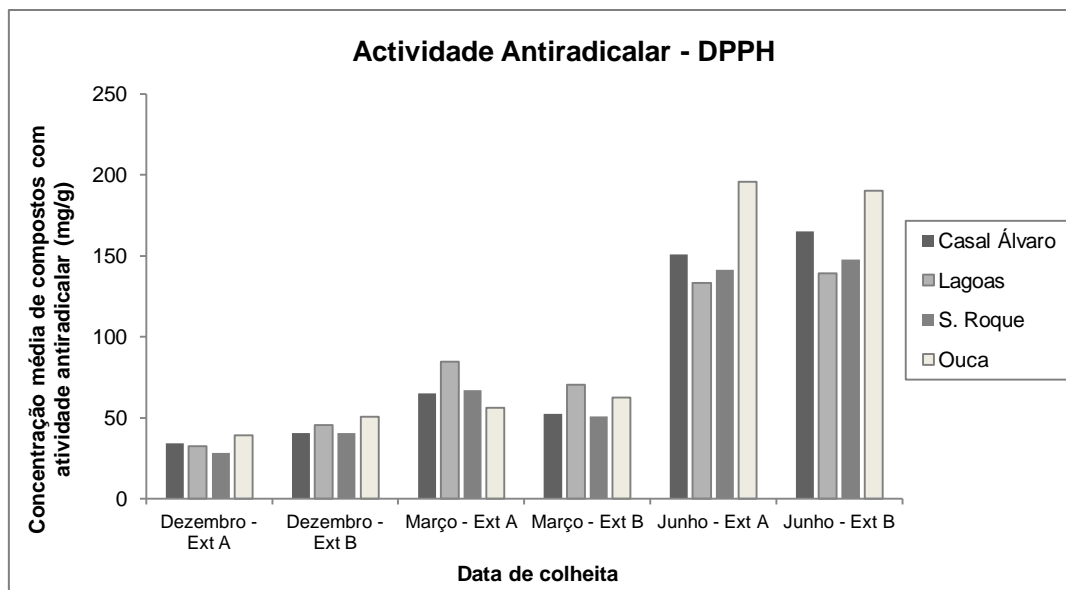


Figura 4.3 - Representação gráfica dos valores médios de concentração de compostos com capacidade de sequestração do radical DPPH (mg EAG/g) para cada apiário, para os extratos A e B das amostras recolhidas nas diferentes datas.

Considerando o teste de FRAP, que visa quantificar os compostos com atividade redutora de ferro, verifica-se que o comportamento das amostras de assemelha ao teste de Folin-Ciocalteu – valor médio da concentração de compostos quase duplica em junho, relativamente a dezembro e março (como seria esperado).

Para os extratos de dezembro, verifica-se que o extrato B apresenta valores médios de concentração relativamente mais baixos que o extrato A. Além disso, o apiário de São Roque apresenta uma concentração média de compostos redutores inferior aos restantes apiários, para o extrato A, enquanto para o extrato B, é o apiário de Lagoas que apresenta menor valor. O extrato B apresenta valores mais próximos entre os diferentes apiários, comparativamente com o extrato A da mesma data.

Em relação a março, verifica-se que os valores médios da concentração de compostos redutores são próximos, destacando-se Ouca ligeiramente superior. Para o extrato B, não se verifica o destaque de nenhum apiário em particular, sendo que todos apresentam valores próximos quanto à quantidade de compostos antioxidantes. Comparando ambos os extratos, é notório que o extrato A apresenta valores médios de concentração superiores a B, sendo Ouca o apiário com valor mais elevado. Não se verifica unanimidade quanto ao apiário com menor concentração média para esta data.

Para os extratos de junho, verifica-se um grande aumento na concentração média de compostos com atividade antioxidante relativamente às amostragens de dezembro e março. No entanto, verificam-se algumas diferenças entre o extrato A e B do mesmo apiário. No caso

desta amostragem, o apiário de Ouca apresenta menor concentração média de antioxidantes para ambos os extratos. Porém, o extrato A do apiário de Casal Álvaro apresenta maior concentração média de antioxidantes contra o extrato B do apiário de Lagoas (figura 4.4).

O método de FRAP permitiu determinar a concentração média de compostos com capacidade redutora do íão ferro nos extratos de própolis das diferentes datas. Para as amostras de dezembro, obteve-se uma concentração média entre 2,33 mmol/g e 2,69 mmol/g; para as amostras de março, a concentração média variou entre 1,99 mmol/g e 2,20 mmol/g e para as amostras de junho, os valores variaram numa gama entre 4,16 mmol/g e 5,01 mmol/g de extrato. Noutros países como o Irão, o própolis apresentou valores de concentração médios de compostos com capacidade redutora compreendidos entre 31,5 $\mu\text{M/g}$ e 1650 $\mu\text{M/g}$ (Mohammadzadeh *et al*, 2007). No Brasil, a concentração média destes compostos variou entre 528 $\mu\text{mol/g}$ e 2068 $\mu\text{mol/g}$.

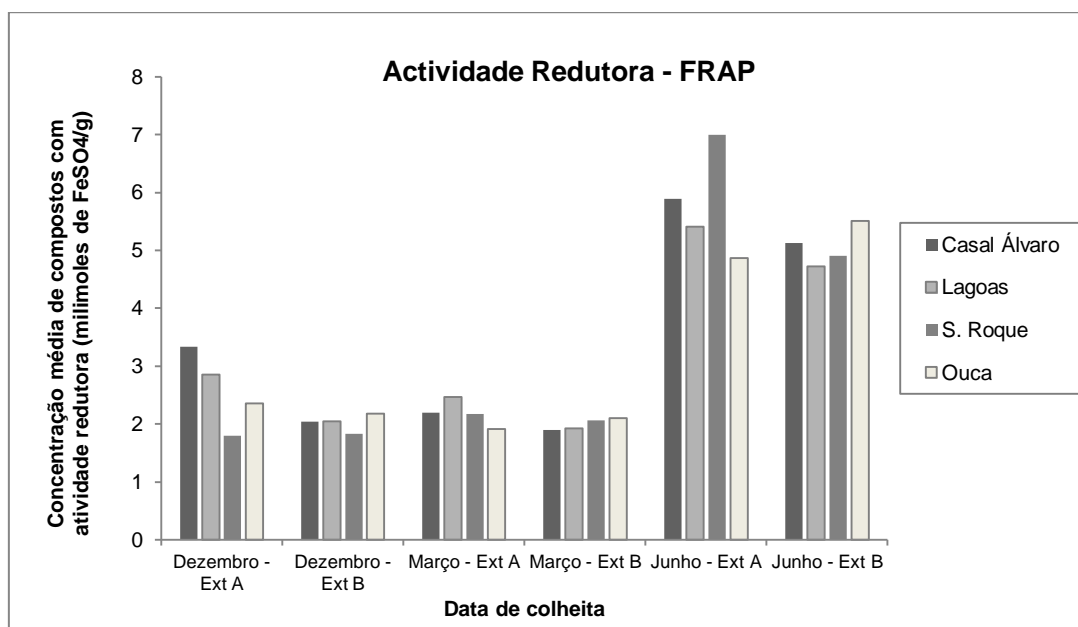


Figura 4.4 - Representação gráfica dos valores médios de concentração de compostos com capacidade de redução férrica (mmol/g) para cada apiário, para os extratos A e B das amostras recolhidas nas diferentes datas.

4.2.5. Apresentação de resultados de cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa (GC-MS)

Após a quantificação dos compostos antioxidantes nas amostras dos diferentes apiários para as diferentes datas de colheita, verificou-se que, de fato, existe uma grande variação destes compostos entre datas (nomeadamente de dezembro e março para junho). Procedeu-se ao fracionamento dos extratos brutos em acetato de etilo, de modo a analisar as amostras e verificar a variação química do própolis.

Dado que existe uma grande variação na quantidade de compostos antioxidantes nas amostras, aumentando de dezembro para junho, procedeu-se à análise espectroscópica das amostras por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa de modo a identificar os compostos que mais se destacam e que são responsáveis por essa variação, ou seja, identificação dos compostos antioxidantes da matriz.

Analisando um cromatograma representativo das frações de acetato de etilo das amostras (Figura 4.5), verifica-se a existência de vários picos com relativa significância e que representam compostos responsáveis pelas características antioxidantes do própolis.

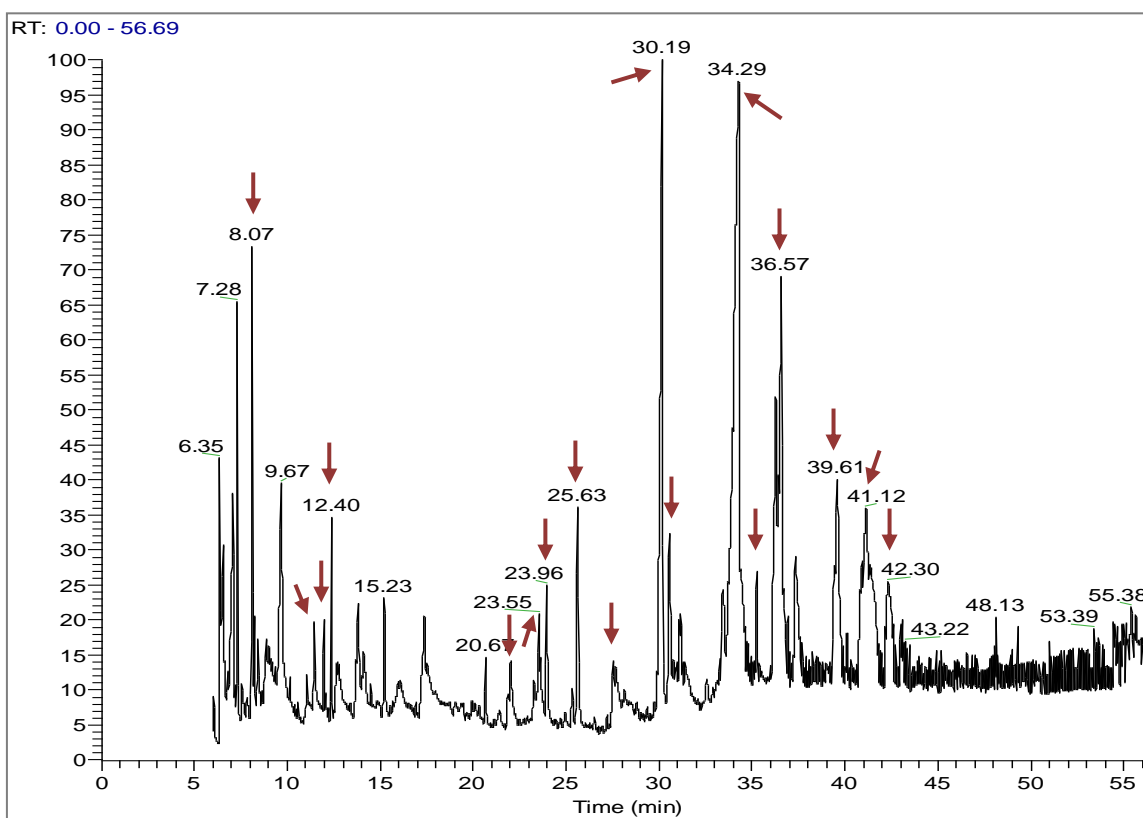


Figura 4.5 - Cromatograma correspondente à fração de acetato de etilo da amostra da colmeia 2 de Ouca, recolhida em Julho (cromatograma representativo das amostras de própolis analisada), com indicação dos picos identificados e caracterizados.

Os picos de interesse, a janela de retenção e respetiva identificação e o peso molecular da estrutura estão apresentados na Tabela 4.45.

Tabela 4.45 - Compostos tentativamente identificados na fração de acetato de etilo das amostras analisadas.

| Pico nº | Janela de retenção (min.) | Nome do composto | Peso molecular | Grupo Funcional |
|---------|---------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------|------------------------------|
| 1 | 8,06-8,08 | 2-metoxi-4-vinilfenol | 150 | Derivado fenólico |
| 2 | 11,43 | Guaieno (e isómeros) | 204 | Sesquiterpeno |
| 3 | 11,94 | | | |
| 4 | 12,40 | | | |
| 5 | 22,02 | Ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propenóico (e isómeros) | 262 | Ácido hidroxicinâmico |
| 6 | 23,54 | | | |
| 7 | 23,94 | | | |
| 8 | 25,62 | | | |
| 9 | 27,56 | 2,6-hidroxi-4-metoxi-chalcona | 269 | Derivado fenólico (chalcona) |
| 10 | 30,04 | | | |
| 11 | 30,54 | Cinamilcinamato (ou isómero) | 269 | Éster de ácido cinâmico |
| 12 | 34-34,28 | Dihidrocrisina | 256 | Derivado fenólico (flavona) |
| 13 | 35,25 | Tectocrisina | 268 | Derivado fenólico (flavona) |
| 14 | 36,53 | | | |
| 15 | 39,58 | Crisofanol (isómero da crisina) | 254 | Derivado fenólico (flavona) |
| 16 | 41,09 | Crisina | 254 | Derivado fenólico (flavona) |
| 17 | 42,36 | 1,3,8-trihidroxi-3-metil antraquinona (derivado do crisofanol) | 270 | Derivado fenólico (flavona) |

Os compostos listados na Tabela 4.45 foram identificados por recorrência a uma biblioteca *on-line* que permite aceder a uma base de dados com cromatograma de compostos padrão (figuras 4.6 a 4.16). No entanto, é necessário considerar que a identificação feita não é exata pelo que a identificação dos compostos foi feita por comparação mais semelhante do cromatograma da amostra com os cromatogramas de padrões da biblioteca digital.

