



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA GELEIA REAL POR FTIR-ATR E CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE DURANTE CICLOS PADRONIZADOS DE DESCONGELAMENTO**

Aluna: Camila Natalli Miranda Freitas

Orientadora: Profa. Dra. Renata Roland Teixeira

UBERLÂNDIA - MG
2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA GELEIA REAL POR FTIR -ATR E
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DURANTE CICLOS PADRONIZADOS DE
DESCONGELAMENTO**

Aluna: Camila Natalli Miranda Freitas

Orientadora: Profa. Dra. Renata Roland Teixeira

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia
como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em
Genética e Bioquímica (Área
Bioquímica)**

**UBERLÂNDIA - MG
2020**



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
(CIP) Sistema de Bibliotecas da UFU, MG,
Brasil.

F86 Freitas, Camila Natalli Miranda, 1994-
6a Análise da composição da geleia real por atr-ftir-atr
202 e capacidade antioxidante durante ciclos padronizados
0 de descongelamento [recurso eletrônico] / Camila
Natalli Miranda Freitas. - 2020.

Orientadora: Renata Roland Teixeira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética
e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em:

<http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.6039>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Genética. I. Teixeira, Renata Roland, 1983-,
(Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Genética e
Bioquímica. III. Título.

CDU: 575

Rejâne Maria da Silva – CRB6/1925
Bibliotecária



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico - 08/2020 - PPGGB.				
Data:	Vinte e nove de dezembro de dois mil e vinte	Hora de início:	08:30h	Hora de encerramento:	09:00h
Matrícula do Discente:	11822GBI003				
Nome do Discente:	Camila Natalli Miranda Freitas				
Título do Trabalho:	Análise da composição da geleia real por FTIR-ATR e capacidade antioxidante durante ciclos padronizados de descongelamento.				
Área de concentração:	Bioquímica				
Linha de pesquisa:	Estrutura e função de proteínas.				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Avaliação das propriedades adaptogenicas e antioxidantes de produtos naturais em animais submetidos ao estresse induzido por imobilização e frio.				

Aos vinte e nove dias do mês de dezembro de dois mil e vinte, às 08:30 horas, reuniu-se via web conferência pela plataforma Google Meet, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Professores Doutores: Renata Roland Teixeira (Orientadora), Leonardo Gomes Peixoto e Robinson Sabino da Silva. A participação dos dois últimos se deu por epístola. Iniciando os trabalhos o (a) presidente Dr (a). Renata Roland Teixeira apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença dos participantes, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor(a) presidente procedeu a leitura das epístolas enviadas pelos membros da banca. Em seguida os membros presentes, passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a leitura das epístolas e a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

(A) PROVADO.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram

encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Renata Roland Teixeira, Técnico(a) de Laboratório**, em 29/12/2020, às 10:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Gomes Peixoto, Usuário Externo**, em 30/12/2020, às 12:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Robinson Sabino da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/12/2020, às 10:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2424473** e o código CRC **211F2C97**.

DEDICATÓRIA

À minha família pelo apoio incondicional e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todas as bênçãos que me são concedidas.

Aos meus pais Jeane Cristina Duarte Miranda e Cleiton Rafael de Freitas por todo apoio e incentivo, pelos ensinamentos, por acreditar sempre em mim, por todo carinho e dedicação.

Obrigada as minhas irmãs Letícia Duarte e Kimberly Duarte, por todo apoio e compreensão.

Agradeço aos meus avós Lúcia, Walmir, Arlindo e Alzira que sempre me incentivaram a ir além e são exemplos na minha vida.

Obrigada a minha família, amo vocês.

A minha orientadora Prof. Dr. Renata Roland Teixeira, pela oportunidade no desenvolvimento deste trabalho, pelo companheirismo, dedicação, paciência e por todo o conhecimento compartilhado.

Ao Prof. Dr. Foued Salmen Espindola por todos os ensinamentos e conhecimento compartilhado.

Aos meus amigos que conheci no laboratório e que me apoiaram em todos os momentos, minha família Labibi: André Saraiva, Adriele Vieira, Allisson Benatti, Ana Luiza Borges, Douglas Caixeta, Fábio Buzatti, Joed Lima, Natália Tavernelli, Pedro Henrique, Poliana Ribeiro, Rodrigo Franco, Vinicius Bittar por todo o aprendizado compartilhado, pelo auxílio nos experimentos, pelo constante apoio dentro e fora do laboratório.

Aos meus colegas de mestrado e amigos, as pessoas mais companheiras que eu poderia contar para enfrentar essa jornada: Heitor Cappato, Letícia Afonso e Mariane Muraoka, foi incrível viver essa experiência com vocês.

Ao Gabriel Pinheiro, por todo incentivo e apoio nessa jornada.

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	1
2. INTRODUÇÃO	2
2.1 Geleia real	2
2.2. Estresse Oxidativo.....	5
2.3. Espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier	7
3. OBJETIVOS	8
3.1. Objetivos gerais.....	8
3.2 Objetivos específicos.....	8
4. MATERIAIS E MÉTODOS	8
4.1 Obtenção das amostras.....	8
4.2 Análise de composição no ATR-FTIR	9
4.3 Capacidade Antioxidante Total (FRAP).....	10
4.4 Inibição da produção de ROS in vitro	10
4.5 Ensaio de viabilidade celular	10
4.6 Análise Estatística	11
5. RESULTADOS	11
6. DISCUSSÃO	19
7. REFERÊNCIAS	24

RESUMO

A geleia real (GR) é uma secreção viscosa das glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias e é composta por água, carboidratos, lipídeos e proteínas, vitaminas, riboflavinas e minerais. A geleia real tem sido estudada por seus benefícios medicinais como efeito anti-hipertensivo, hepatoprotetor, controle de glicemia, anti-inflamatório e antioxidante. Os benefícios da geleia real estão associados à sua composição integral, portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos de ciclos de descongelamentos padronizados na composição da geleia real através da análise de ATR-FTIR e capacidade antioxidante de forma a mimetizar o consumo deste produto natural no uso diário. Os resultados obtidos demonstraram que os ciclos de descongelamento da geleia real causaram a diminuição da intensidade dos picos dos espectros nas leituras do ATR-FTIR, principalmente relacionados a lipídeos e proteínas e também ocorreu a diminuição da capacidade antioxidante da geleia real diante desses ciclos. Este estudo comprovou a eficácia da técnica de ATR-FTIR para análise de frescor e qualidade da geleia real, além de demonstrar os efeitos que curtas mudanças de temperatura ao longo dos dias, mimetizando o uso diário pelo consumidor causam na composição e capacidade antioxidante da geleia real.

Palavras-chave: geleia real; ATR-FTIR; frescor; antioxidante

ABSTRACT

Royal jelly (RJ) is a viscous secretion of the hypopharyngeal glands of worker bees and is composed of water, carbohydrates, lipids and proteins, vitamins, riboflavins and minerals. Royal jelly has been studied for its medicinal benefits such as antihypertensive, hepatoprotective, glycemic control, anti-inflammatory and antioxidant effects. The benefits of royal jelly are associated with its composition; therefore, the objective of this work was to verify the effects of standardized thawing cycles on the composition of royal jelly through the analysis of ATR-FTIR and antioxidant capacity in order to mimic the consumption of this natural product in use diary. The results obtained demonstrated that the cycles of thawing of royal jelly caused a decrease in the intensity of the spectra peaks in the ATR-FTIR readings, mainly related to lipids and proteins, and there was also a decrease in the antioxidant capacity of royal jelly in the face of these cycles. This study proved the effectiveness of the ATR-FTIR technique for analyzing the freshness and quality of royal jelly, in addition to demonstrating the effects that short temperature changes over the days, mimicking the daily use by consumers, cause the composition and antioxidant capacity of royal jelly.

