Artigo

Prospecção Química e Avaliação da Atividade Biológica da Própolis de Salinópolis, Pará

Araújo, A. B. C.; Dias, A. J. S.; Freitas, R. L. S.; Nunes, A. R.; Silva, G. A.; Santos, D. C.*

Rev. Virtual Quim., 2020, 12 (2), 492-499. Data de publicação na Web: 17 de Abril de 2020

<http://rvq.sbq.org.br>

Chemical Prospecting and Evaluation of the Biological Activity of the Propolis of Salinópolis, Pará

Abstract: This paper investigates the presence of secondary metabolites in samples of propolis produced in the municipality of Salinópolis, Pará, and their antioxidant and cytotoxic activities. The hexane and methanol extracts were obtained by maceration of the crude propolis. The phytochemical screening lead to the identification of phenolics, flavonoids, saponins, tannins and steroids in the methanol extract and phenolics and flavonoids in the hexane extract. The methanol ($CE_{50}=93.92 \pm 21.76$ mg/mL) and hexane ($CE_{50}=100.18 \pm 18.71$) extracts had a good antioxidant activity, measured by DPPH method. The extracts did not present cytotoxic activity for *Artemia salina*. The results indicate that the propolis produced in Salinópolis can be a source of compounds with antioxidant activity, since the humidity and mineral residue levels are in accordance with the current legislation, while further studies are necessary for a possible standardization and use of this type of propolis as aherbal medicine.

Keywords: Propolis; Antioxidant; Flavonoids.

Resumo

Este trabalho investiga a presença de metabólitos secundários em amostras de própolis produzida no município de Salinópolis, Pará, bem como a avaliação das atividades antioxidante e citotóxica. Os extratos hexânico e metanólico foram obtidos por maceração da própolis bruta. A partir da triagem fitoquímica foram identificadas no extrato metanólico compostos fenólicos, flavonoides, saponinas, taninos e esteroides, e no extrato hexânico foram identificados compostos fenólicos e flavonoides. Os extratos metanólico ($CE_{50}=93,92\pm 21,76$ µg/mL) e hexânico ($CE_{50}=100,18\pm 18,71$ µg/mL) apresentaram uma boa atividade antioxidante pelo método do DPPH e não apresentaram toxicidade frente à *Artemia salina*. Os resultados indicam que a própolis produzida em Salinópolis pode ser uma fonte de compostos com atividade antioxidante, pois os critérios de umidade e resíduos minerais estão de acordo com a legislação vigente, mas são necessários novos estudos para uma possível padronização e utilização desse tipo de própolis como fitoterápico.

Palavras-chave: Própolis; antioxidante; flavonoides.

* Universidade do Estado do Amapá, colegiado de ciências naturais, Av. Pres. Vargas, 650, CEP 68900-070, Macapá-AP, Brasil.

@darlanquimico@hotmail.com
DOI: [10.21577/1984-6835.20200039](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200039)

Prospecção Química e Avaliação da Atividade Biológica da Própolis de Salinópolis, Pará

Darlan Coutinho dos Santos,^a Gabriel Araújo da Silva,^b Aislan Baden da Conceição Araújo,^c Ruan Lucas Silveira de Freitas,^c Aline Rodrigues Nunes,^c Arllon José dos Santos Dias^d

^a Universidade do Estado do Amapá, colegiado de Ciências Naturais, campus I, CEP 68900-070, Macapá-AP, Brasil.

^b Universidade do Estado do Amapá, colegiado de Licenciatura em Química, campus I, CEP 68900-070, Macapá-AP, Brasil.

^c Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química, CEP 60450-900, Fortaleza-CE, Brasil.

^d Universidade do Estado do Amapá, colegiado de Engenharia de Pesca, campus I, CEP 68900-070, Macapá-AP, Brasil.