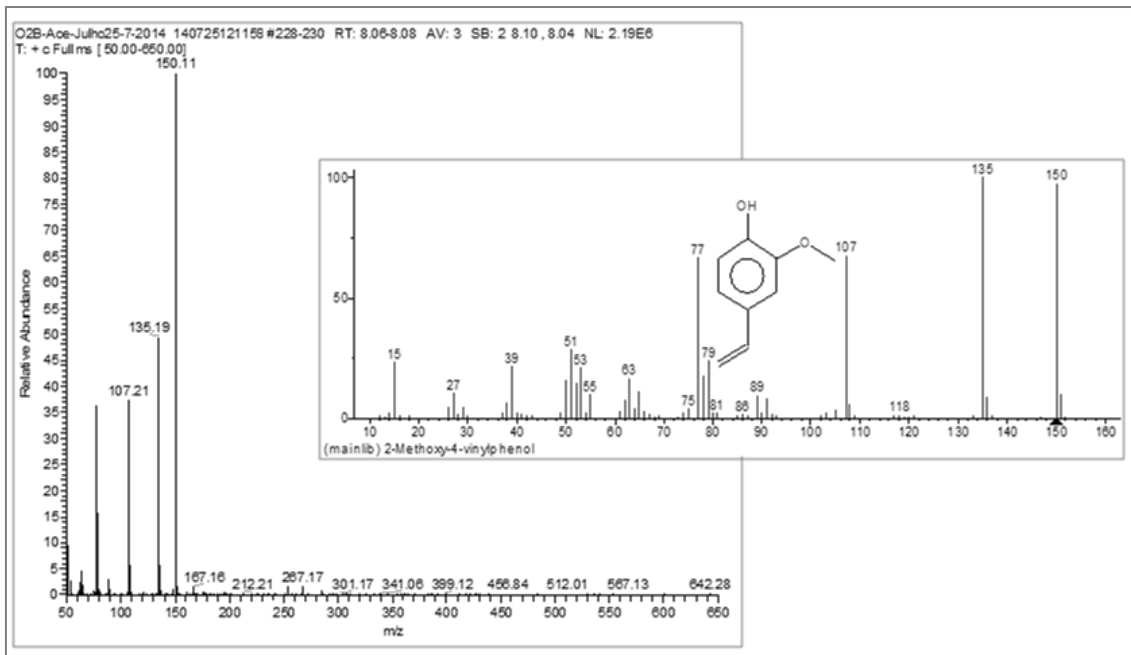


Figura 4.6 - Identificação do composto do pico 1 por comparação com um cromatograma padrão da biblioteca digital.

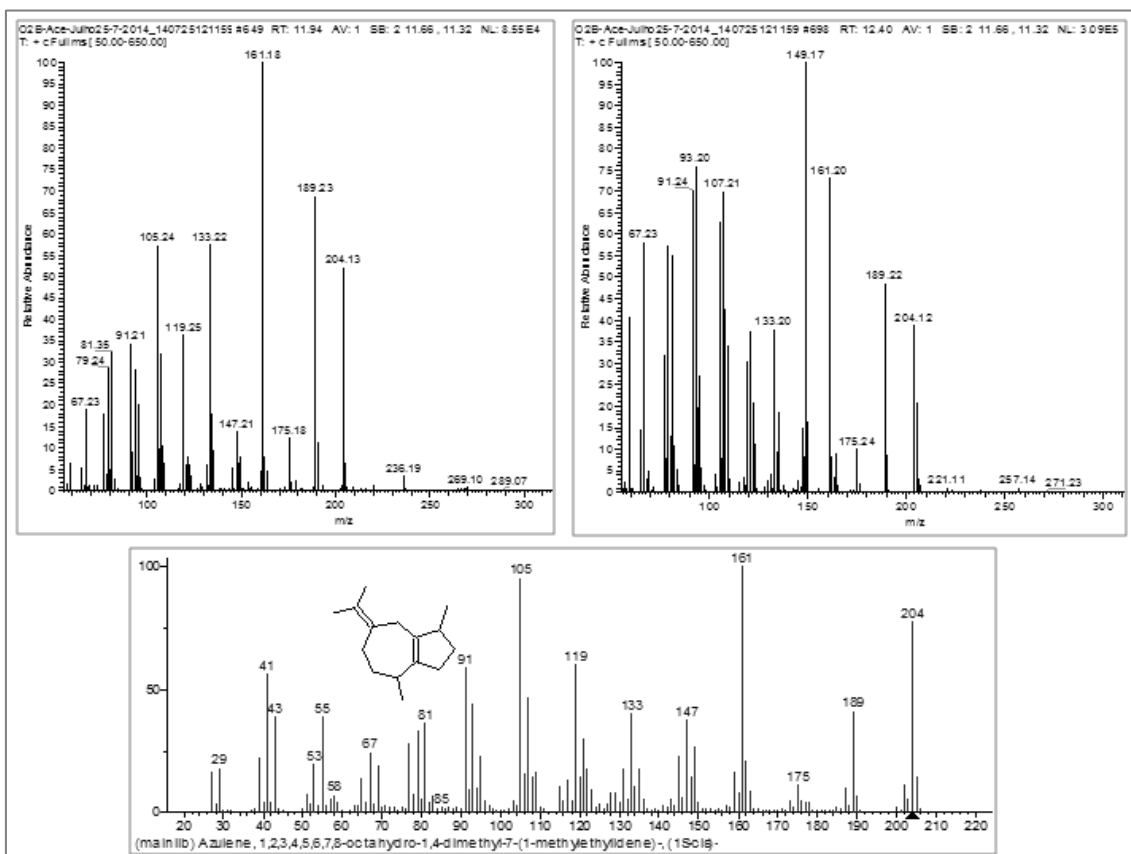


Figura 4.7 - Identificação dos compostos dos picos 3 e 4 por comparação com cromatogramas padrão da biblioteca digital (exemplo de um composto possível).

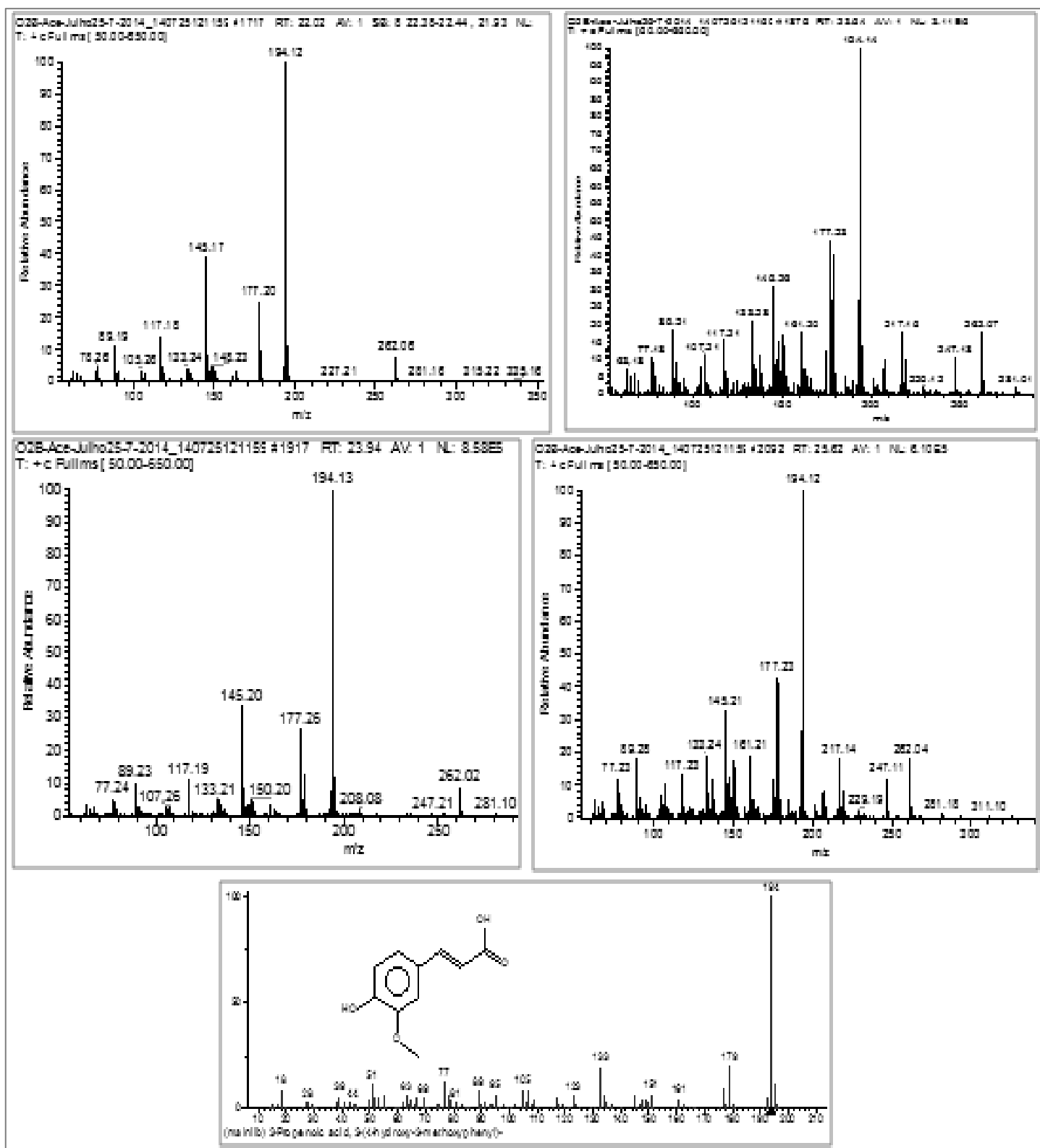


Figura 4.8 - Identificação dos compostos dos picos 5, 6, 7 e 8 por comparação com cromatogramas padrão da biblioteca digital (sugestão de um composto possível).

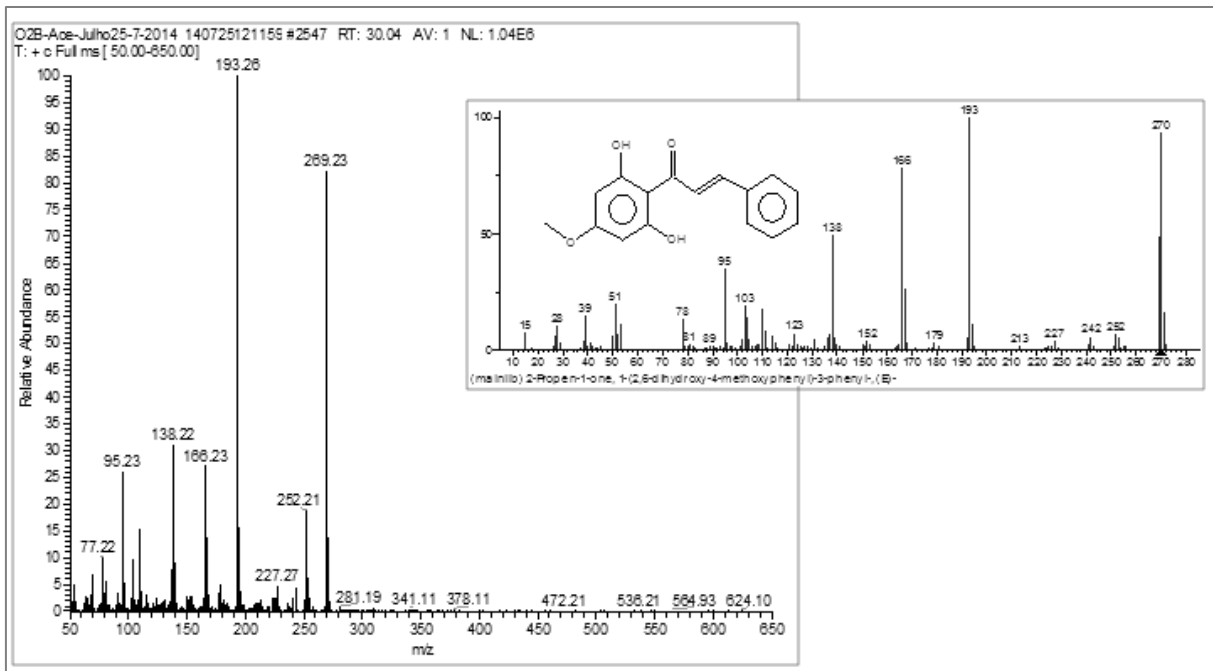


Figura 4.9 - Identificação do composto do pico 10 por comparação com um cromatograma padrão da biblioteca digital.

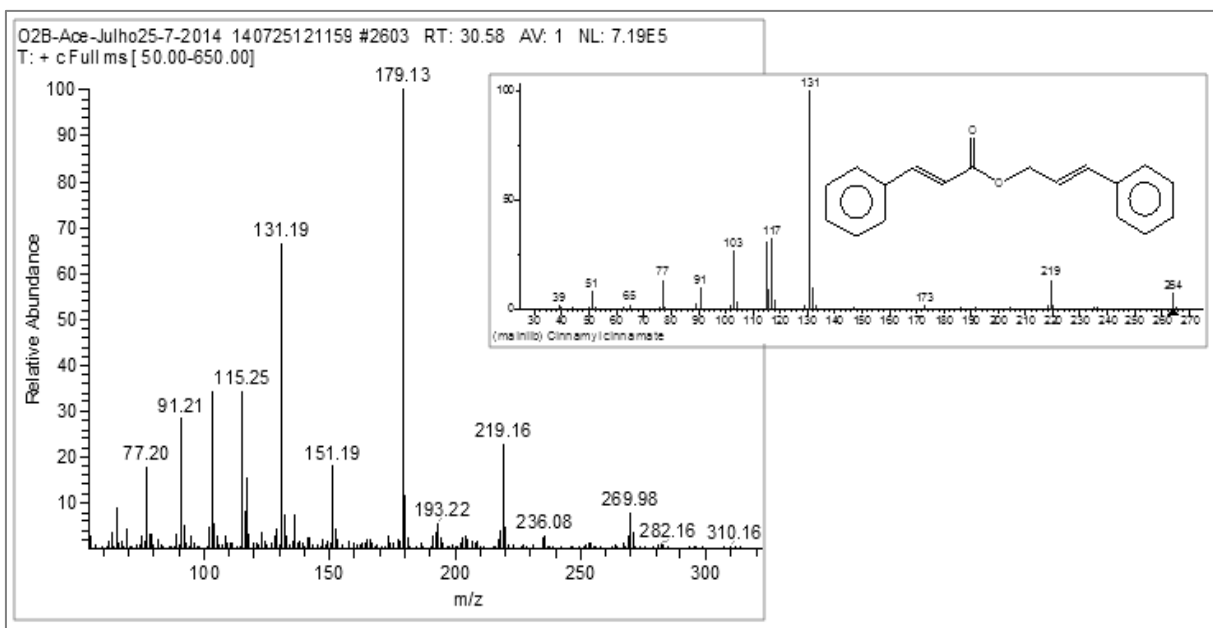


Figura 4.10 - Identificação do composto do pico 11 por comparação com um cromatograma padrão da biblioteca digital.