Keywords: Royal Jelly; ATR-FTIR; Fresh; Antioxidant

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Perfil médio dos espectros.....	13
Figura 2. Gráfico de escores dos componentes principais e loadings de PCA da geleia real.....	14
Figura 3. Análise da capacidade antioxidante da geleia real mediante ciclos consecutivos de descongelamento de 5 minutos à temperatura ambiente seguidos de 24h de congelamento.....	16
Figura 4. Produção de EROs em macrófagos.....	17
Figura 5. Área sobre a curva (AUC) da avaliação da capacidade antioxidante da geleia real em relação a produção de EROs induzida por zymosan em macrófagos.....	18
Figura 6. Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT.....	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Modo vibracional dos espectros de geleia real.....	15
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

10-HDA	Ácido 10-Hidróxi-2-decenoico
ANOVA-MR	Análise de variância com medidas repetidas
ATR	Reflectância Total Atenuada
AUC	Área sob curva
BMDM	Bone marrow-derived macrophage
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DSMO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
FTIR	Infravermelho por transformada de Fourier
GR	Geleia Real
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione dissulfeto
HBSS	Solução salina balanceada de Hank
IL-	Interleucina
IR	Espectroscopia de infravermelha
MRJP	Major royal jelly protein
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólio)
PC	Componente principal
PCA	Análise de componentes principais
ROS	Reactive oxygen species
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TPTZ	(2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina)

1. Apresentação

A geleia real (GR) é uma secreção produzida e secretada pelas glândulas hipofaríngeas e mandibulares das abelhas *Apis mellifera* (L). Esse produto é utilizado como alimento exclusivo da abelha rainha ao longo da vida adulta, a alimentação com geleia real proporciona uma diferenciação morfológica e longevidade para a abelha rainha, além de outras características. Como alimento nutracêutico, a geleia real apresenta diversos benefícios e tem sido estudada em vários âmbitos medicinais e estéticos.

A geleia real é composta por água, carboidratos, lipídeos e proteínas e em menor quantidade, vitaminas, riboflavinas e minerais. Na composição da geleia real alguns componentes se destacam como, as proteínas MRJPS e o ácido graxo 10-HDA, encontrados apenas na geleia real, e amplamente relacionados com o seu potencial antioxidante.

A matriz complexa que forma a geleia real, no entanto, necessita de um armazenamento adequado em baixas temperaturas. A geleia real fresca quando obtida precisa ser preservada abaixo de, 4°C, para evitar degradação em sua composição, a geleia real é ingerida em pequenas porções diárias, no entanto, não são comercializadas em embalagens para uso diário. Várias pesquisas são desenvolvidas sobre armazenamento correto e maneiras de relacionar componentes específicos da geleia real como marcadores de frescor e qualidade do produto. Entretanto, pouco se conhece sobre a qualidade desse produto natural durante o uso pelos consumidores, já que a geleia real precisa ficar armazenada no freezer a -20°C e para o consumo precisa ser retirada diariamente dessa temperatura, passando por alguns ciclos curtos de descongelamento.

É crescente a busca por técnicas práticas e eficazes no controle de frescor, qualidade do produto, adulterações e contaminações em produtos alimentícios. Nesse âmbito, o infravermelho por transformada de Fourier (ATR-FTIR) tem sido cada vez mais testado como técnica de avaliação de qualidade e composição no setor alimentício. Em detrimento de outras técnicas, o ATR-FTIR é uma técnica relativamente simples,

objetiva e prática de análise de composição, com uma aplicabilidade grande em diversos setores.

Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar a composição da geleia real através do ATR-FTIR -ATR durante ciclos consecutivos e padronizados de descongelamentos e analisar se a capacidade antioxidante é afetada diante desses processos, bem como analisar o ATR-FTIR como uma técnica capaz de avaliar a qualidade da geleia real.

2. Introdução

2.1. Geleia Real

A geleia real (GR) é uma secreção produzida pelas glândulas hipofaríngeas e mandibulares das abelhas operárias, sendo o alimento exclusivo da abelha rainha durante todo seu ciclo de vida e essa alimentação difere seu desenvolvimento das abelhas operárias na fase adulta (Pasupuleti et al., 2017), sendo que as abelhas operárias se alimentam de mel e pólen (Yang et. al, 2017).

A geleia real é uma matriz complexa, composta cerca de água, proteínas, carboidratos, lipídios e alguns minerais e aminoácidos essenciais, além de vitaminas. Em sua composição também é encontrada riboflavina, niacina, ácido fólico, biotina e piridoxina e menores quantidades de vitaminas C, D, A e E (Fujii et al., 1990; Oka et al., 2001).

A GR apresenta proteínas específicas, encontradas unicamente em sua composição e são membros da principal família de proteínas da geleia real, as MRJPs, estas são constituídas por nove membros (MRJP1-9) que são responsáveis por 82 a 90% das proteínas totais da GR (Lin et. al, 2019). As MRJPs apresentam atividades farmacológicas importantes como antifúngica e bactericida (Hojo et al., 2010; Tian et al., 2018). Além disso, a MRJP1 induz a diferenciação da abelha rainha (Kamakura, 2011). As MRJPs podem desempenhar um papel multifuncional como componente nutricional da geleia real e suas funções são expressas em diversos tecidos, incluindo o cerebral (Drapeau, 2006).

Outro composto encontrado unicamente na geleia real é o 10-HDA, seu ácido graxo principal, que contribui bastante para as atividades biológicas da GR juntamente com os demais ácidos graxos hidroxicarboxílicos com 8-12 átomos de carbono e seus derivados (Kolayli et al., 2016, Kocot et al., 2018).

Um estudo realizado por Honda et al. (2011) demonstrou que a geleia real foi capaz de prolongar a vida de *C. Elegans* sugerindo que a GR contém fatores capazes de promover longevidade em diversas espécies, resultados semelhantes foram encontrados em *Drosophila melanogaster* e camundongo (Inoue et al., 2003). Nas abelhas, a GR também é responsável por promover a longevidade, as abelhas operárias tem o ciclo de vida de cerca de dias enquanto a abelha rainha pode chegar a um ciclo de vida de 5 anos. Pequenas doses de geleia real se mostraram eficientes em aumentar o tempo de vida de abelhas operárias (Yang, 2017). Na busca por longevidade, estudos mais recentes sugeriram que a geleia real possui importância na modulação dos mecanismos de envelhecimento (Balan et.al, 2020).

A geleia real se apresenta como um potencial nutracêutico, pois além de auxiliar na defesa antioxidante tem potencial anti-inflamatório (Chen et al., 2016), hepatoprotetor (Caixeta et al., 2018), antiestresse (Teixeira et al., 2017), cardioprotetor por diminuir a taxa de peroxidação lipídica cardíaca e lesões histopatológicas como a necrose miocárdica (Malekinejad et al., 2016), melhora a resistência à insulina, diminuiu a hemoglobina glicada e aumenta a atividade antioxidante total sendo benéfica para indivíduos diabéticos (Pourmoradian et al., 2014)

Um estudo realizado por Almeer et. al (2018) demonstrou o efeito nefroprotetor da GR, onde o pré-tratamento com GR exerceu efeito contra a nefrotoxicidade induzida por cádmio em camundongos, causando a excreção do mesmo, prevenindo assim inflamações, apoptose e reestabelecendo o equilíbrio redox. Dados experimentais revelaram que ratos tratados com GR tiveram proteção do sistema hematopoiético, devido a propriedades anti-hiperlipidêmicas que reduzem o risco de aterosclerose (Azab et al., 2011)

Como nutracêutico, a GR foi capaz de aliviar sintomas de mulheres pós-menopáusicas, sendo sugerida como suplemento dietético, auxiliando em patologias associadas ao envelhecimento, como diabetes, obesidade, câncer, osteoporose e

patologias cardiovasculares (Balan et. al, 2020). Diversos artigos revisados por Omer et al. (2019) demonstraram a capacidade da geleia real de diminuir o açúcar no sangue, contribuindo no tratamento da hiperglicemia, através do controle glicêmico. Pourmodian et. al (2014) em estudos também relacionados a glicemia concluíram que a suplementação de geleia real levou a redução do peso corporal no controle de peso para pacientes diabéticos.