*@darlanquimico@hotmail.com

Recebido em 1 de Agosto de 2018. Aceito para publicação em 26 de Março de 2020

1. Introdução
2. Materias e Métodos
3. Resultados e Discussão
4. Conclusão

1. Introdução

A própolis é uma mistura resinosa produzida pelas abelhas através da mistura de suas secreções salivares com resinas vegetais, pólen, exsudados de brotos e botões florais.^{1,2} Sua consistência e coloração variam de acordo com a composição química, e é utilizada pelas abelhas para embalsamar pequenos animais mortos, manter um clima agradável no interior da colmeia, reparar os favos de mel e fechar pequenas frestas.³

A composição química da própolis depende de fatores como variabilidade genética das abelhas, clima e biodiversidade da região ao redor da colmeia. A própolis é composta, aproximadamente, por 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleos

essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de substâncias variadas.¹ Diversas substâncias já foram identificadas em amostras de própolis com a predominância de flavonoides, aldeídos aromáticos, ácidos fenólicos, ácidos orgânicos, cumarinas, esteroides, terpenos, açúcares, ácidos graxos, ésteres alifáticos e aromáticos, proteínas, vitaminas e minerais, como Mg, Cu, Ca, Al, V, Ni, Zn, Cr.⁴ Diversos estudos apontam os flavonoides, e outros compostos fenólicos, como sendo os principais compostos ativos da própolis, essas classes de metabólitos conferem propriedades antioxidantes à própolis, característica que tem sido bastante investigada em produtos de origem natural, pois podem ser aplicados na indústria farmacêutica e alimentícia.⁵

Durante os processos metabólicos que ocorrem no corpo humano são produzidas espécies reativas

de oxigênio (EROs), que podem causar danos nas estruturas de biomoléculas quando estão em excesso no organismo. O excesso de EROs no corpo humano está relacionado com a fisiopatologia de diversas doenças como câncer, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, catarata, entre outras.⁶ O próprio organismo humano possui defesas contra o excesso de EROs, porém, algumas situações podem fazer com que se exceda a produção dessas espécies deletérias, gerando um desequilíbrio entre as EROs e os antioxidantes endógenos, situação chamada de estresse oxidativo, se fazendo necessária a utilização de antioxidantes de outras fontes. Os antioxidantes naturais têm recebido bastante atenção por serem capaz de auxiliar no equilíbrio de EROs e evitar o estresse oxidativo no organismo, além de serem fontes mais seguras de antioxidantes.^{7,5}

Para a utilização da própolis como fonte de antioxidantes é necessário que estudos a respeito das classes de metabólitos presentes sejam realizados, além de análises que evidenciem suas propriedades biológicas, como não há relatos na literatura sobre investigação química e biológica da própolis de Salinópolis no estado do Pará, o presente trabalho torna-se pioneiro e de grande relevância. Os objetivos desse trabalho foram avaliar a atividade antioxidante e citotóxica da própolis produzida no município de Salinópolis, estado do Pará, bem como investigar a presença de metabólitos secundários a partir da triagem fitoquímica.

2. Materias e Métodos

A própolis (190,37 g) foi coletada diretamente na colmeia das abelhas *Apis mellifera*, alojadas em caixas padronizadas, na apícola localizada no município de Salinópolis no estado do Pará, na região norte do Brasil. Para obtenção dos extratos a amostra foi submetida à maceração por 48h utilizando o hexano como líquido extrator. O procedimento foi realizado por três vezes consecutivas e o filtrado obtido foi reunido e concentrado sob pressão reduzida dando origem ao extrato hexânico da própolis (120,6 g). As tortas obtidas após extração com hexano foram posteriormente submetidas à maceração em metanol (MeOH), três extrações, com cerca de 48 h cada, e o filtrado obtido em cada etapa foi reunido

e concentrado sob pressão reduzida, resultando no extrato metanólico da própolis (38,5 g).