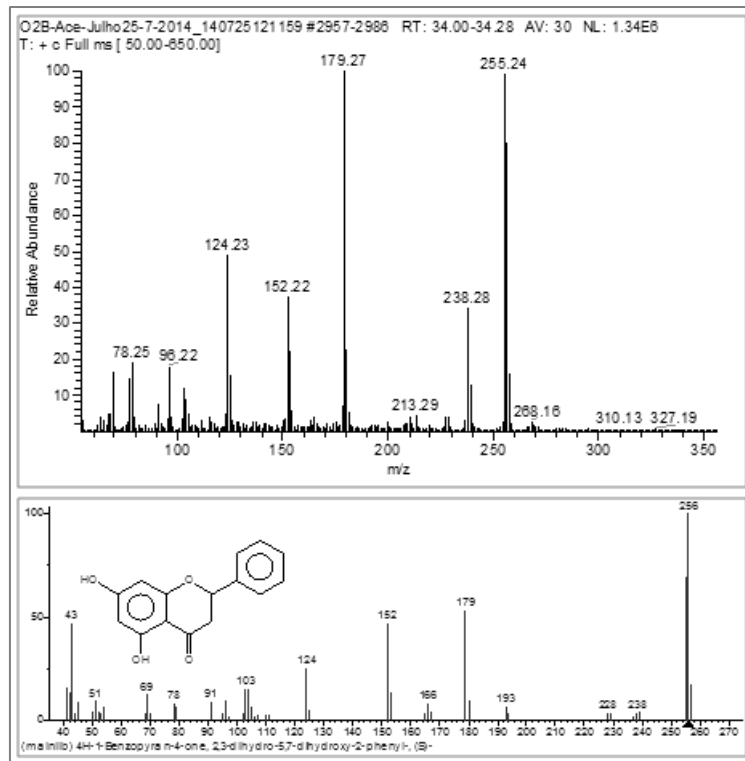


Figura 4.11 - Identificação do composto do pico 12 por comparação com um cromatograma padrão da biblioteca.

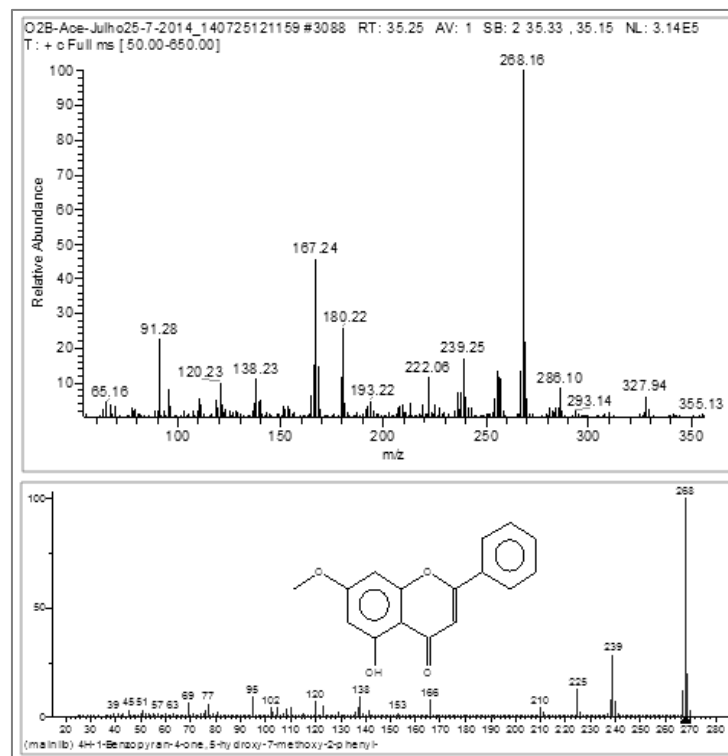


Figura 4.12 - Identificação do composto do pico 13 por comparação com um cromatograma da biblioteca.

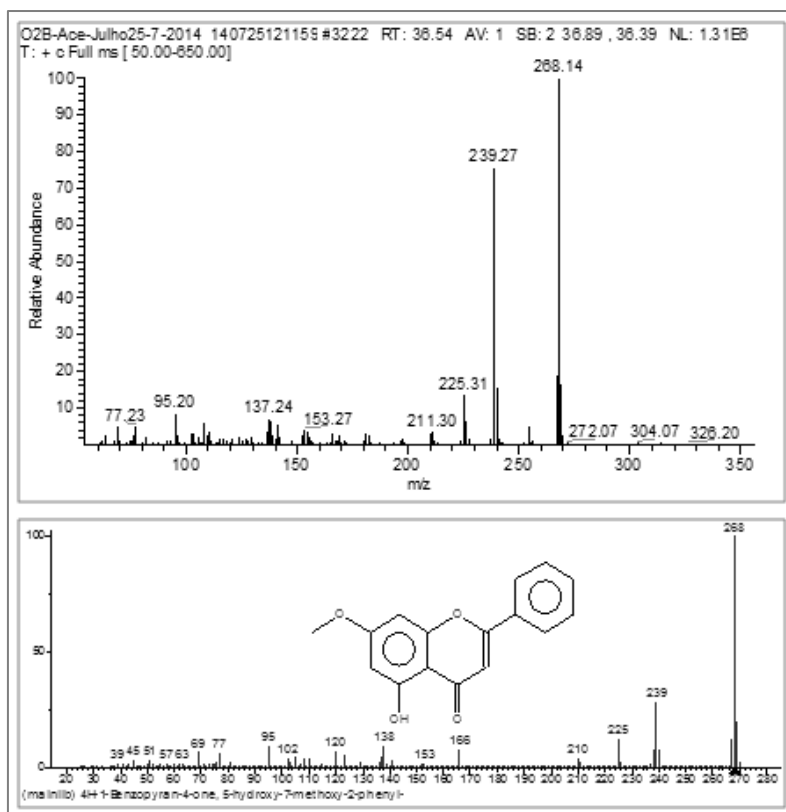


Figura 4.13 - Identificação do composto do pico 14 por comparação com um cromatograma padrão da biblioteca.

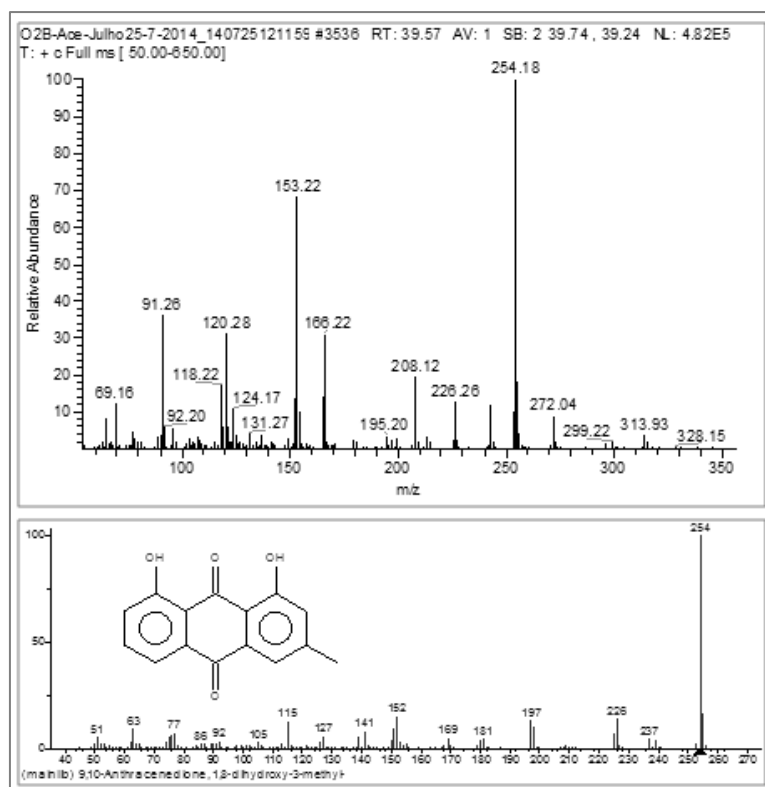


Figura 4.14 - Identificação do composto do pico 15 por comparação com um cromatograma padrão da biblioteca.

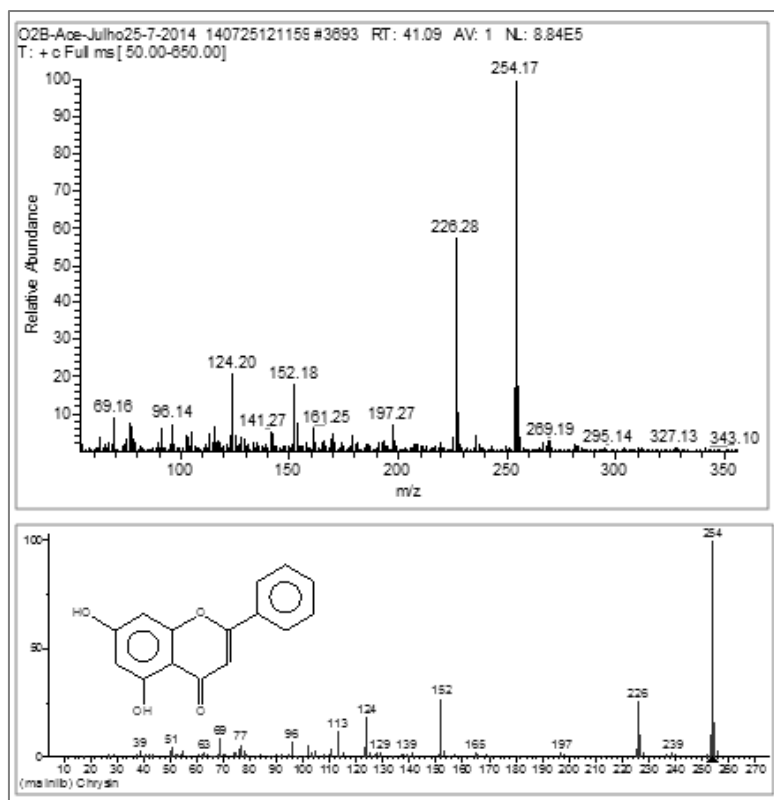


Figura 4.15 - Identificação do composto do pico 16 por comparação com um cromatograma padrão da biblioteca.

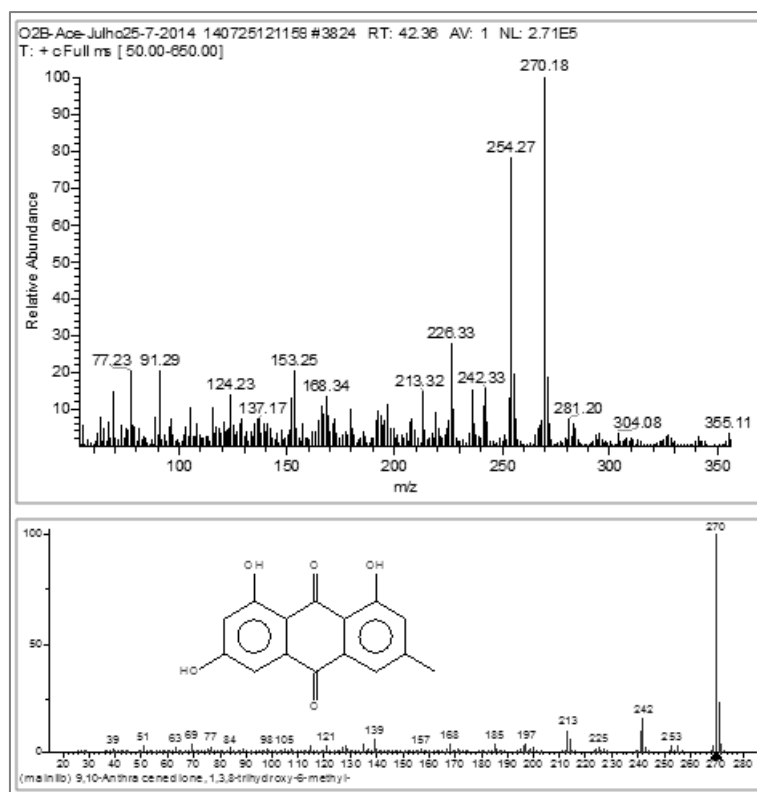


Figura 4.15 - Identificação do composto do pico 17 por comparação com um cromatograma padrão da biblioteca.

Soares (2002) identificou as flavonas, chalconas e cumarinas (derivados do ácido cinâmico) como sendo derivados de compostos fenólicos, com atividade antioxidante. Assim sendo, os compostos identificados podem dividir-se em três grupos: terpenos, compostos fenólicos (e seus derivados) e ácidos cinâmicos (e seus derivados).

Diversos autores identificaram compostos como crisina (e seus derivados fenólicos) e ácidos cinâmicos (e seus derivados fenólicos) em amostras de própolis de diversos pontos distintos do globo como Portugal, China e Brasil. No entanto, e devido à grande diversidade e heterogeneidade do própolis, os derivados de compostos fenólicos e dos ácidos cinâmicos bem como os terpenos existentes na matriz analisada podem variar muito de local para local, até mesmo dentro do mesmo país.

Observando a figura 4.17, é possível observar que há uma grande diferença na abundância relativa dos compostos para as diferentes datas sendo que também se pode observar que existem compostos que estão sempre presentes e outros compostos que variam entre as diferentes colheitas.