Lin et al. (2019) demonstraram que em uma fração de proteína solúvel em água consistindo principalmente de MRJP2, MRJP3 e MRJP7, proteínas específicas da GR, foi capaz de induzir efeitos proliferativos e migratórios de queratinócitos na epiderme humana, sem citotoxicidade, implicando no potencial dos MRJPs na cicatrização de feridas cutâneas, sugerindo que as proteínas da GR podem ter potencial aplicação no tratamento de doenças que prejudicam a cicatrização de feridas e úlceras.

Em estudo sobre inflamações gastrointestinais, o composto 10-HDA, presente na GR inibiu a produção de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , IL-1 β e IL-8 em células, demonstrando que o 10-HDA pode beneficiar o sistema gastrointestinal humano através de sua capacidade anti-inflamatório e antibacteriano (Yang et. al, 2019).

Existe uma ampla variedade de utilizações comerciais e terapêuticas da geleia real, sua composição complexa é capaz de abranger uma gama de usos. Os compostos biologicamente ativos da GR conferem a esse produto natural diversas aplicações farmacêuticas com muitos poucos efeitos colaterais relatados (Balan et. al, 2020).

Na tentativa de manter a qualidade da geleia real comercial, o método de liofilização pode ser empregado, de forma a eliminar a necessidade de congelamento constante da GR. Em um estudo realizado por Nascimento et. al (2015) foi mostrado por cromatografia que o processo de liofilização não degrada de forma significativa ácido graxo 10-HDA em relação a geleia real fresca. O 10-HDA é caracterizado como um biomarcador de qualidade e autenticidade da geleia real.

Outra maneira de comprovar a autenticidade da geleia real é a presença de MRJP1, realizada pelo teste de ELISA, utilizando o anticorpo anti-SPMRJP1 gerado a partir de um único peptídeo regional correspondente à proteína MRJP1 (Shen et al, 2015). No entanto, existe uma busca por métodos mais práticos, eficientes e acessíveis no controle de qualidade de produtos naturais, capazes de fornecer dados precisos sobre sua autenticidade, frescor e presença de patógenos.

2.2 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é caracterizado pelo acúmulo das espécies reativas de oxigênio (EROs) no organismo, é a circunstância onde a concentração de espécies reativas de oxigênio no estado estacionário é transitória ou cronicamente gerada de forma excessiva, causando perturbação no metabolismo celular, prejudicando os constituintes celulares e sua regulação (Breitenbach e Eckel, 2015).

A disponibilidade de energia no organismo depende de cascatas de reações, o equilíbrio entre as reações de oxirredução é responsável pela integridade das células e seu funcionamento correto (Yonezawa et al., 2015). O funcionamento normal da célula está associado a um estado geral reduzido e os antioxidantes endógenos não são capazes de manter o equilíbrio redox, sendo indispensável a ingestão de antioxidantes exógenos obtidos principalmente na alimentação para melhorar a defesa antioxidante e evitar danos ao organismo (Cerqueira et al., 2007).

Os agentes oxidantes são inativados pela produção de glutatona dissulfeto (GSSG) e depleção de glutatona (GSH). Em situações em que o sistema redox está em equilíbrio, haverá recuperação da GSH. Entretanto quando há excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema antioxidante endógeno, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, sendo uma das alterações que caracterizam o estresse oxidativo (Shan et.al,1990).

Os componentes relacionados ao sistema antioxidante endógenos são representados por glutatona, superóxido dismutase, peroxirredoxina, catalase, tioredoxina, ácido úrico, albumina, bilirrubina, proteínas de ligação a ferro e cobre (como Ferritina e Transferrina), coenzima Q, metalotioneínas, melatonina e L-carnitina. (Hohn et. al, 2017).

É evidenciado que as EROs possam estar envolvidas em mais de 50 doenças (Ferreira e Matsubara, 1997). A degradação de proteínas causada por agentes oxidantes está relacionada a doenças como catarata, degeneração macular, Parkinson, Alzheimer, uremia, insuficiência renal crônica, doença pulmonar crônica, inflamação, artrite reumatoide, diabetes e até mesmo câncer (Hohn et. al, 2017).

A senescência é objeto de amplos estudos que procuram entender o envelhecimento, aumentar a longevidade e a qualidade de vida. O envelhecimento está associado, entre outros fatores, ao estresse oxidativo, resultando em um acúmulo de danos as biomoléculas devido ao aumento excessivo de oxidantes, o que pode gerar danos severos a células e tecidos. Quando o dano persiste, aumenta a probabilidade de senescência celular.

Estudos apontam que EROS são os moduladores upstream de autofagia, agindo em mais de uma etapa do processo. Defeitos genéticos de autofagia de genes levam a um aumento da produção de ROS e acúmulo de organelas e DNA danificados que, por sua vez, promovem reprogramação metabólica de forma a induzir tumorigênese. (Filomeni et. al, 2015).

Na tentativa de evitar o desequilíbrio redox, causado pelo acúmulo de radicais livres quando as fontes de antioxidantes endógenos não são suficientes para reestabelecer o equilíbrio, é possível realizar suplementação dietética e obter antioxidantes exógenos. São exemplos a vitamina C, carotenóides, ubiquinol, ácido α -lipóico, flavonóides, polifenóis, antocianidinas, isoflavonas e oligoelementos como zinco e selênio (Hohn et. al, 2017).

Diversas pesquisas são desenvolvidas na busca de compostos com capacidade antioxidante para suplementação dietética de forma prática, segura e sem efeitos colaterais. Devido a essa necessidade é crescente a procura de antioxidantes naturais, como a geleia real.

Aslan e Askoy (2015) mostraram que a geleia real afeta as vias de sinalização para a produção de espécies reativas de oxigênio, impedindo sua produção. Neste estudo, a composição antioxidante da GR conseguiu diminuir a inflamação associada ao dano renal. Liu et. al (2008) demonstraram que a geleia real está envolvida com a eliminação do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e inibição da peroxidação do ácido linoleico. Além disso, a geleia real foi capaz de inibir a formação do radical superóxido e radical hidroxila (Kocot et al., 2018). A geleia real com sua composição complexa apresenta um grande potencial antioxidante e sua aplicação é discutida nas mais diversas áreas da saúde.

2.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelha (IR) é uma técnica baseada no princípio de que quase todas as moléculas absorvem radiação infravermelha, dependendo da estrutura química de cada molécula, a radiação é absorvida em uma frequência específica que permite sua identificação. A radiação infravermelha só é absorvida pela molécula se a vibração natural de sua ligação molecular puder ser estimulada a um estado vibracional de excitação superior, de modo que cada ligação é capaz de contribuir para a formação de um espectro infravermelho (Schultz, 2002). A espectroscopia de infravermelho é um método utilizado por sua sensibilidade, que permite a determinação da composição química e estrutura de pequenas moléculas, podendo ser aplicada a sistemas biológicos (Barth, 2007).

Na espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (ATR-FTIR), todos os comprimentos de onda são coletados simultaneamente, o que resulta em vantagens multiplex e fornece melhor desempenho na relação sinal-ruído (Griffiths & Haseth, 2007). A técnica de ATR-FTIR é capaz de identificar com eficácia e alta precisão as terminações C-H, O-H e N-H de proteínas, a composição lipídica, de carboidratos, ácidos nucleicos e compostos glicídicos (Khaustova et. al, 2010).