A triagem fitoquímica foi realizada seguindo os métodos descritos na literatura, para identificação de fenólicos, flavonoides e taninos,⁸ e para esteroides, saponinas e alcaloides.⁹

A determinação do teor de flavonoides totais foi realizada utilizando-se uma curva padrão construída com rutina (3-30 µg/mL). O extrato hexânico apresentou baixa solubilidade em etanol, solvente utilizado no ensaio, sendo assim apenas o extrato metanólico foi analisado na concentração de 100 µg/mL. Foram adicionados 2,5 mL de cloreto de alumínio a 2,5 mL de amostra. Após 30 min. de reação foi feita a leitura da absorbância em um espectrofotômetro a 420 nm. O branco foi feito substituindo-se a amostra por metanol.¹⁰

A avaliação da atividade antioxidante *in vitro* foi analisada através da capacidade dos extratos metanólico e hexânico em sequestrar o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), que possui característica de aceitar um elétron ou radical hidrogênio, processo que ocorre com a mudança de coloração da solução de púrpura para amarela.¹¹ Para realização dos testes foram preparadas soluções em metanol dos extratos em cinco concentrações (10, 50, 100, 150 e 200 µg/mL), e a rutina foi utilizada como padrão. Em 1 mL da amostra foram adicionados 3 mL de uma solução metanólica de DPPH (45 µg/mL) e após 15 min de reação foram lidas as absorbâncias em 517 nm. Os extratos e o padrão foram analisados em triplicatae suas atividades expressas em porcentagem.

$$\% A.A = \frac{(ABS \text{ controle}^{15} - ABS \text{ amostra}^{15}) \times 100}{ABS \text{ controle}^{15}}$$

Onde: A.A (atividade antioxidante), ABS controle¹⁵ (absorbância no tempo 15 minutos do metanol + DPPH) e ABS amostra¹⁵ (absorbância da amostra no tempo 15 minutos).

Para determinação da atividade antioxidante total foi empregado o método do complexo fosfomolibdênio que se baseia na mudança de coloração da solução durante a redução do Mo (VI) para Mo (V). O reagente foi preparado utilizando-se 28 mL de fosfato sódico monobásico (0,1 mol/L), 12 mL da solução de molibdato de amônio (0,3 mol/L) e 20 mL de uma solução de ácido sulfúrico (3 mol/L), sendo o volume final ajustado

para 100 mL com água destilada. Posteriormente foram transferidos 0,3 mL da amostra a tubos de ensaio onde foram adicionados 3 mL da solução fosfomolibdênio. As amostras foram levadas ao banho de água durante 90 min a 90 °C e as absorbâncias foram lidas em 615 nm. Os extratos foram testados na concentração de 200 µg/mL e como padrão foi utilizado o ácido ascórbico.¹² A atividade antioxidante total foi expressa em porcentagem, sendo os extratos comparados ao ácido ascórbico na concentração de 200 µg/mL, que foi considerado como 100 %.

A avaliação da atividade citotóxica *in vitro* foi realizada através do ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* de acordo com a metodologia descrita na literatura.¹³ Foram preparadas 5 soluções de (1, 10, 200, 500 e 1000 µg/mL). Os cistos foram eclodidos em recipiente com 2 L de solução de sal marinho a 20 g/L, o pH do meio foi ajustado entre 8,0 e 9,0 com solução 0,1 mol/L de NaOH. O processo de eclosão dos ovos de *Artemia salina* foi realizado sob aeração e iluminação constante durante 48 horas a temperatura ambiente.

Após 48 horas foram transferidos 10 náuplios para cada frasco, utilizando pipeta Pasteur esterilizada e, o volume dos frascos completados até 5 mL com água do mar artificial. As amostras bem como os controles foram mantidos sob iluminação por 24 horas e após esse período foi feita a contagem de espécimes mortas. A concentração letal para metade da população, CE_{50} , foi obtida com o software GraphPadPrism 5.01.

Os espectros no infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro de infravermelho por Transformada de Fourier, modelo IRAffinity-1, da Shimadzu. Os espectros foram obtidos em pastilhas de KBr.

As análises de umidade e resíduos minerais, foram determinadas como descrito na literatura com adaptações,¹⁴ onde primeiramente pesou-se os cadinhos já identificados e logo após cerca de 2 g da amostra a ser analisada. Posteriormente colocaram-se as amostras na estufa sob aquecimento (105 °C) por um período de 24 h.