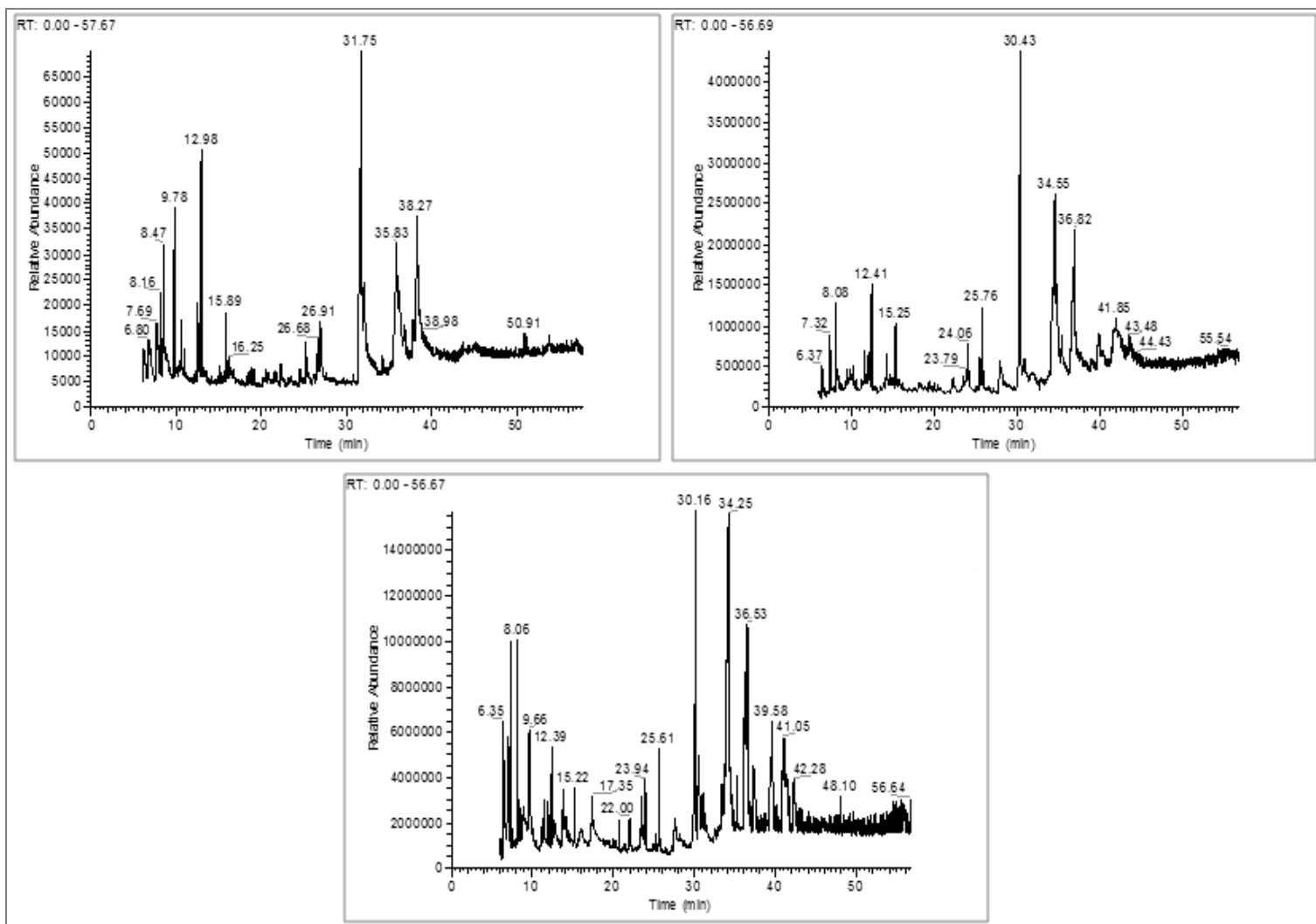


Figura 4.17 - Cromatogramas representativos da variação química do própolis nas diferentes datas de colheita. Amostra da colmeia 2 do apiário de Ouca (da esquerda para a direita: dezembro, março e junho).

O trabalho desenvolvido nessa dissertação foi de encontro aos objetivos inicialmente estabelecidos, em que se pretendia estudar a variação do poder antioxidante e da composição química do própolis, de acordo com a sua data de colheita.

Primeiramente, estudou-se o efeito do solvente na extração de compostos antioxidantes de uma matriz de própolis, anteriormente estudada nos nossos laboratórios. Foi escolhida uma amostra de própolis proveniente da Mealhada e, para os extratos brutos, utilizaram-se etanol e acetona em diferentes graus de pureza (puro, 80% v/v e 70% v/v em água destilada). Determinou-se o rendimento de extração, a concentração em compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu e a concentração de compostos antioxidantes pelo método de sequestração do radical DPPH. Por análise dos resultados obtidos, conclui-se que, quanto maior for a quantidade de água no solvente, menor é o rendimento de extração. No entanto, pelos testes colorimétricos efetuados aos extratos, verificou-se que o rendimento de extração não tem influência direta nos compostos extraídos da matriz de própolis.

A variação da atividade antioxidante e da composição química de acordo com a data de colheita do própolis foi estudada em amostras provenientes de quatro apiários de localidades distintas da zona do Caramulo: Casal Álvaro, Lagoas, Ouca e São Roque. Foram recolhidas três amostras de três colmeias distintas de cada um dos apiários, em três datas diferentes: dezembro de 2013, março e junho de 2014. Foram feitos dois extratos etanólicos (extratos A e B) a partir de cada amostra de própolis, que foram conservados no frio. Alguns dos extratos (maioritariamente extratos de amostras de dezembro) necessitaram de filtração antes da sua utilização por apresentarem um precipitado que se assumiu como sendo ceras e outras moléculas orgânicas.

O estudo iniciou-se pela determinação do rendimento de extração dos extratos etanólicos das amostras do Caramulo. Verificou-se um aumento significativo nos valores médios do rendimento ao longo do tempo, destacando-se mais as amostras de junho. Para as amostras de dezembro, o rendimento médio de extração variou entre 44,94% e 79,06%; para as amostras de março, o mesmo parâmetro variou entre 51,14% e 78,44% e para as amostras de junho, o rendimento médio de extração oscilou entre 73,69% e 95,40%.

Seguidamente, determinou-se a concentração de compostos fenólicos nas amostras pelo método de Folin-Ciocalteu, a concentração de compostos com atividade antiradicalar para o radical DPPH e a concentração de compostos com capacidade redutora do ião ferro (FRAP). Os três métodos foram aplicados a todas as amostras e verificou-se que a concentração média de compostos fenólicos e a concentração média de compostos com capacidade redutora quase

duplicaram das amostras de dezembro e março para junho. Contudo, a concentração média de compostos com ação antirradicalar foi aumentando gradualmente ao longo do tempo.

A atividade antioxidante do própolis foi determinada por diferentes métodos colorimétricos, em que cada um destes consiste na identificação de um determinado grupo de compostos presentes numa matriz. Por análise dos conjuntos de resultados obtidos, verifica-se que os mesmos são consistentes entre si, ou seja, a evolução da concentração média de cada conjunto de compostos é idêntica nos diferentes testes para as diferentes datas de colheita do própolis.

Tendo em conta os resultados obtidos, verifica-se que o rendimento médio de extração e a concentração de compostos antioxidantes aumenta das amostras de dezembro para as amostras de junho.

O aumento do rendimento médio de extração pode dever-se ao aumento da quantidade de compostos solúveis na matriz ou à diminuição da concentração de materiais inertes que possam interferir na extração dos compostos fenólicos, impedindo a sua solubilização. Como apenas as amostras de dezembro formaram precipitado, pode concluir-se que o própolis recolhido nessa altura do ano é mais rico em ceras.

O aumento da concentração de compostos com atividade antioxidante ao longo do período de tempo estudado pode estar relacionado com diversos fatores. Um fator muito importante é o facto de, de dezembro para junho, a flora se tornar mais abundante aumentando assim os pontos de recolha de ceras, seivas e outros produtos utilizados na produção do própolis (FNAP, 2010). A escassez de flora nas épocas mais frias poderá ser uma condicionante à recolha de resinas, diminuindo a variabilidade de compostos no própolis. A espécie de abelhas predominante em Portugal (e na Europa) é a *Apis mellifera*, que possui diversas subespécies e essas diferenças genéticas podem explicar as diferenças entre as amostras das mesmas colmeias ao longo do tempo, as diferenças entre colmeias do mesmo apiário e as diferenças entre apiários da mesma zona geográfica, quer para a mesma data, quer para datas diferentes de recolha das amostras (Salatino *et al*, 2011).

Tendo em conta os dados bibliográficos recolhidos, pode verificar-se que, para o teste de Folin-Ciocalteu, a concentração de compostos fenólicos totais determinada a partir das amostras analisadas se encontra dentro da gama de valores identificados para o própolis português e da China. Contudo, as amostras analisadas mostram uma gama de valores médios superior aos do Brasil (grande produtor mundial). Quanto ao teste de compostos antirradicalares (DPPH), os resultados médios obtidos são superiores aos dados bibliográficos do própolis português. A quantidade média de compostos com capacidade redutora de ferro (método de FRAP) revelou-se superior nas amostras analisadas, comparativamente aos resultados feitos em testes com própolis do Irão e do Brasil.

De modo a analisar a variação da composição química do própolis ao longo do período de tempo estudado (de dezembro a junho), procedeu-se à análise dos extratos por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa (GC-MS). Procedeu-se, então, ao fracionamento de uma alíquota de cada extrato bruto com acetato de etilo. Após o fracionamento, as amostras foram analisadas por GC-MS. Tendo em conta o conjunto de cromatogramas, verificou-se que existem diferenças na abundância relativa dos compostos nas amostras. Os picos dos cromatogramas apresentaram tempos de retenção muito semelhantes (independentemente da data de colheita) pelo que se procedeu à análise de um cromatograma representativo (colmeia 2 do apiário de Ouca) no qual se identificaram 17 possíveis compostos presentes, que se agruparam em três famílias diferentes de compostos conhecidos como antioxidantes e já identificados em amostras de própolis por todo o mundo: terpenos, compostos fenólicos (e derivados) e ácido cinâmico (e derivados) (Soares, S. 2002; Guo, X. *et al* 2011; Gomez-Caravaca *et al* 2007).

Perspectivando sobre um futuro próximo, será de grande interesse estudar a variação da atividade antioxidante do própolis e a avaliação da sua composição ao longo de um período de um ano, com amostras recolhidas mensalmente, de modo a ser possível uma caracterização mais pormenorizada do própolis, podendo assim estabelecer uma composição *standart* do própolis português. Devido à abundância de compostos antioxidantes no própolis, poderá proceder-se a uma caracterização química desses compostos, podendo depois testá-los quanto a outras propriedades dos mesmos, nomeadamente contra microrganismos. O facto de o própolis ser um poderoso antioxidante natural, será de grande interesse desenvolver conservantes alimentares a partir desta matriz, nomeadamente de fruta fresca, aumentando assim o seu tempo de vida após colheita, visto que o poder antiradicalar também se revelou alto no própolis analisado.

Capítulo VI Anexos

Anexo I – Dados obtidos com o teste de determinação da concentração de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu, para todas as amostras analisadas

Tabela 6.6 – Apresentação dos valores de absorvância medidos para as soluções-padrão de ácido gálico segundo o método de Folin-Ciocalteu, a 765 nm.

| Concentração (ppm) | Ensaio 1 | Ensaio 2 | Ensaio 3 | Média |
|--------------------|----------|----------|----------|-------|
| 12,3 | 0,088 | 0,096 | 0,089 | 0,091 |
| 30,75 | 0,176 | 0,193 | 0,203 | 0,191 |
| 61,5 | 0,321 | 0,363 | 0,373 | 0,352 |
| 100 | 0,548 | 0,538 | 0,538 | 0,541 |
| 123 | 0,752 | 0,682 | 0,725 | 0,720 |
| 184,5 | 0,995 | 0,993 | 1,108 | 1,032 |

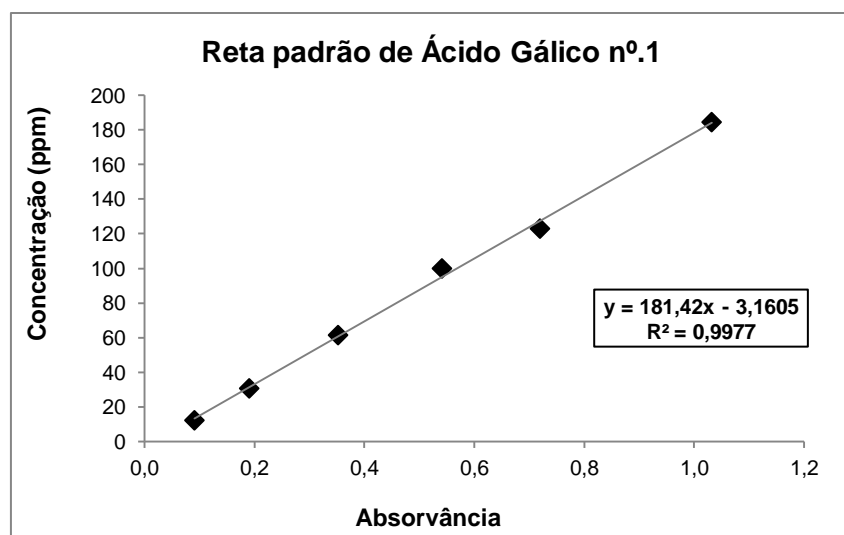


Figura 6.1 - Representação gráfica dos valores de absorvância em função da concentração padrão de ácido gálico. Reta de calibração para determinar concentração da amostra A (Mealhada, Buçaco) e dos extratos A e B (zona do Caramulo).