Os espectrofotômetros de absorção no infravermelho são construídos com interferômetro de Michelson, de forma que este é usado com um dos espelhos fixos, enquanto o segundo espelho é deslocado e a intensidade óptica na saída do interferômetro é registrada como uma função da diferença de caminho óptico entre os dois espelhos, gerando o interferograma. A transformada de Fourier (FT) desse interferograma fornece o espectro do sinal óptico de entrada, demonstrando a intensidade da radiação não absorvida pela amostra e detectada em função do deslocamento do espelho móvel (Al-Saeed e Khalil, 2009).

Dentre as metodologias de ATR-FTIR existem a de reflexão total atenuada (ATR), transmissão, transflexão, entre outras. A espectroscopia ATR-FTIR se destaca por não causar destruição ou perda da amostra durante a análise, ser de fácil aplicação, necessitar de reduzida quantidade de amostra e a rapidez no tempo de análise (Kendix et al., 2009).

A técnica de ATR-FTIR tem sido amplamente utilizada no controle de qualidade, como na análise de pureza e garantia de qualidade de diferentes tipos de óleos (Smithson et. al, 2018; Valasi et. al, 2020), adulteração de manteigas (Fadzilillah et.al, 2013), diferenciação de fungos de deterioração de alimentos em nível de filo, gênero e espécie (Shapaval et. al, 2013), dentre outros produtos alimentícios.

3. Objetivo

3.1. Objetivo Geral

Avaliar as alterações da composição da geleia real através de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier e a capacidade antioxidante in vitro, durante ciclos de descongelamento por 21 dias, mimetizando as condições de uso desse produto natural pelos consumidores.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar as alterações na composição da geleia real frente a ciclos de descongelamento, comparando ao armazenamento da amostra congelada, utilizando espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.

- Avaliar a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier como método de análise eficaz no controle de qualidade da geleia real.

- Avaliar o impacto de ciclos padronizados e consecutivos de descongelamento da geleia real na sua capacidade antioxidante, utilizando o método de FRAP.

- Avaliar o impacto de ciclos padronizados e consecutivos de descongelamento da geleia real na sua capacidade antioxidante, utilizando o método de ROS in vitro em culturas de células de macrófagos.

4. Materiais e Métodos

4.1 Obtenção das amostras

A geleia real fresca foi obtida no Apiário Girassol (validade: julho de 2022) e alíquotada no laboratório em 63 microtubos. Durante 21 dias, todas as alíquotas foram descongeladas por 5 minutos em temperatura ambiente e novamente congeladas por 24h, de forma que os descongelamentos ocorressem de maneira cumulativa nas amostras ao longo dos dias. A amostra 1 foi considerada como controle, sem descongelamento, enquanto que a amostra 21 passou por 20 ciclos de descongelamento. Todas as análises foram realizadas em triplicata biológica, sendo 3 alíquotas analisadas separadamente e diariamente durante os 21 dias de experimento. Para fins comparativos foram avaliadas também amostras de geleia real vencida (validade: Janeiro 2020) que não passou por nenhum ciclo de descongelamento e uma amostra com 45 dias de uso diário que passou por diversos ciclos de descongelamentos não padronizados.

4.2 Análise de composição no ATR-FTIR

Os espectros das amostras de geleia real foram registrados na região 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} , utilizando o espectrofotômetro ATR-FTIR -ATR Vertex 70 (Bruker Optics, Reinstetten, Alemanha) com um componente de refletância total microatenuada (ATR). O material de cristal era um disco de diamante como elemento de reflexão interna. A película da geleia real varia a profundidade de penetração entre 0,1 e 2 μm e depende do comprimento de onda, ângulo de incidência do feixe e o índice de refração do material de cristal ATR. No cristal de ATR, o feixe infravermelho é refletido na interface em direção à amostra. 5 μl de geleia real foram secos de forma padronizada por 5 minutos diretamente em cristal de ATR com uso do fluxo de ar. O espectro de ar foi usado como pano de fundo na análise ATR-ATR-FTIR. Os espectros de amostra e o fundo foram obtidos com 4 cm^{-1} de resolução e 32 varreduras foram realizadas para análise da composição da amostra.

No processamento das amostras, a linha de base foi corrigida e normalizados pelo vetor antes das análises. As regiões de $3000\text{-}2840\text{ cm}^{-1}$ e $1800\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ foram utilizadas como dados de entrada para a técnica multivariada de análise de componentes principais (PCA). Todas as etapas de pré-processamento e análise espectral foram realizadas com

Origin Pro 9.1 (OriginLab Corporation, Northampton, United States). As análises seguiram o protocolo utilizado por Caixeta et. al. (2020).

4.3 Capacidade Antioxidante Total (FRAP)

A capacidade antioxidante total foi avaliada através do método de FRAP. Esse se baseia na capacidade de redução do Fe^{+3} a Fe^{+2} , o qual é quelado pelo TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) para formar o complexo Fe^{+2} -TPTZ, de coloração azul intensa (BENZIE e STRAIN, 1999). Foram adicionados 10 μl de amostra ao meio de reação contendo tampão acetato de sódio 300 mM pH 3.6, TPTZ 10 mM em HCl 40 mM e cloreto férrico 20 mM. As amostras foram incubadas por 6 min à 37°C e a absorbância lida a 593 nm. A capacidade antioxidante foi calculada a partir da curva padrão de trolox. As amostras foram diluídas na proporção 1:10 em água.

4.4 Inibição da produção de ROS in vitro

Este método foi baseado em Shih, et al. (2016). Macrófagos previamente diluídos em solução salina balanceada de Hank (HBSS) sem vermelho de fenol (Sigma-Aldrich), foram semeados em microplaca de 96 poços opacos brancos a uma densidade de $0,2 \times 10^6$ células / poço. As células foram pré-incubadas com as frações (diluídas em HBSS) durante 30 min a 37 °C e 5% de atmosfera de CO_2 . Em seguida, luminol na concentração final de 625 nmol L^{-1} foi adicionado a cada poço e a geração de ROS foi induzida pelo zymosan (concentração final de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$). A geração de ROS foi monitorada por 40 minutos através da emissão de quimioluminescência resultante da oxidação do luminol usando um leitor de microplaca (Perkin-Elmer LS 55, Massachusetts, EUA). Os resultados foram expressos como unidades de luminescência relativa (RLU).

4.5 Ensaio de viabilidade celular

Esse método foi baseado em Lee e Park (2016). BMDM foram suspensos em RPMI-1640 suplementado. As células foram semeadas em microplaca de 96 poços na

densidade de $0,2 \times 10^6$ células / poço e foram tratadas por 24 h com as frações (diluídas em RPMI-1640). A seguir, o sobrenadante foi removido e incubado com 100 μL da solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólio) na concentração de 5 mg mL^{-1} à temperatura ambiente por 2h. Formazan púrpura formado por células viáveis foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e a absorbância foi medida a 570nm na leitora de microplaca (Molecular Devices, Menlo Park, CA, EUA).

4.6 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM), utilizando o software GraphPadPrism (GraphPad Prism versão 7.0 para Windows; GraphPad Software, San Diego, CA, USA). O teste de normalidade de D'Agostino-Pearson foi aplicado e as análises entre os grupos foram realizadas por análise de variância com medidas repetidas (ANOVA-RM), seguido do teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0.05$.