Após período na estufa, as amostragens foram levadas ao dessecador com sílica por mais 24 h,

sendo ao fim, pesadas para obtenção do valor da massa final.

Após processo de secagem em estufa, colocaram-se as amostras em mufla a 560 °C, por um período de 6 h, para incineração e ao fim foram quantificados os resíduos minerais presentes no material amostral, por cálculo de diferença de massa. Ambas as análises foram feitas em triplicata.

3. Resultados e Discussão

A investigação das classes dos metabólitos secundários através da triagem fitoquímica evidenciou a presença de fenólicos, flavonoides, taninos, saponinas e esteroides no extrato metanólico da própolis. O extrato hexânico deu teste positivo para fenólicos e flavonoides (Tabela 01), foi observado que os extratos metanólico e hexânico apresentaram uma intensa reação de cor (+++) apenas para o ensaio de identificação de fenólicos.

O extrato metanólico da própolis apresentou um teor de flavonoides em µg equivalentes de rutina por mg de extrato, de $69,31 \pm 0,31$ µg.mg⁻¹ (6,931 %), sendo o mínimo estabelecido para a comercialização da própolis como sendo 0,5 %.

A presença desses metabólitos sugere que a amostra pode possuir relevantes atividades biológicas. Vários estudos sugerem que as propriedades da própolis estão relacionadas ao sinergismo que ocorre entre seus vários constituintes.¹⁵ Os compostos fenólicos estão entre os que mais se destacam, principalmente flavonoides, por apresentarem propriedades antimicrobianas, antioxidantes, além de participarem nos processos de cicatrização e auxiliarem na absorção e ação de algumas vitaminas.^{15,16}

O espectro na região de infravermelho do extrato metanólico (Fig. 1) evidenciou a presença de fenólicos e flavonoides descritos na triagem fitoquímica. Uma banda característica da deformação axial do grupamento O-H em 3500 cm⁻¹. A presença das bandas denominadas "overtone" 2000 - 1600 cm⁻¹ indica a presença de um ou mais anéis aromáticos, pois trata-se de uma mistura. Além disso, uma banda

Tabela 1. Triagem fitoquímica dos extratos da própolis do município de Salinópolis, estado do Pará

Extrato	Fenólicos	Flavonoides	Taninos	Saponinas	Alcaloides	Esteroides
Metanólico	+++	+	+	+	-	++
Hexânico	+++	+	-	-	-	-

em aproximadamente 1750 cm^{-1} pode ser indicativo da presença do grupamento carbonila. O espectro de infravermelho do extrato hexânico (Figura 2) apresentou uma banda em aproximadamente 3500 cm^{-1} característica do grupo O-H, essa banda foi menos intensa quando comparada ao espectro do extrato metanólico. As bandas em 2900 e 2800 cm^{-1} são características de deformações axiais dos grupos CH_3 e CH_2 (sp^3) indicando a presença de compostos de natureza mais apolar nesse extrato de própolis.

O método utilizando o DPPH avalia o potencial de sequestro de radicais livres de substâncias e extratos, e é um dos mais utilizados, devido sua praticidade, precisão e facilidade de reprodução dos resultados. Está baseado no fato de o DPPH possuir certa estabilidade, devido ao

deslocamento do elétron livre por toda a molécula, que faz com que uma solução alcoólica do radical, de coloração púrpura, possua um espectro de absorção característico a aproximadamente 517 nm . Quando espécies doadoras de elétrons ou doadoras de átomos de hidrogênio entram em contato com o DPPH, é formada a hidrazina e ocorre a redução da absorbância em 517 nm e descoloração da solução púrpura.⁶

Os ensaios com o radical DPPH mostraram que os extratos possuem a capacidade de sequestro de radicais semelhantes (figura 3). A partir das porcentagens de atividade antioxidante e concentração das amostras foi determinado o CE_{50} das amostras, que representa a concentração capaz de sequestrar 50 % dos radicais livres. O extrato