Tabela 6.7 - Apresentação dos valores de absorvância medidos para as soluções-padrão de ácido gálico para o teste de Folin-Ciocalteu a 765 nm.

| Concentração (ppm) | Abs 1 | Abs 2 | Média |
|--------------------|-------|-------|-------|
| 12,3 | 0,089 | 0,093 | 0,091 |
| 61,5 | 0,321 | 0,314 | 0,331 |
| 184,5 | 1,052 | 0,997 | 1,025 |

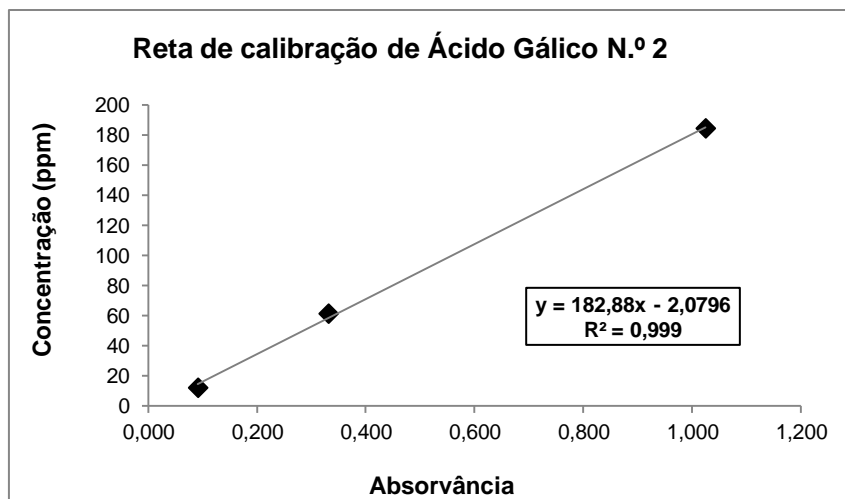


Figura 6.2 - Representação gráfica da absorvância em função da concentração da solução-padrão de ácido gálico. Reta utilizada para determinação da concentração dos extratos A e B de março.

Tabela 6.8 - Apresentação dos valores de absorvância medidos para as soluções-padrão de ácido gálico, segundo o método de Folin-Ciocalteu a 765 nm.

| Concentração (ppm) | Abs 1 | Abs 2 | Abs 3 | Abs média |
|--------------------|-------|-------|-------|--------------|
| 12,3 | 0,119 | 0,109 | 0,112 | 0,113 |
| 30,75 | 0,215 | 0,224 | 0,213 | 0,217 |
| 61,5 | 0,418 | 0,419 | 0,421 | 0,419 |
| 100 | 0,613 | 0,616 | 0,579 | 0,603 |
| 123 | 0,746 | 0,735 | 0,765 | 0,749 |
| 184,5 | 1,150 | 1,160 | 1,092 | 1,134 |

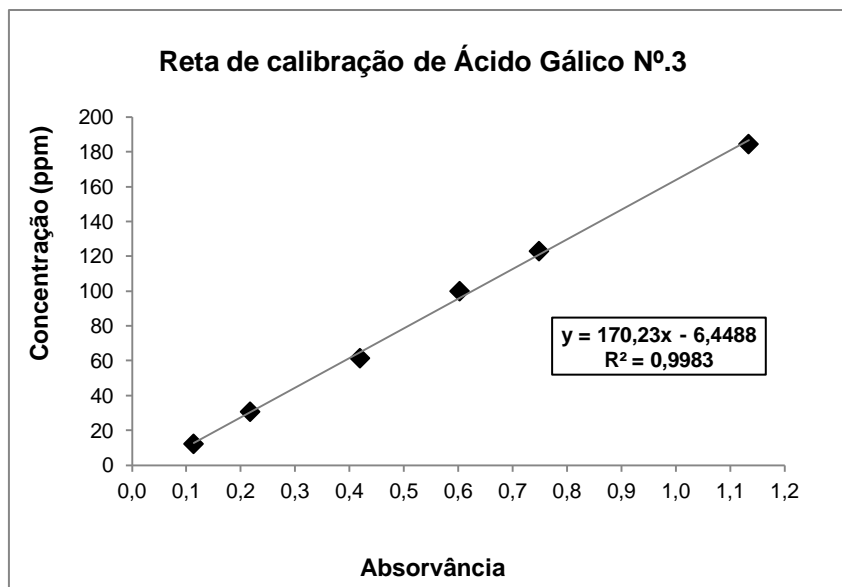


Figura 6.3 - Representação gráfica da absorvância em função da concentração padrão de ácido gálico, pelo método de Folin-Ciocalteu. Reta utilizada para determinar a concentração para os Extratos A e B de junho.

Anexo II – Dados obtidos com o teste de determinação da concentração de compostos com capacidade de sequestração do radical DPPH, para todas as amostras analisadas

Tabela 6.9 - Apresentação dos valores de absorvância medidos para as soluções-padrão de ácido gálico, segundo o método de DPPH (a 517 nm).

| Concentração (ppm) | Abs 1 | Abs 2 | Abs 3 | Abs Média |
|--------------------|-------|-------|-------|--------------|
| 12,5 | 0,999 | 0,997 | 0,993 | 0,996 |
| 30,75 | 0,728 | 0,727 | 0,723 | 0,726 |
| 50 | 0,540 | 0,561 | 0,550 | 0,550 |
| 61,5 | 0,395 | 0,398 | 0,394 | 0,396 |
| Branco | 1,195 | 1,198 | 1,195 | 1,196 |

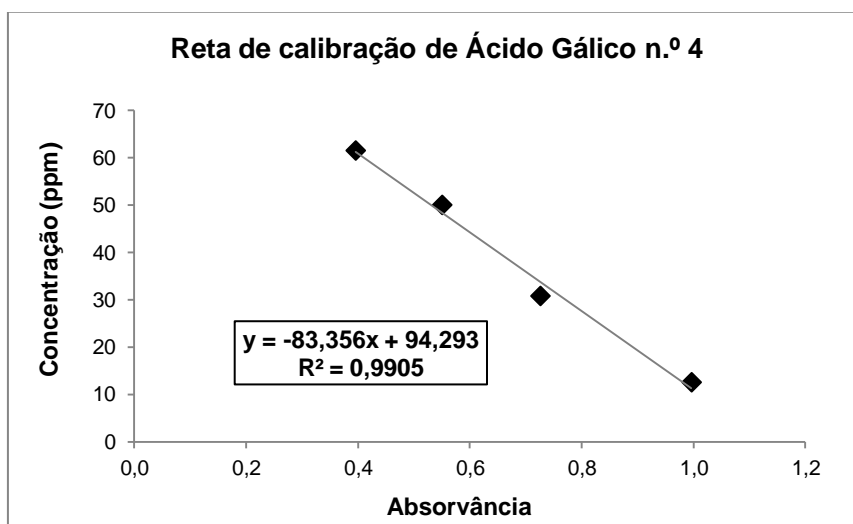


Figura 6.4 - Representação gráfica da absorvância em função da concentração da solução-padrão de ácido gálico, utilizada para determinar a concentração dos Extratos A e B de dezembro.

Tabela 6.10 - Apresentação dos valores de absorvância medidos para as soluções-padrão de ácido gálico, segundo o método de DPPH (a 517 nm).

| Concentração (ppm) | Abs 1 | Abs 2 | Abs 3 | Abs média |
|--------------------|-------|-------|-------|--------------|
| 25 | 1,072 | 1,092 | 1,08 | 1,081 |
| 30,75 | 0,991 | 1,002 | 1,003 | 0,999 |
| 50 | 0,744 | 0,756 | 0,747 | 0,749 |
| 61,5 | 0,587 | 0,6 | 0,595 | 0,594 |
| 75 | 0,424 | 0,429 | 0,434 | 0,429 |
| 92,25 | 0,301 | 0,291 | 0,302 | 0,298 |
| Branco | 1,320 | 1,323 | 1,327 | 1,323 |

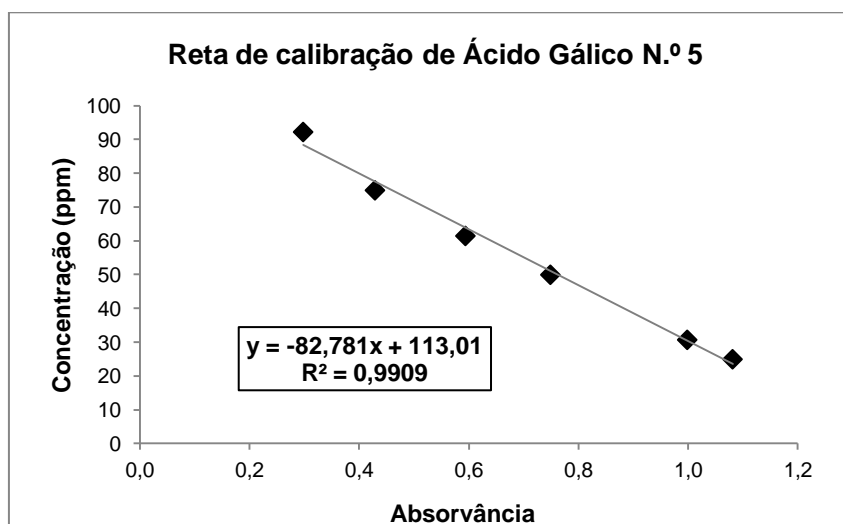


Figura 6.5 - Representação gráfica da absorvância em função da concentração da solução-padrão, utilizada para determinar a concentração da Amostra A (Mealhada, Buçaco) e dos Extratos A e B de março.

Tabela 6.11 - Apresentação dos valores de absorvância medidos para as diferentes concentrações de solução-padrão de ácido gálico de acordo com o método do DPPH, a 517 nm.

| Concentração (ppm) | Abs 1 | Abs 2 | Abs 3 | Abs Média |
|--------------------|-------|-------|-------|--------------|
| 25 | 0,98 | 0,968 | 0,98 | 0,976 |
| 30,75 | 0,908 | 0,892 | 0,894 | 0,898 |
| 50 | 0,622 | 0,623 | 0,619 | 0,621 |
| 61,5 | 0,563 | 0,554 | 0,554 | 0,557 |
| 75 | 0,427 | 0,431 | 0,44 | 0,433 |
| 92,25 | 0,251 | 0,261 | 0,247 | 0,253 |
| Branco | 1,224 | 1,234 | 1,225 | 1,228 |

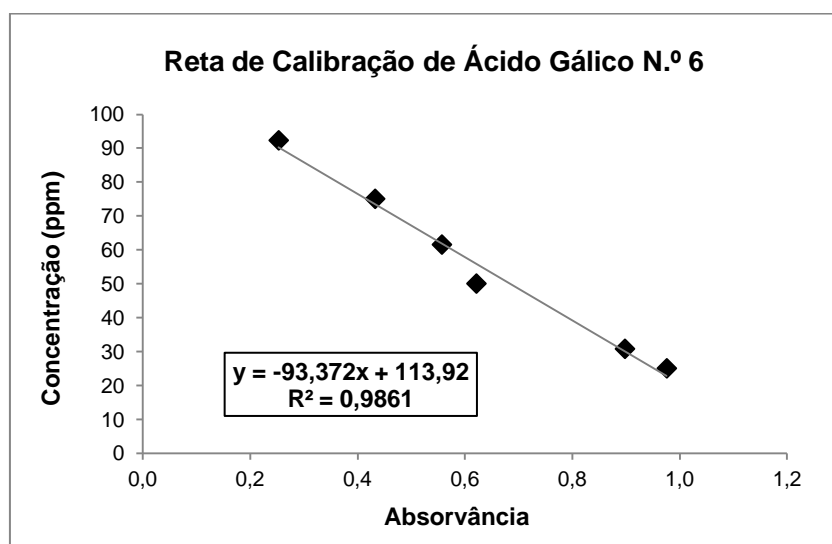


Figura 6.6 - Representação gráfica da absorvância em função da concentração de ácido gálico. Reta utilizada para determinar a concentração dos Extratos A e B de junho.

Anexo III – Preparação do reagente de FRAP

Preparação dos reagentes

| | |
|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tampão acetato | 0,775 g $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (acetato de sódio) 4 ml CH_3COOH (ácido acético glacial) 100 ml de água destilada → Aferir com água destilada para 250 ml |
| Solução de cloreto de ferro | $m=0,2705$ g ($\text{FeCl}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) para 50 ml de água destilada |
| Solução de ácido clorídrico (40 mM) | 0,4 ml de HCl → Aferir para 250 ml com água destilada |
| Solução TPTZ | $m=0,0776$ g (TPTZ) em 25 ml de HCl 40 mM |

Reagente de FRAP

- 100 ml de tampão acetato
 - 10 ml de FeCl_3
 - 10 ml TPTZ
- Colocar em frasco opaco de plástico e manter o frasco em banho quente a 37°C.

Anexo IV – Dados obtidos com o teste de determinação da concentração de compostos com capacidade redutora do íon Fe^{3+} (FRAP), para todas as amostras analisadas

Dezembro

Tabela 6.12 - Apresentação dos valores de absorvância das soluções-padrão de sulfato de ferro (FeSO_4), segundo o método de FRAP, a 593 nm.

| Concentração (mM) | Abs 1 | Abs 2 | Abs 3 | Abs média |
|-------------------|-------|-------|-------|--------------|
| 0,2 | 0,412 | 0,395 | 0,397 | 0,401 |
| 0,4 | 0,53 | 0,542 | 0,512 | 0,528 |
| 0,6 | 0,682 | 0,679 | 0,692 | 0,684 |
| 0,8 | 0,757 | 0,741 | 0,766 | 0,755 |
| 1 | 0,955 | 1,055 | 1,034 | 1,015 |

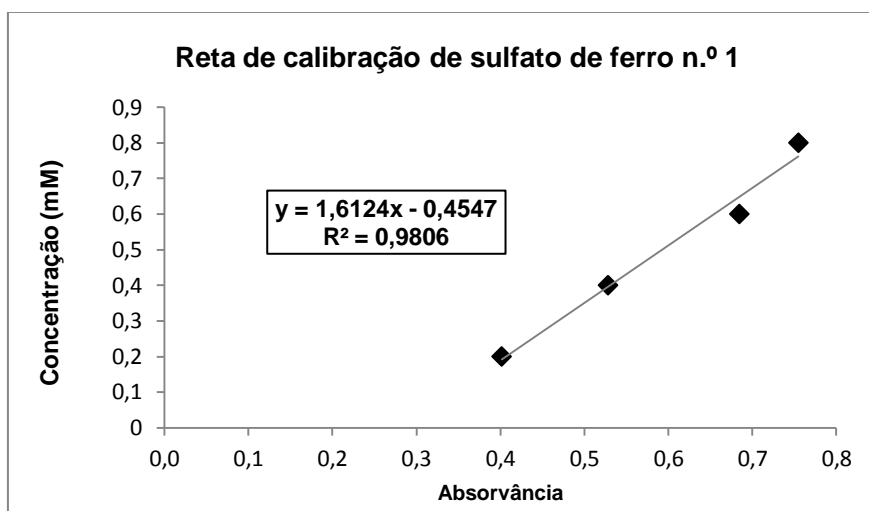


Figura 6.7 - Representação gráfica da reta de calibração para o método de FRAP, da absorvância (média) em função da concentração. Reta utilizada para determinação da concentração dos extratos A e B de dezembro. O ponto correspondente à concentração de 1 mM foi rejeitado por sair da zona de linearidade.