5. Resultados

A partir da análise de ATR-FTIR das amostras de geleia real, o perfil médio dos espectros é representado na Figura 1A. As principais bandas de destaque do espectro de geleia real são os modos vibracionais em 2927 cm^{-1} (Figura 1B), 1635 cm^{-1} , 1537 cm^{-1} , 1405 cm^{-1} , 1342 cm^{-1} , 1230 cm^{-1} , 1049 cm^{-1} e 1027 cm^{-1} (Figura 1C). No geral, estes picos representam modos vibracionais de componentes relacionados a lipídeos, proteínas e carboidratos. Através do perfil médio dos espectros foi possível identificar uma diminuição gradativa na intensidade dos componentes da geleia real, principalmente, após o 2º e 3º dia de descongelamento comparado com a geleia real antes desse processo. A medida que os demais ciclos de descongelamento foram realizados esta diminuição nos componentes da geleia real também foi observada, porém, de maneira mais branda.

Com a finalidade de avaliar o processo de descongelamento e tempo de uso/validade da geleia real, as amostras foram submetidas à análise de PCA. Foi observado no gráfico de escores de PCA (Figura 2 A) uma separação clara entre as

amostras. O primeiro componente principal (PC-1), foi responsável por 98.2% da variância total explicada entre as amostras, retendo as informações responsáveis pelo padrão de agrupamento obtido no gráfico de escores. Os escores relacionados as amostras sem o processo de descongelamento (amostra 1) e com ciclos consecutivos de descongelamento (amostras 2 a 9) foram agrupados no lado negativo do eixo PC-1, enquanto que as amostras com 10 a 21 dias de ciclos de descongelamento, a GR de uso diário e vencida foram agrupadas do lado positivo. Os loadings de PC-1 que contribuem para a diferenciação entre as amostras são representados na Figura 2B-C. Carregamentos negativos dos modos vibracionais indicam maiores níveis dos picos 2927 cm^{-1} (Figura 2B), 1635 cm^{-1} , 1537 cm^{-1} , 1405 cm^{-1} , 1230 cm^{-1} , 1049 cm^{-1} e 1027 cm^{-1}

(Figura 2C), ou seja, maiores níveis de lipídeos, proteínas e carboidratos nas amostras de GR que não sofreram descongelamento e as que tiveram menores ciclos de descongelamentos (até o 9º dia), em contrapartida, entre o 10º e 21º dias, a GR de uso diário e vencida apresentaram menores intensidades nos espectros destes componentes.

Após um ciclo de descongelamento (amostra 2) é possível observar no gráfico de perfil médio (figura 1C) e no gráfico de escores de PCA (figura 2A) uma diminuição na intensidade dos componentes presentes na GR, o mesmo ocorre no segundo descongelamento (amostra 3). Em seguida há uma diminuição gradual na intensidade dos picos.

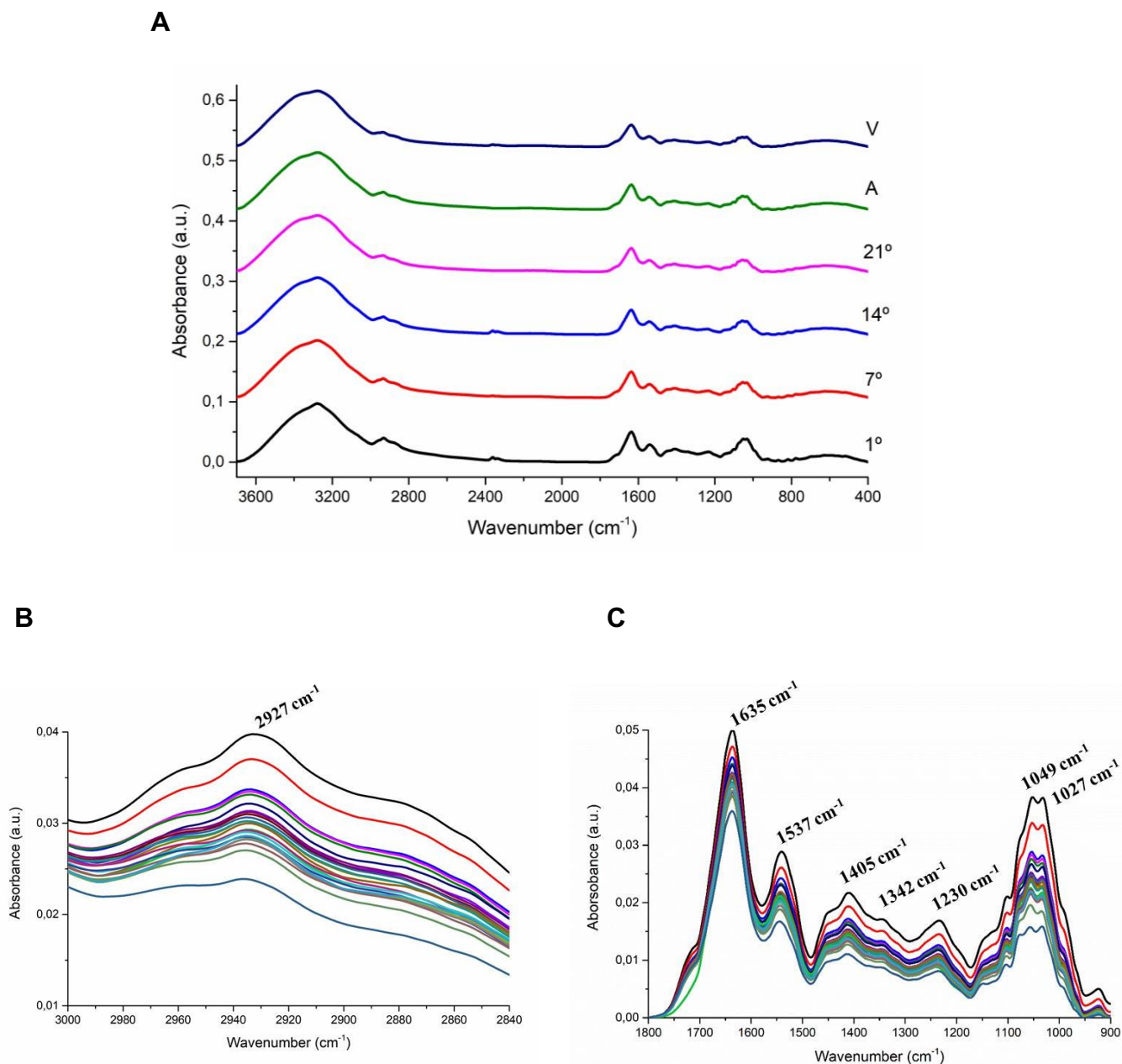


Figura 1. Perfil médio dos espectros:em (A) Perfil médio dos espectros de geleia real entre 3700-400cm⁻¹ sem descongelamento (preto), no 7° dia (vermelho), no 14° dia (azul) e no 21° dia do ciclo de descongelamento (rosa), geleia real de uso diário (verde) e vencida (roxo). (B) Perfil médio dos espectros de geleia real sem descongelamento, nos ciclos de descongelamento, geleia real de uso diário e vencida na região de 3000-2840 cm⁻¹. (C) Perfil médio dos espectros de geleia real sem descongelamento, nos ciclos de descongelamento, geleia real de uso diário e vencida na região de 1800-900 cm⁻¹.