Figura 1. Espectro de infravermelho do extrato metanólico da própolis com a presença de uma banda característica do grupo O-H evidenciando a presença de compostos fenólicos (pastilha de KBr)

Figura 2. Espectro de infravermelho do extrato hexânico da própolis com bandas características dos grupos CH_3 e CH_2 evidenciando a natureza apolar do extrato (pastilha de KBr)

metanólico apresentou um CE_{50} de $93,92 \pm 21,76$ $\mu\text{g/mL}$, ligeiramente abaixo que o do hexânico, de $100,18 \pm 18,71$ $\mu\text{g/mL}$, enquanto o padrão rutina apresentou um valor de $5,43 \pm 0,54$ $\mu\text{g/mL}$. Os resultados obtidos mostram que a própolis testada possui uma boa atividade antioxidante. Foram realizados alguns estudos em própolis da região amazônica,² a partir dos quais as várias frações da própolis analisada apresentaram valores de CE_{50} que variaram em uma faixa de 10 até aproximadamente 500 $\mu\text{g/mL}$. Extratos de própolis verde e vermelha descritos na literatura, demonstraram atividades próximas as encontradas neste trabalho, com valores de CE_{50} igual a 86,10 $\mu\text{g/mL}$ para a própolis vermelha e 80,64 $\mu\text{g/mL}$ para a verde.¹⁷

A própolis aqui estudada apresentou bons valores quando comparada com algumas outras fontes naturais de antioxidantes. Amostras de chá verde e erva mate, por exemplo, apresentaram CE_{50} de 340 e 1320 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.¹⁸

O método do complexo fosfomolibdênio para avaliar a atividade antioxidante total é uma forma simples, de baixo custo e bastante útil em análises de misturas complexas, como a própolis, pois é um método capaz de avaliar o potencial antioxidante de componentes hidrofílicos e lipofílicos da amostra.¹⁹ Na avaliação da atividade antioxidante total ambos extratos demonstraram atividade, que pôde ser observada através da mudança de coloração durante as análises. A atividade antioxidante total foi obtida através da comparação dos extratos com o padrão ácido ascórbico na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$. O extrato metanólico expressou uma atividade de $35,62 \pm 1,95$ % e o extrato hexânico $22,72 \pm 2,74$ %.

Analisando os resultados das atividades complementares de sequestro de radicais livres

e antioxidante através do método de sequestro de radical livre DPPH e do fosfomolibdênio, respectivamente, nota-se que existe uma correlação direta entre a presença de compostos fenólicos e atividade antioxidante. Quanto maior a concentração de compostos fenólicos maior será a atividade antioxidante in vitro, considerando a relação estrutura-atividade, concentração e solubilidade destes compostos, bem como in vivo, pois os compostos fenólicos são responsáveis por atividades biológicas benéficas, salvo seus mecanismos de ação, doses terapêuticas e profiláticas e até a ocorrência de inter-relações bioquímicas.^{2,20} São encontrados poucos estudos da atividade antioxidante total pelo método do fosfomolibdênio em amostras de própolis, todavia são encontrados diversos valores para outros produtos naturais com propriedade antioxidante. Estudos realizados com folhas e caules de *Bauhinia microstachya* obtiveram atividades que foram de $22 \pm 3,28$ % até $49 \pm 2,06$ %.²¹ As análises descritas na literatura para a espécie *Dorstenia multiflora* chegaram a valores de atividade antioxidante total de 34,49 % na fração clorofórmio testada.²² Trabalhos realizados com as plantas *Dicksonia sellowiana* e *Maytenus ilicifolia* também deixam evidente que o extrato metanólico analisado neste trabalho apresentou boa atividade antioxidante pelo método fosfomolibdênio, apresentando atividade comparável à de outros produtos utilizados popularmente e que tiveram estudos comprovando suas atividades biológicas.^{23,24}

O ensaio sobre *Artemia Salina* é um método simples, barato e eficiente para determinação de letalidade de extratos e substâncias. Os extratos hexânico e metanólico apresentaram CL_{50} superior 1000 $\mu\text{g/mL}$ sendo considerados não tóxicos. Por