Março

Tabela 6.13 - Apresentação dos valores de absorvância das soluções-padrão de sulfato de ferro, a 593 nm.

| Concentração (mM) | Abs 1 | Abs 2 | Abs 3 | Abs média |
|-------------------|-------|-------|-------|-----------|
| 0,2 | 0,296 | 0,323 | 0,273 | 0,297 |
| 0,4 | 0,449 | 0,415 | 0,421 | 0,428 |
| 0,6 | 0,614 | 0,624 | 0,617 | 0,618 |
| 0,8 | 0,75 | 0,753 | 0,746 | 0,750 |
| 1 | 0,922 | 0,905 | 0,93 | 0,919 |
| Branco | 0,182 | 0,171 | 0,181 | 0,178 |

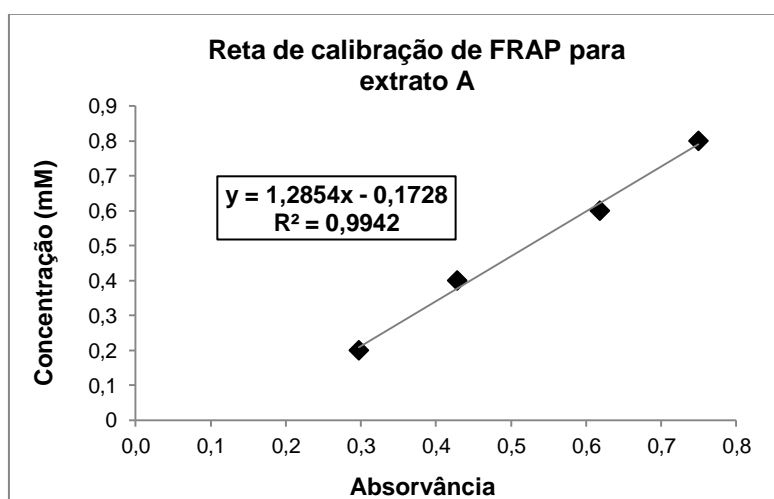


Figura 6.10 - Representação gráfica da absorvância em função da concentração das soluções-padrão de ferro segundo o método de FRAP a 593 nm. Reta utilizada para a determinação da concentração dos extratos A de junho.

Anexo V – Apresentação dos cromatogramas de GC-MS

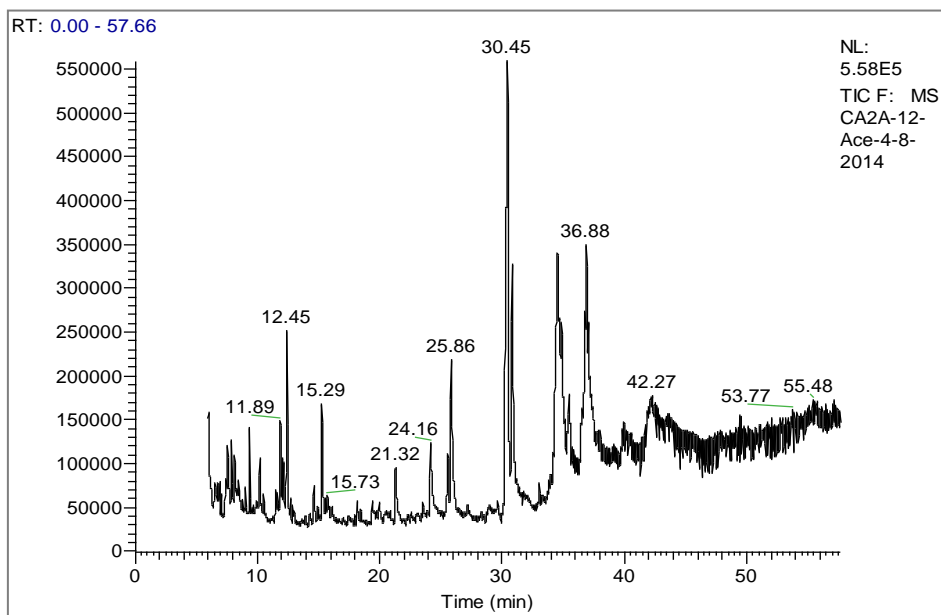


Figura 6.12 - Cromatograma de GC-MS da amostra de dezembro da colmeia 2 do apiário de Casal Álvaro.

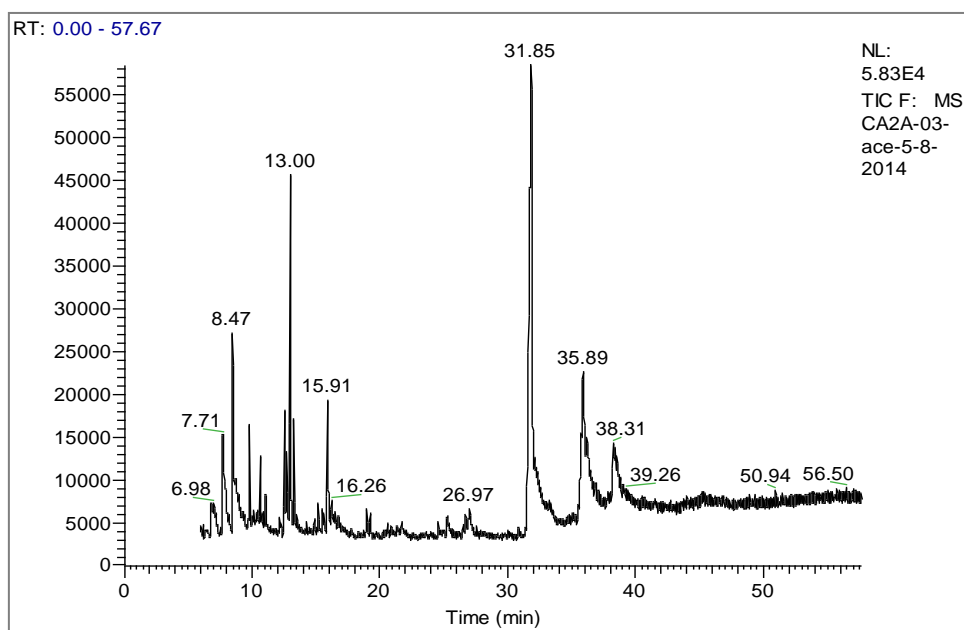


Figura 6.13 - Cromatograma de GC-MS da amostra de março da colmeia 2 do apiário de Casal Álvaro.

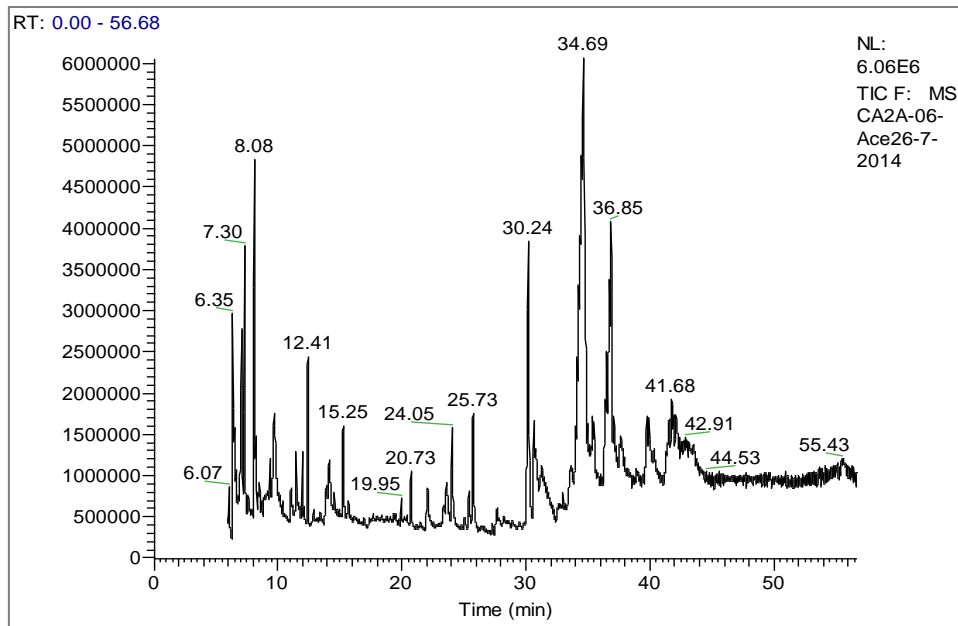


Figura 6.14 - Cromatograma de GC-MS da amostra de junho da colmeia 2 do apiário de Casal Álvaro.

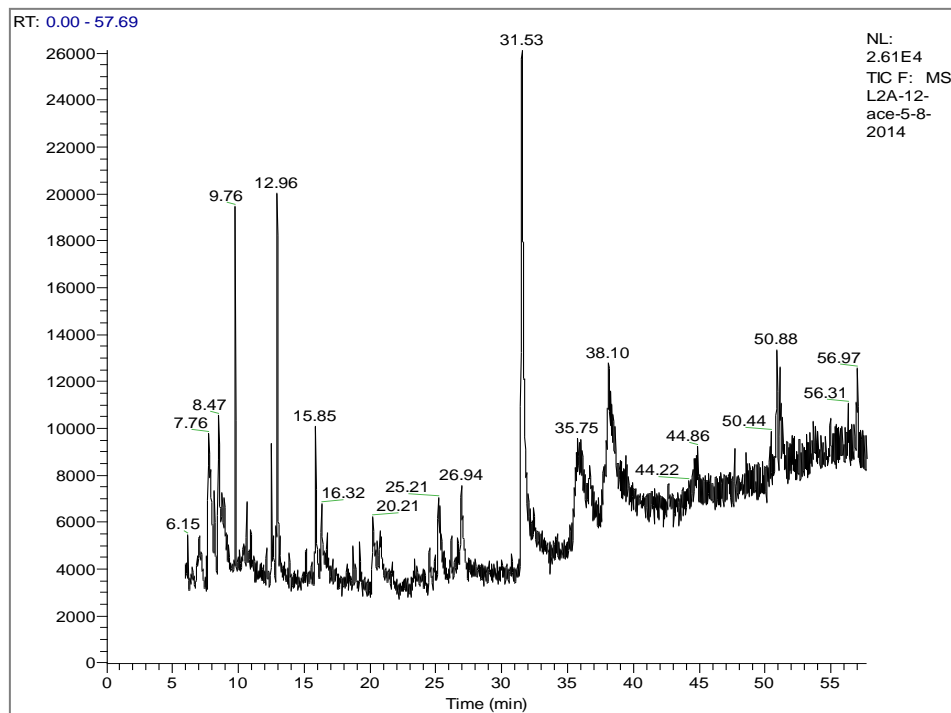


Figura 6.15 - Cromatograma de GC-MS da amostra de dezembro da colmeia 2 do apiário de Lagoas.

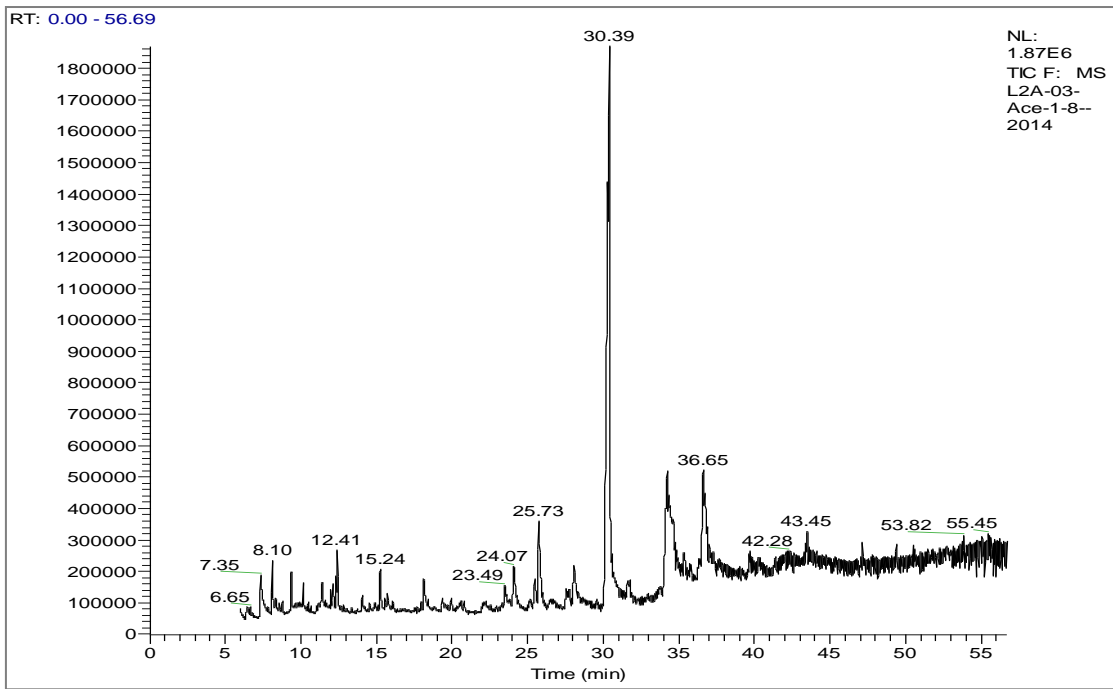


Figura 6.16 - Cromatograma de GC-MS da amostra de março da colmeia 2 do apiário de Lagoas.