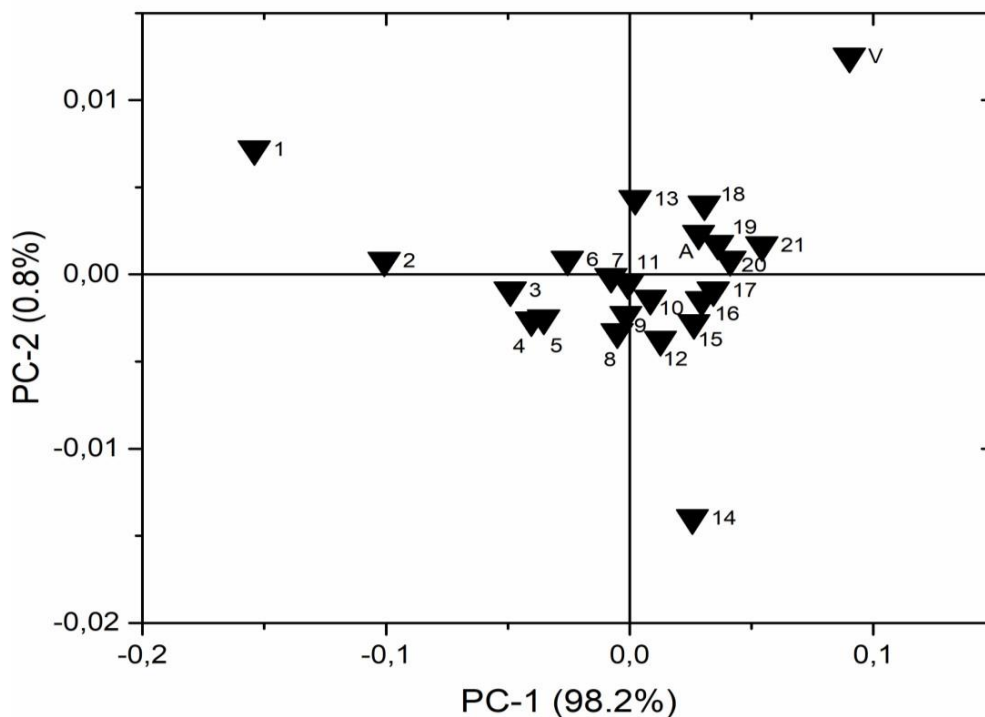
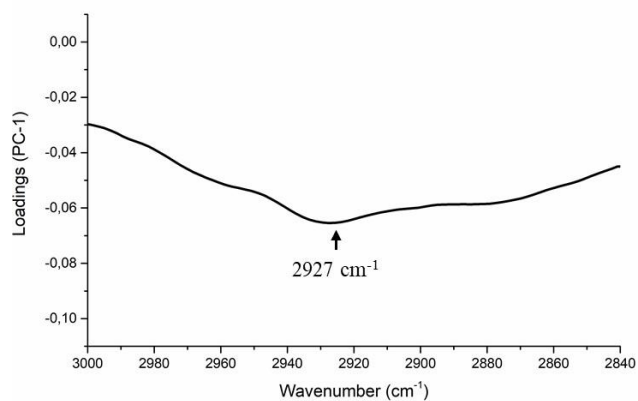
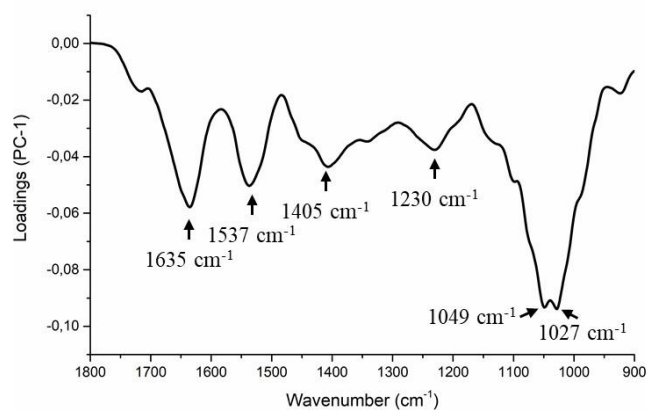
A**B****C**

Figura 2: Gráfico de escores dos componentes principais e loadings de PCA da geleia real: em (A) Gráfico de escores para os componentes principais 1 e 2 dos espectros ($3000\text{-}2840\text{ cm}^{-1}$ e $1800\text{-}900\text{ cm}^{-1}$) da geleia real sem descongelamento (1), com ciclos de descongelamento (2-21), geleia real de uso diário (A) e vencida (V). (B) Gráfico de loadings da PCA entre $3000\text{-}2840\text{ cm}^{-1}$. (C) Gráfico de loadings da PCA entre $1800\text{-}900\text{ cm}^{-1}$.

Tabela 1: Modo vibracional dos espectros de geleia real

Número de onda (cm^{-1}) Modo Vibracional

2927	estiramento assimétrico de CH ₂ de lipídeos
1635	amida I
1537	amida II
1404	deformação angular assimétrica de CH ₃
1342	deformação assimétrica fora do plano de CH ₂
1230	amida III
1049	estiramento C-O juntamente com flexão C-O de carboidratos grupos CH ₂ OH e
1027	estiramento C-O de carboidratos

Referências: Fringeli, 1977; Coates, 2006; Tarantilis et. al, 2012; Lazarevska & Makreski, 2015.

A capacidade antioxidante da geleia real no ensaio de FRAP diminuiu no 21º dia dos ciclos de descongelamento quando comparado com a alíquota sem descongelamento (dia 1). Analisando a amostra de GR de uso diário, a vencida e no 21º dia dos ciclos de descongelamento, observamos que não houve diferença entre elas, porém, todas tiveram uma menor capacidade antioxidante em relação a amostra sem descongelamento. Além disso, não houve diferença entre o 8º e 15º dia dos ciclos de descongelamento em relação a capacidade antioxidante quando comparado com a geleia real sem descongelamento (Figura 3).

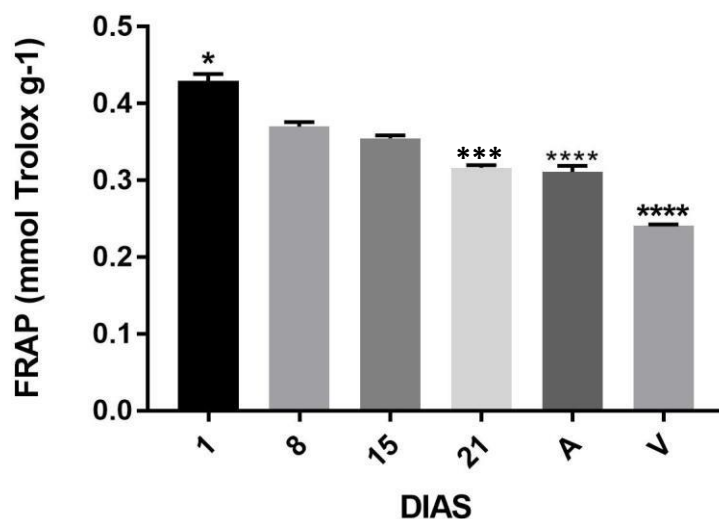


Figura 3. Análise da capacidade antioxidante da geleia real mediante ciclos consecutivos de descongelamento de 5 minutos à temperatura ambiente seguidos de 24h de congelamento: os pontos mostrados no gráfico são referentes ao 1º, 8º, 15º e 21º dias dos ciclos de descongelamento, sendo que o dia 1 corresponde a amostra sem descongelamento. As amostras de geleia real de uso diário e vencida são representadas pelas letras A e V, respectivamente. Valores expressos como média \pm erro padrão. * $p < 0.05$ quando comparado com o dia 1.

Avaliando a produção de EROs pelos macrófagos estimulados com zymosan, verificamos que a geleia real nas concentrações de 10 mg/mL e 1mg/mL apresentaram uma capacidade antioxidante elevada quando comparada ao controle com zymosan, mesmo no 15º dia dos ciclos de descongelamento (Figura 5). No 21º dia dos ciclos de descongelamento não foi observada diferença em relação a capacidade antioxidante quando comparada ao controle com zymosan (Figura 5). Além disso, não houve diferença na capacidade antioxidante da geleia real entre os ciclos de descongelamento nessas concentrações. Quando avaliamos a concentração de geleia real de 100mg/mL, essas amostras inibiram totalmente a produção de EROs em todos os momentos analisados, demonstrando uma alta capacidade antioxidante (Figura 4).