Figura 3. Análise da atividade de sequestro de radicais livres pelo método DPPH· dos extratos hexânico e metanólico de própolis de apícola localizada em Salinópolis Pará, norte do Brasil. Resultados expressos em média e desvio padrão (n=3)

não apresentar toxicidade a baixas concentrações, o consumo da própolis analisada pode ser mais seguro, visto ser comum o consumo desse produto pela população.² A baixa toxicidade do extrato testado pode ser atribuída à presença dos flavonoides que foi confirmada através da triagem fitoquímica, e estes apresentam pouca ou nenhuma toxicidade.¹

Sendo assim os resultados se mostraram promissores tendo em vista a boa atividade antioxidante apresentada pelos extratos, característica essa bastante apreciada quando se trata da utilização da própolis para a manutenção da saúde e prevenção de doenças.²⁵

Obteve-se um resultado médio de $2,19 \pm 0,29$ % para umidade e $1,33 \pm 0,19$ % para resíduos minerais presentes na amostra analisada. A legislação brasileira²⁶ estipula um valor máximo de 8 % para umidade e 5 % para resíduos minerais presente em amostras de própolis, sendo assim o valor encontrado neste trabalho encontra-se em concordância com o que preconiza a legislação. Análises feitas com própolis oriundas de um apiário localizado no município de Areia, na Paraíba, obteve um valor médio de 2,14 % para quantificação de umidade e 1,32 % para os minerais.²⁷ Os valores encontrados neste trabalho para as duas variáveis encontram-se de acordo com o que foi encontrado por esta literatura. A quantificação de umidade presente em amostras de própolis é de suma importância, pois está relacionada diretamente com a qualidade do produto. Um teor de umidade elevado tende a tornar um ambiente propício a proliferação de micro-organismos, fazendo assim com que o produto se torne impróprio para a comercialização e consumo.^{28,29}

4. Conclusão

A triagem fitoquímica para o extrato metanólico levou a identificação de fenólicos, flavonoides, taninos, saponinas e esteroides, no extrato hexânico foram identificados fenólicos e flavonoides. Os extratos testados apresentaram uma relevante atividade antioxidante que pode ser atribuída principalmente à presença de compostos fenólicos neste tipo de própolis. Os extratos não apresentaram atividade citotóxica no ensaio com *Artemia salina*, importante característica, pois a

própolis é comumente utilizada pela população em formulação oral. Sendo assim, pode-se concluir que os resultados encontrados e descritos neste trabalho sugerem que a própolis analisada é de boa qualidade, pois estão de acordo com os critérios e padrões de umidade e resíduos minerais descritos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Referências Bibliográficas

- ¹ Burdock, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology* **1998**, 36, 347. [CrossRef] [PubMed]
- ² Silva, E. C. C.; Muniz, M. P.; Nunomura, R. C. S.; Nunomura, S. M.; Carvalho-Zilse, G. A. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. *Química Nova* **2013**, 36, 628. [CrossRef]
- ³ Ghisalberti, E. L. Propolis: a review. *Bee world* **1979**, 60, 59. [CrossRef]
- ⁴ Salgueiro, F. B.; Castro, R. N. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. *Química Nova* **2018**, 39, 1192. [CrossRef]
- ⁵ Mourão, L. R. M.; *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, **2013**. [Link]
- ⁶ Alves, C. Q.; David, J. M.; David, J. P. L.; Bahia, M. V.; Aguiar, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova* **2010**, 33, 2202. [CrossRef]
- ⁷ Ferreira, I. C. F. R.; Abreu, R. M. V. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise* **2007**, 2, 32. [Link]
- ⁸ Furlong, E. B.; Colla, E.; Bortolato, D. S.; Baisch, A. L. M.; Soares, L. A. S. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. *Vetor* **2003**, 13, 105. [Link]
- ⁹ Silva, N. L. A.; Miranda, F. A. A.; Conceição, G. M. Triagem fitoquímica de plantas de Cerrado, da área de proteção ambiental municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. *Scientia Plena* **2010**, 6, 1. [Link]
- ¹⁰ Funari, C. S.; Ferro, V. O. Análise de própolis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2006**, 26, 171. [CrossRef]
- ¹¹ Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Science and Technology* **1995**, 28, 25. [CrossRef]