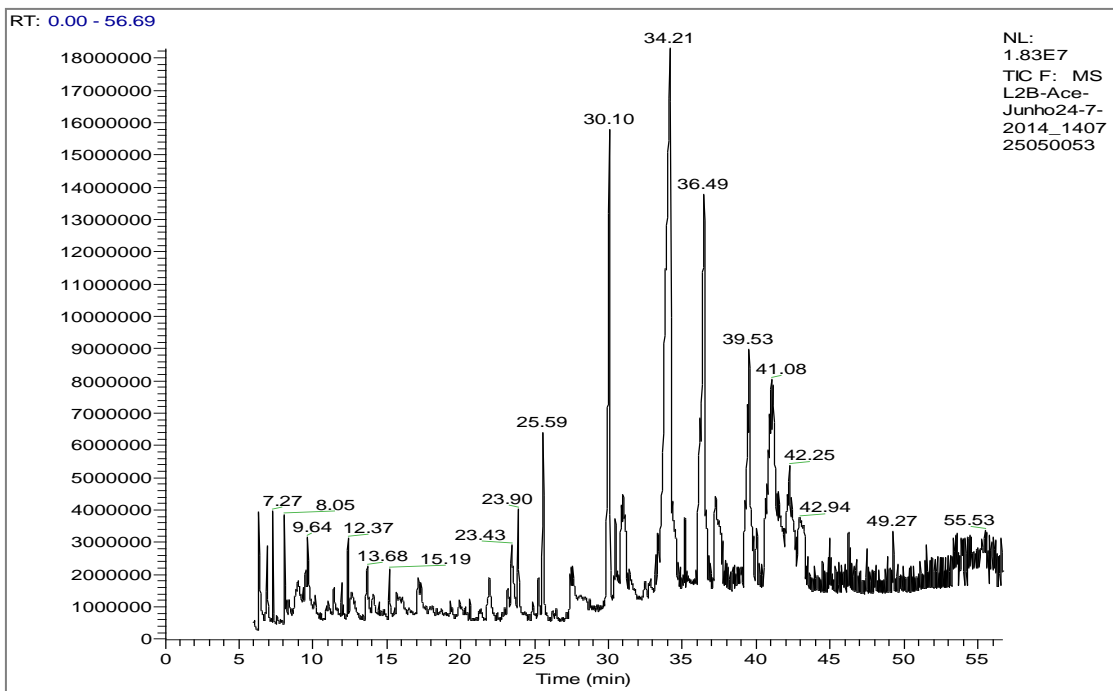


Figura 6.17 - Cromatograma de GC-MS da amostra de junho da colmeia 2 de Lagoas.

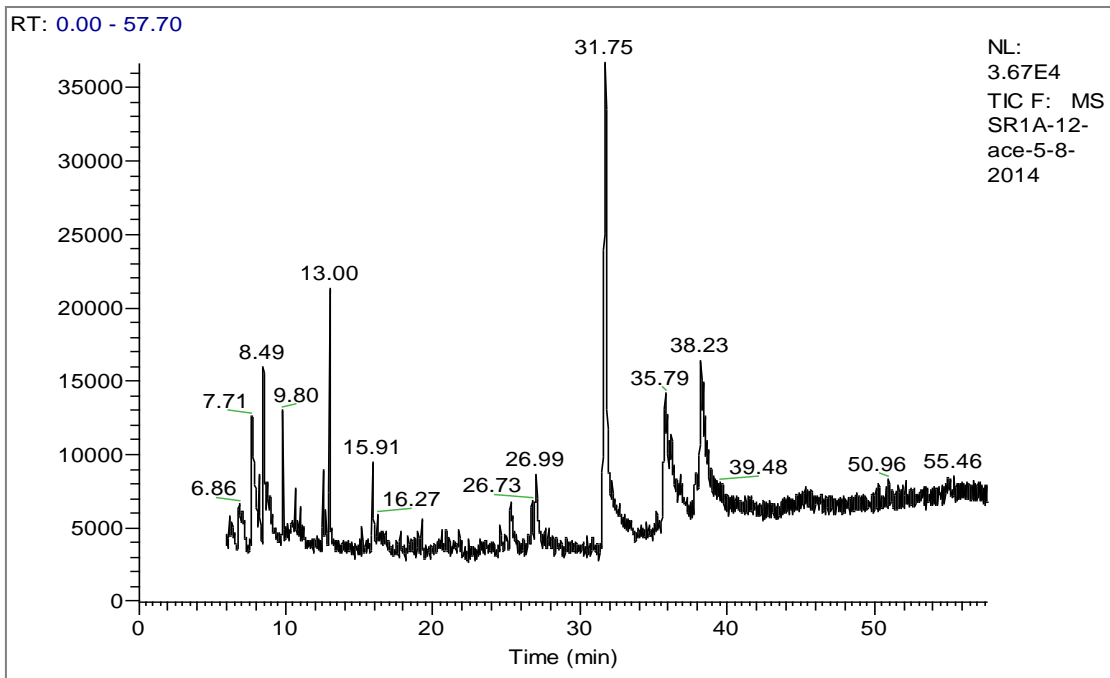


Figura 6.18 - Cromatograma de GC-MS da amostra de dezembro da colmeia 2 de São Roque.

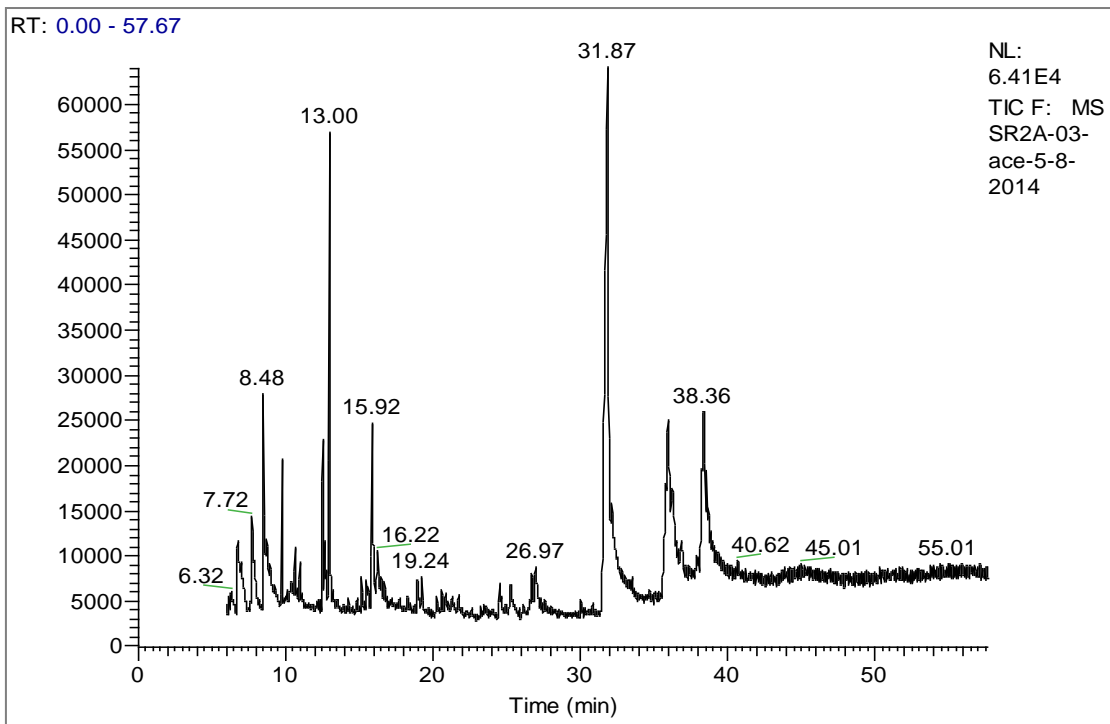


Figura 6.19 - Cromatograma de GC-MS da amostra de março da colmeia 2 de São Roque.

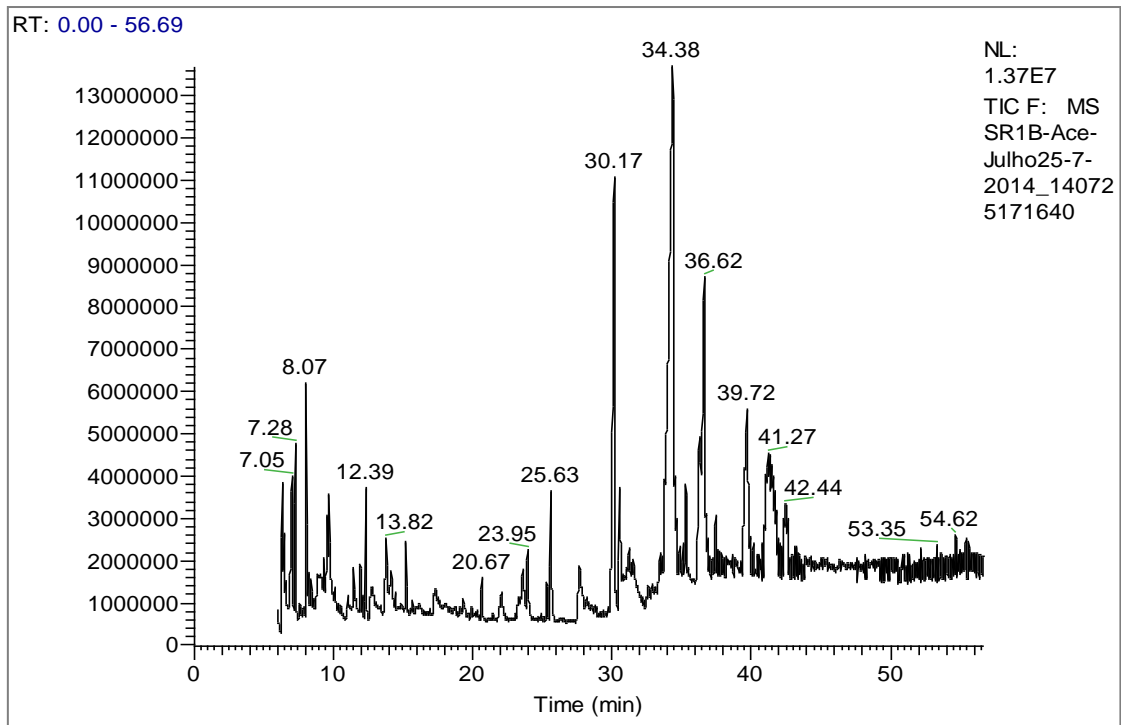


Figura 6.20- Cromatograma de GC-MS da amostra de junho da colmeia 2 de São Roque.

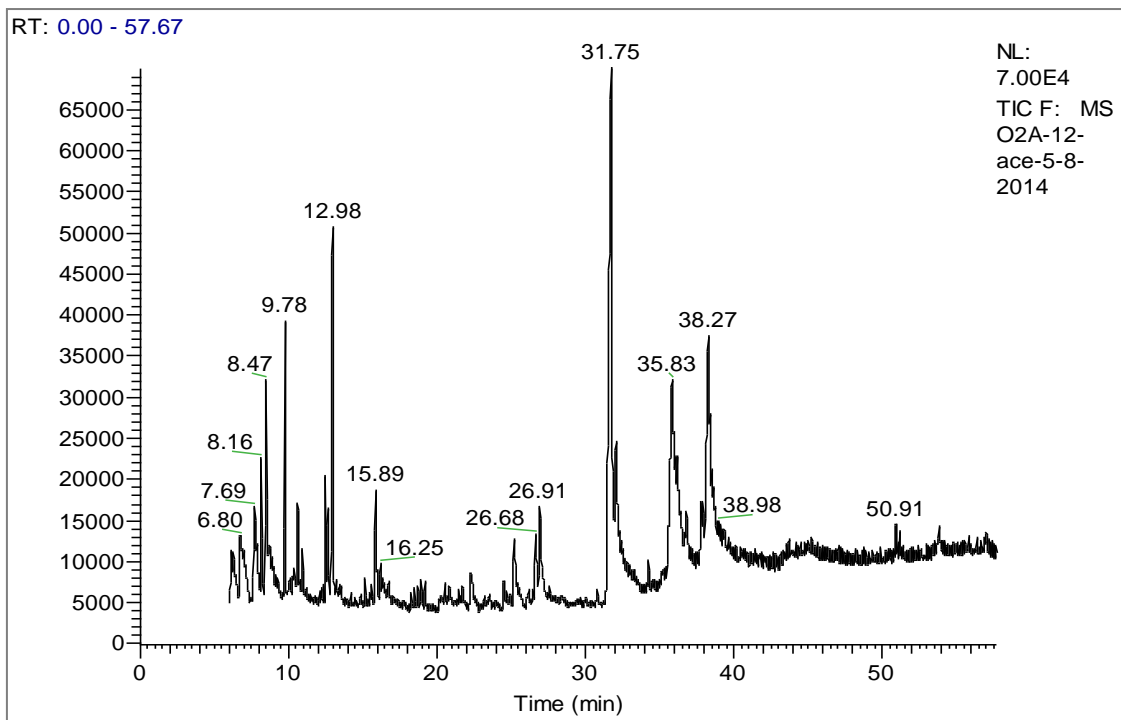


Figura 6.216 - Cromatograma de GC-MS da amostra de dezembro da colmeia 2 de Ouca.