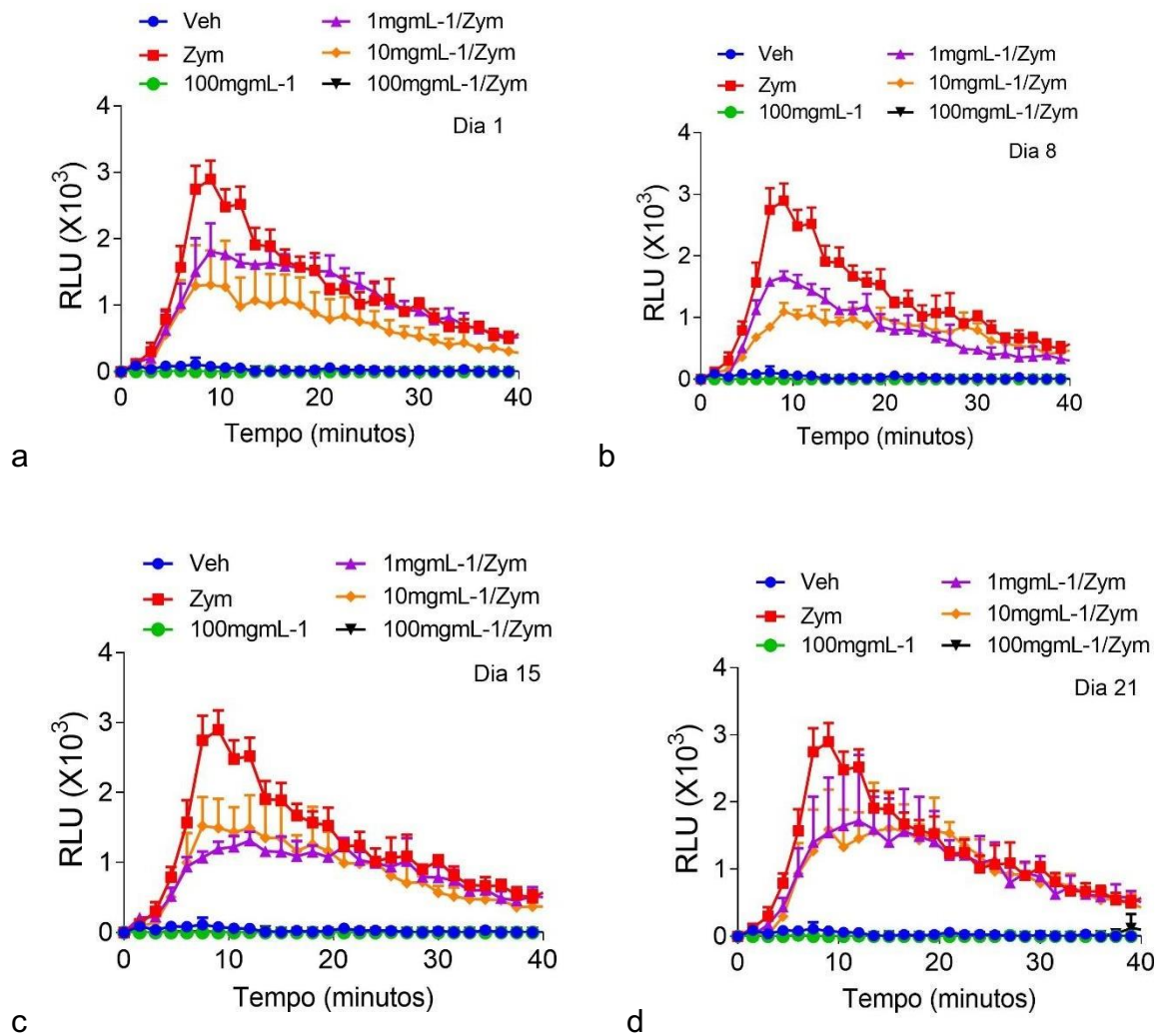


Figura 4. Produção de EROs em macrófagos: os valores (média \pm desvio padrão) são expressos como unidades luminescentes relativas (RLU) para o dia 1 (a), amostra sem descongelamento e dias 8 (b), 15 (c) e 21 (d) dos ciclos de descongelamento. Med: meio, Zym: zymosan.

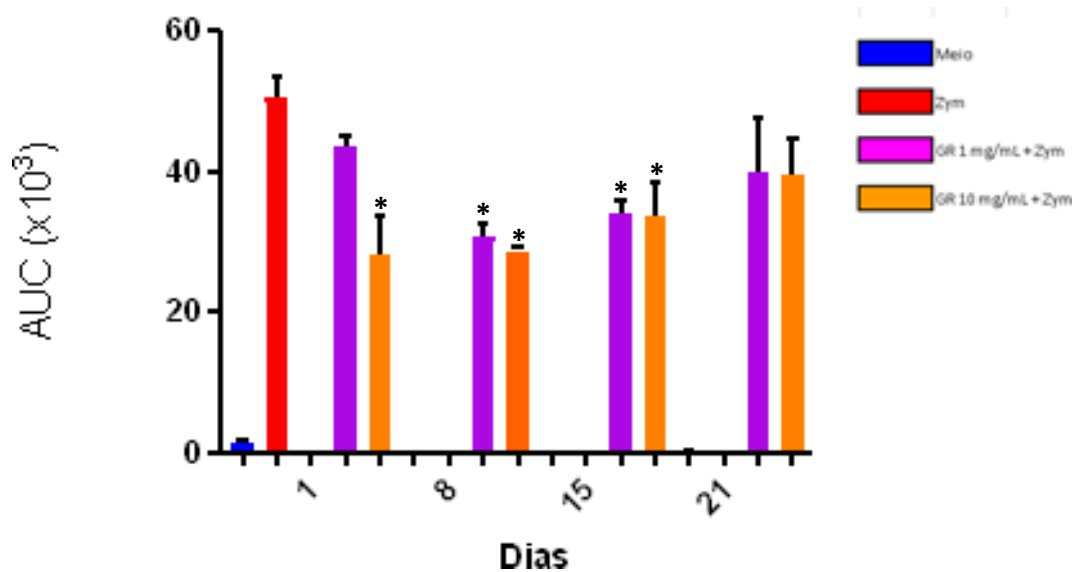


Figura 5. Área sobre a curva (AUC) da avaliação da capacidade antioxidante da geleia real em relação a produção de EROs induzida por zymosan em macrófagos: * $p < 0.05$ quando comparado com o zymosan (vermelho).

Não houve diferença na viabilidade celular entre os dias de descongelamento, mesmo na amostra de geleia real vencida, que demonstrou uma viabilidade celular acima de 95%. A concentração de 100mg/mL da geleia real diminuiu a viabilidade celular, em relação ao controle e as demais concentrações, porém a mesma ainda se manteve acima de 95%, o que é um resultado muito satisfatório. Em baixas concentrações (1mg/mL), a geleia real obteve viabilidade celular acima do controle, onde havia presença apenas do meio (Figura 6).

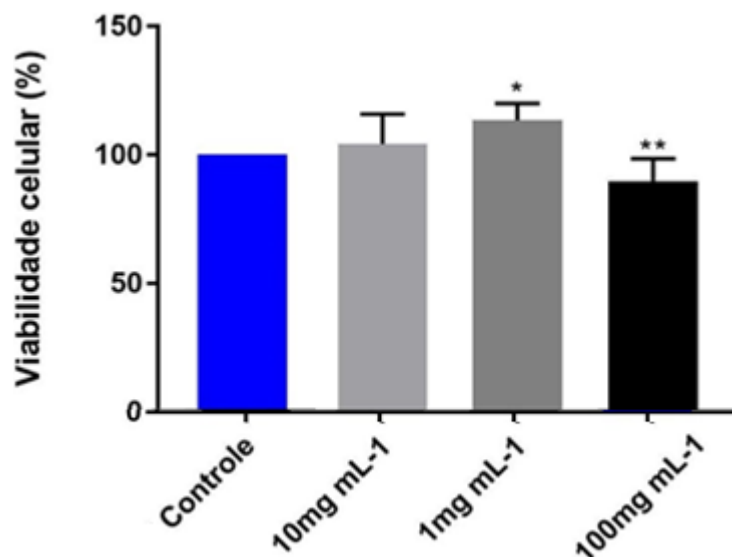


Figura 6. Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT: resultados expressos em porcentagem da viabilidade celular em comparação ao controle. * $p < 0.05$ quando comparado com controle.