- ¹² Prieto, P.; Pineda, M.; Aguilar, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry* 1999, 269, 337. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹³ Meyer, B. N.; Ferrigni, R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; McLaughlin, J. L. Brine Shrimp : A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Journal of Medicinal Plant Research* 1982, 45, 31. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹⁴ Zenebon, O.; Pascuet, N. S.; Tiglea, P.; *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*, 4a ed., Instituto Adolfo Lutz: São Paulo, **2008**. [\[Link\]](#)
- ¹⁵ Marcucci, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da Própolis. *Química Nova* 1996, 19, 529. [\[Link\]](#)
- ¹⁶ Oliveira, K. A. D. M. Oliveira, G. V.; Batalini, C.; Rosalem, J. A.; Ribeiro, L. S. Atividade antimicrobiana e quantificação de Flavonoides e Fenóis totais em diferentes extratos de Própolis. *Semana: Ciências Biológicas e da Saúde* **2012**, 33, 211. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁷ Lacerda, R. C. C.; Tiveron, A. P.; Alencar, S. M. Própolis e segurança alimentar. *Segurança Alimentar e Nutricional* **2011**, 18, 99. [\[Link\]](#)
- ¹⁸ Pereira, M. G.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, **2009**. [\[Link\]](#)
- ¹⁹ Adelman, J.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Paraná, Brasil, **2005**. [\[Link\]](#)
- ²⁰ Martins, N.; Barros, L.; Ferreira, I. C. F. R. In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. *Trends in Food Science & Technology* **2016**, 48, 1. [\[CrossRef\]](#)
- ²¹ Bianco, E. M.; Santos, C. A. M. Propriedades antioxidantes de folhas e caules de *Bauhinia microstachya* (Raddi) J. F. Macbr. *Revista Brasileira de Biociências* **2010**, 8, 238. [\[Link\]](#)
- ²² Balestrin, L.; Dias, J. F. G.; Miguel, O. G.; Dall'stella, D. S. G.; Miguel, M. D. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiflora* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2008**, 18, 230. [\[CrossRef\]](#)
- ²³ Bora, K.; Miguel, O. G.; Anfrade, C. A.; Oliveira, A. O. Determinação da concentração de polifenóis e do potencial antioxidante das diferentes frações do extrato de folhas de *Dicksonia sellowiana*, (presl.) Hook, dicksoniaceae. *Visão Acadêmica* **2005**, 6, 6. [\[CrossRef\]](#)
- ²⁴ Negri, M. L. S.; Possamai, J. C.; Nakashima, T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reisch., secas em diferentes temperaturas. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2009**, 19, 553. [\[CrossRef\]](#)
- ²⁵ Nunes, L. C. C.; Galindo, A. B.; Deus, A. S. O.; Rufino, D. A.; Randau, K. P.; Xavier, H. S.; Citó, A. M. G. L.; Neto, P. J. R. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2009**, 19, 524. [\[CrossRef\]](#)
- ²⁶ Ministério da Agricultura. *Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis*. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil: Brasília*, **2000**. [\[Link\]](#)
- ²⁷ Silva, R. A.; Rodrigues, A. E.; Ribeiro, M. C. M.; Custódio, Â. R.; Andrade, N. E. D.; Pereira, W. E. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. *Ciência Rural* **2006**, 36, 1842. [\[CrossRef\]](#)
- ²⁸ Marcucci, M. C.; Ferreres, F.; Garcíaviguera, C.; Bankova, V. S.; De Castro, S. L.; Dantas, A. P.; Valente, P. H. M.; Paulino, N. Phenolic compounds from brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology* **2001**, 74, 105. [\[CrossRef\]](#)
- ²⁹ Matsuda, A. H.; *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, **2006**. [\[Link\]](#)