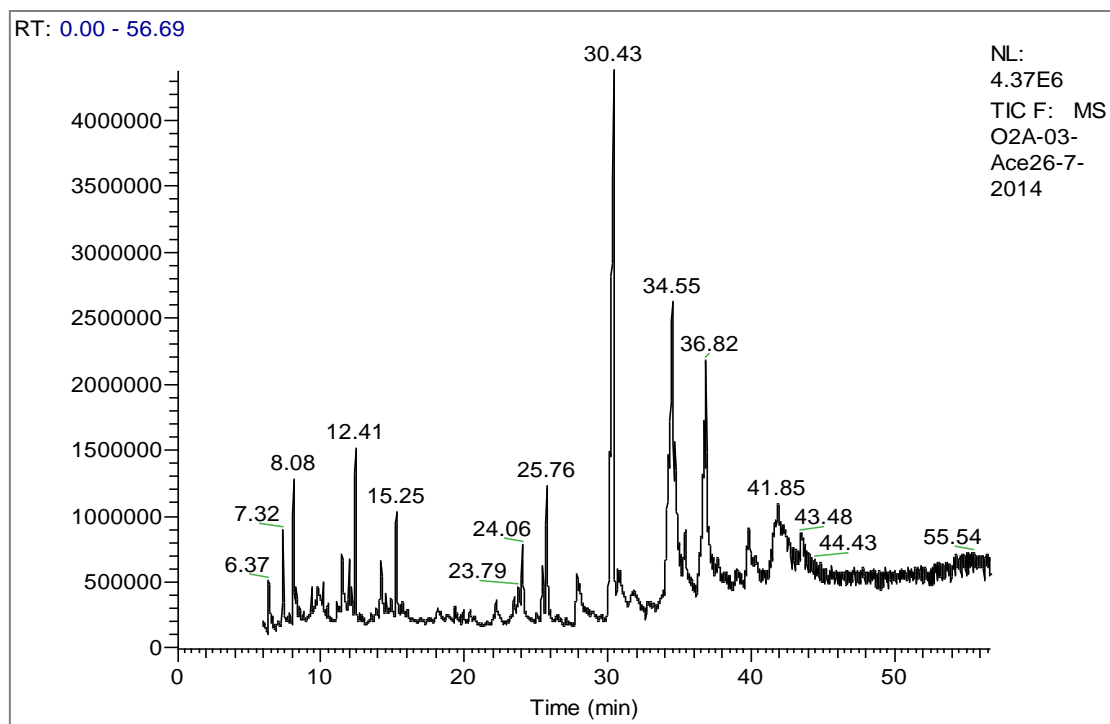


Figura 6.22 - Cromatograma de GC-MS da amostra de março da colmeia 2 de Ouca.

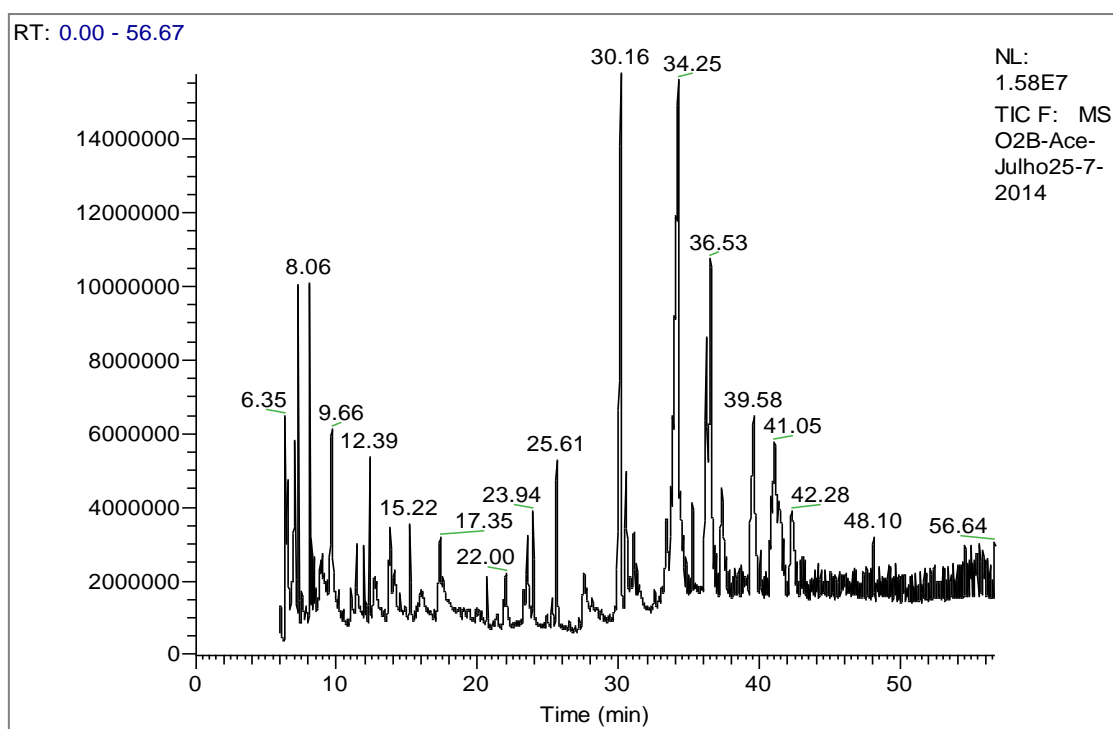


Figura 6.23 - Cromatograma de GC-MS da amostra de junho da colmeia 2 de Ouca.

Capítulo VII Bibliografia

- Alves, C.Q.; David, J.M.; David, J.P., Bahia, M.P., Aguiar, R.M.; *Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos*; Química Nova, Vol. 33, No. 10, 2202-2210, 2010
- Atungulu, G., et al; *Activity of gaseous phase steam distilled propolis extracts on peroxidation and hydrolysis of rice lipids*, Journal of Food Engineering, 2006
- Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S., Sabatin, A.G.; *Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results*, Z. Naturforsch, Vol. 57c, pg. 530-533, 2012
- Banksota, A.H., Nagaoka, T., Sumioka, L.Y., Tezuka, Y., Awale, S., Midorikawa, K., Matsushige, K., Kadota, S.; *Antiproliferative activity of Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines*; Journal of Ethnopharmacology, Vol. 80, pg. 67-73, 2002
- Bergamaschi, J.M.; *Terpenos*; Terpenoil, Tecnologia Orgânica
- Bonvehí, J.S., Gutiérrez, A.L.; *Antioxidant activity and total phenolis of propolis from the Basque Country (Northeastern Spain)*; Springer, Vol. 88, pg. 1387-1395, Março de 2011
- Burdock, G.A.; *Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis)*; Food and Chemical Toxicology, Vol. 36, pg. 347-363, 1998
- Castaldo, S., Capasso, F.; *Propolis, an old remedy used in modern medicine*; Fitoterapia 73, pg. S1-S6, 2002
- Cruz, M., Ferreira, A.M., Cunha, A., Aguiar, C., Oliveira, R.; *Evaluation and characterization of antioxidant and anti-genotoxic properties of Portuguese propolis. (cartaz)*
- Dias, L., Pereira, A.P., Estevinho, L.M.; *Comparative study of different portuguese samples of própolis: pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity*; Food and chemical toxicology, Vol. 50, pg. 4246-4253, Setembro de 2012
- Fabris, S., Bertelle, M., Astafyeva, O., Gregoris, E., Zangrando, R., Gambaro, A., Lima, G.P.P., Stevanato, R.; *Antioxidant properties and chemical composition relationship of europeans and brazilians propolis*; Pharmacology & Pharmacy, Vol. 4, pg. 46-51, 2013
- Falcão, S.I., Freire, C., Vilas-Boas, M.; *A Proposal for Physicochemical Standarts and Antioxidant activity of Portuguese Propolis*; Journal of the American Oil Chemist' Society, 2013
- 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, Vol. 49, pg. 805-812, Julho de 2013
- Gardana, C., Scaglianti, M., Pietta, P., Simonetti, P.; *Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Vol. 45, pg. 390-399, Junho de 2007
- Gómez-Caravaca, A.M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A.; *Advances in the analysis of phenolic compounds in products*

- derived from bees*; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Vol. 41, pg. 1220-1234, Abril de 2006
- Gregoris, E., Stevanato, R.; *Correlations between polyphenolic composition and antioxidante activity of Venetian própolis*; Food and chemical toxicology, Vol. 48, pg. 76-82, Setembro de 2009
 - Guo, X. *et al*; *Chemical compositions and antioxidante activities of water extracts of chinese propolis*; Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 59, pg. 12610-12616, Outubro de 2011
 - Hegazi, A.G. *et al*; *Antiviral activity and chemical composition of european and egyptian propolis*; Apimondia, 2001
 - Kalogeropoulos, N.,Konteles, S.J., Troullidou, E., Mourtzinos, I., Karathanos, V.T.; *Chemical compositio, antioxidante activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus*; Food Chemistry, Vol. 116, pg. 452-461, Fevereiro de 2009
 - Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T.; *Antioxidant actvity of propolis of various geographic origins*; Food Chemistry, Vol. 84, pg. 329-339, Maio de 2003
 - Lustosa, S.R. *et al.*; *Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia*; Revista Brasileira de Farmacologia, Vol. 18, No. 3, pg. 447-454, Jul./Set. 2008
 - Manual de produção de pólen e própolis, FNAP – Federação Nacional de Apicultores de Portugal, Agosto de 2010
 - Marcucci, M.C., *Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity*,Apidologie 26 (review article), pg. 83-99, Novembro de 1994
 - Marghita, L.A.,Dezmirean, D.S. Bobis, O.,; *Important developments in romanian propolis research*; Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Vol. 2013 (9 páginas), 2013
 - Markham, K.R., Mitchell, K.A., Wilkins, A.L., Daldy, J.A., Lu, Y.; *HPLC and GC-MS identification of the major organic consituens in New Zeland própolis*; Phytochemistry, Vol. 42, No. 1, pg. 205-211, 1996
 - Mello, B., Petrus, J.C.C., Hubinger, M.D.; *Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic própolis extracts through nanofiltration*; Journal of Food Engineering 96, pg. 533-539, Setembro 2009
 - Miguel, M., Nunes, S., Cruz, C., Duarte, J., Antunes, MD., Cavaco, A.M., Mendes, M.D., Lima, A.S., Pedro, L.G., Barroso, J.G., Figueiredo, A.C.; *Propolis volatiles characterization from acaricide-treates and –untreated beehives maintained at Algarve (Portugal)*; Natural Product Research, Vol. 27, Nº. 8, pg. 743-749, 2013
 - Mohammadzadeh, S., Sharriatpanahi, M., Hamedi, M., Amanzadeh, Y., Ebrahimi, S.E.S., Ostad, S.N.; *Antioxidant power of Iranian propolis extract*; Food Chemistry, Vol. 103, pg. 729-733, 2007
 - Moreira, L., Dias, L., Pereira, J., Estevinho, E.; *Antixodant properties, total phenols and pollen analysis of própolis samples from Portugal*; Food and Chemical Toxicology 46, pp. 3482-3485, 2008
 - Pietta, P.G., Gardana, C., Pietta, A.M.; *Analytical methods for quality control of propolis*; Fitoterapia 73, S7-S20, 2002

- Popova, M., Dimitrova, R., Al-Lawati, H.T., Tsvetkova, I., Najdenski, H., Bankova, V.; *Omani propolis: chemical profilin, antibacterial activity and new propolis plant sources*; Chemistry Central Journal, Vol. 7, 2013
- Popova, M., Graikou, K., Chinou, I., Bankova, V.; *GC-MS Profiling of Diterpene Compounds in Mediterranean Propolis from Greece*; Journal of agricultural and food chemistry, Vol. 58, pg. 3167-3176, 2010
- Roesler, R., Malta, L.G., Carrasco, L.C., Holanda, R.B., Sousa, C.A.S., Pastore, G.M.; *Atividade antioxidante de frutas do cerrado*; Ciências Tecnologia dos Alimentos, Vol. 27, Nº. 1, pg. 53-60, 2007
- Russo, A., Cardile, V., Sanchez, F., Troncoso, N., Vanella, A., Garbarino, J.A.; *Chilean propolis: antioxidante activity and antiproliferative action in human tumor cell lines*; Life Sciences, Vol. 76, pg. 545-558, 2004
- Russo, A., Longo, R., Vanella, A., *Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galagin*, Fitoterapia, Vol. 73, No. 1, pg. S21-S29, 2002
- Salatino, A., Fernandes-Silva, C.C., Righi, A.A., Salatino, M.L.F.; *Propolis research and the chemistry of plant products*; The Royal Society of Chemistry, Vol. 28, pg. 925-936, 2011
- Sarikaya, A.O., Ulusoy, E., Öztürk, N., Tunçel, M., Kolayli, S.; *Antioxidant activity and phenolic acid constituents of Chestnut (castania sativa mill.) honey and propolis*, Journal of Food Biochemistry, Vol. 33, pg. 470-481, 2007
- Sawaya, A.C.H.F., Cunha, I.B.S., Marcucci, M.C.; *Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis*, Chemistry Central Journal, 2011
- Sforcin, J.M., *Propolis and the immune system: a review*; Journal of Ethnopharmacology 113, pg. 1-14, Maio de 2007
- Silva, J.C., Rodrigues, S., Feás, X., Estevinho, L.M.; *Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis*; Food and chemical Toxicology, Vol. 50, pg. 1790-1795, Março de 2012
- Silva, J.F.M.; Souza, M.C.; Matta, S.R.; Andrade, M.R.; Vidal, F.V.N.; *Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities*; Food Chemistry, Vol. 99, pg. 431-435, julho 2006.
- Soares, S.; *Ácidos fenólicos como antioxidantes*; Revista de Nutrição, Vol. 15, pg. 71-81, 2002
- Sousa, C.M.M.; Silva, H.S.; Vieira-Jr., G.M.; Ayres, M.C.C., Costa, C.L.S.; Araújo, D.S.; Cavalcante, L.C.D.; Barros, E.D.S.; Araújo, P.B.M.; Brandão, M.S.; Chaves, M.H.; *Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais*; Química Nova; Vol. 30; No. 2, 351-355, 2007
- Sucupira, N.R., Silva, A.B., Pereira, G., Costa, J.N.; *Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos*; UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde, Vol. 14, Nº. 4, pg. 263-269, 2012
- Tirugnanasampandan, R., et al, *Analysis of chemical composition and bioactive property evaluation of Indian propolis*, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, pg. 651-654, Agosto de 2012
- 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 cells growth in vitro*; Food and Chemical Toxicology, Vol. 49, pg. 86-92, 2010
- Volpi, N., Bergonzini, G., *Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry*; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Vol. 42, pg. 354-361, Junho de 2006
 - Yang, H., Dong, Y., Du, H., Shi, H., Peng, Y., Li, X.; *Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China*; Molecules, Vol. 16, pg. 3444-3455, 2011
 - Zaia, D.A.M., Zaia, C.T.B., Lichtig, J.; *Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes*; Química Nova, Vol. 6, 1998.