5. Discussão

A geleia real, um produto secretado pelas glândulas hipofaríngeas e mandibulares das abelhas operárias, apresenta uma variedade de compostos bioativos com diferentes propriedades biológicas, sendo um interessante produto natural para a saúde humana. Dentre as atividades biológicas, se destaca a capacidade antioxidante (Ahmad et. al, 2020). O desenvolvimento e implementação de técnicas de produção para aumentar e otimizar a produção da geleia real (Li & Aiping, 2005), assim como técnicas para controle de qualidade e adulteração são muito importantes, pois influenciam diretamente nas propriedades e funções que esse produto natural pode desempenhar. Nesse trabalho, o intuito foi verificar os efeitos de ciclos de descongelamento que envolvem as condições de uso da geleia real pelos consumidores, onde a geleia real sofre constantes mudanças de temperatura ao longo do tempo de armazenamento.

Glassford et. al (2013) realizou um estudo para avaliar a técnica de FTIR-ATR na análise de proteínas e concluiu que esta técnica tem grande potencial para uso em áreas de pesquisa de proteínas como, por exemplo, na purificação e separação, mas também

no desenvolvimento de biofarmacêutico, por ser uma técnica poderosa, eficiente e que não causa destruição ou perda na amostra durante sua análise e que pode ser usada para fornecer análise sensível de proteínas. Além disso, esse método pode ser usado no controle de qualidade de lipídeos por conseguir classificar e quantificar de forma eficiente possíveis adulterações por adição de outros tipos de ácidos graxos (Fadzilliah et.al, 2013).

Utilizando a técnica de FTIR -ATR para avaliação das amostras de geleia real durante ciclos consecutivos e padronizados de descongelamento, foi possível observar alterações nos picos de 1537 e 1635 cm^{-1} , associadas a amida I e amida II, respectivamente, o que poderia significar uma perda nas proteínas da geleia real durante o processo de uso desse produto natural. De acordo com o Li et al. (2008), a MRJP4 é a proteína mais termosensível da geleia real, embora as demais MRJPs (1, 2 e 3) também sejam sensíveis a temperatura, podendo ser degradadas após longo período de exposição em temperatura ambiente. Um estudo realizado por Kamakura et. al (2001), demonstrou que a proteína MRJP1 da geleia real foi degradada proporcionalmente ao aumento da temperatura e tempo de armazenamento, enquanto a MRJP2 apresenta degradação mesmo à temperatura de 4°C.

É importante ressaltar que as amostras dos dias 18, 19, 20, 21 e amostra de uso diário, no gráfico de escores da PCA, se mantêm agrupados bem distantes da amostra 1 sem descongelamento. Nos primeiros ciclos de descongelamento existe uma diminuição mais acentuada desses modos vibracionais relacionados às proteínas no espectro, depois essa diminuição é mais branda, evidenciando, portanto, uma degradação gradual em função dos ciclos consecutivos de descongelamento, que se assemelham ao processo de uso diário da geleia real pelos consumidores.

A amostra de geleia real vencida, que não sofreu nenhum ciclo de descongelamento, apresentou a maior variação em comparação com a amostra 1, que estava dentro do prazo de validade e sem descongelamento. Esses resultados indicam uma diminuição considerável dos componentes protéicos, lipídicos e de carboidratos analisados por ATR-FTIR nas amostras de geleia real vencida, demonstrando a influência do tempo de armazenamento como um fator relevante na perda de qualidade da geleia real, independentemente do seu armazenamento em baixas temperaturas.

Lazarevska & Makreski (2015) avaliaram o efeito do aumento da temperatura na degradação de proteínas da geleia real. A análise do FTIR-ATR revelou que o aumento da temperatura acelera a degradação de proteínas, observada pelo aumento da razão entre a intensidade da amida II e amida I. A análise dos espectros mostrou que a degradação das proteínas em amostras frescas de geleia real é proporcional ao aumento gradiente de temperatura, começando em torno de 30 °C, sendo significativamente acelerada em torno de 65-70 °C (Lazarevska & Makreski, 2015). Além disso, Tarantilis et. al (2012) demonstrou que a geleia real pode ser armazenada a -4°C apenas por 7 semanas sem perda de suas características, por 21 semanas quando armazenada a -20°C e à temperatura ambiente por 3 dias, para que haja uma baixa degradação das proteínas.

A região de 3000 a 2800 cm^{-1} representa o estiramento dos grupos CH₃ e CH₂ dos ácidos graxos (Santos, 2007). Observamos uma diminuição crescente na intensidade do pico de 2927 cm^{-1} relacionado ao alongamento assimétrico de CH₂, o que sugere a perda de ácidos graxos mediante os ciclos de descongelamento da geleia real. Os ácidos graxos são de suma importância na geleia real para seu uso medicinal, o principal deles é o 10-HDA pelo antimicrobiano (Fratini et. al, 2016), proteção da pele contra raios ultravioleta (Park et. al, 2011) e anticâncer (Filipic et. al, 2015), sendo que esse ácido graxo também representa um indicador de adulteração nas amostras frescas de geleia real (Sabatini et al., 2009). Antinelli et. al (2003) relatou que o processo de homogeneização e repetidas variações curtas de temperatura tendem a aumentar a perda do 10-HDA durante o armazenamento longo a 4°C, devido à incorporação de ar associada com uma via enzimática ativa a 4°C que desencadeia a oxidação lipídica. Além disso, a degradação dos ácidos graxos da geleia real pode ser observada também na textura da mesma, onde se observa uma diminuição da viscosidade no decorrer dos ciclos de descongelamento.

A análise de PCA apresentou eficiência para distinguir entre a amostra vencida, amostra fresca (sem descongelamento) e as amostras que sofreram degradação devido aos ciclos de descongelamento. Portanto, o método de ATR-FTIR -ATR associado a análise de PCA demonstrou avaliações satisfatórias quanto ao seu uso no controle de qualidade da geleia real, sugerindo sua aplicabilidade para testar o frescor e a qualidade

desse produto da abelha. Essa técnica tem sido utilizada para análise de controle de qualidade e adulteração de alimentos como do óleo de pítasche (Valasi et. al, 2020), já que possui diversas vantagens como rapidez, não necessita de preparação prévia da amostra, alta especificidade e reprodutibilidade.

Durante o armazenamento da geleia real, ocorrem mudanças de coloração devido a oxidação e reações de Maillard, aumento da viscosidade e acidez devido a oxidação de lipídeos, e diminuição do conteúdo de carboidratos e atividade enzimática (Muresan et al., 2016). Essas moléculas podem estar associadas às atividades biológicas desempenhadas pela geleia real como, por exemplo, a atividade antioxidante, que já foi demonstrada por diversos autores como Salahsoor et. al (2019) que mostraram que a administração de geleia real por 15 dias, após indução de isquemia/reperfusão, foi capaz de diminuir os níveis de estresse oxidativo e Ghanbari et. al (2016) que evidenciaram que a geleia real administrada em ratos aumentou a capacidade antioxidante, analisada pelo método de FRAP.

Nesse trabalho, avaliamos a capacidade antioxidante através do ensaio de FRAP e verificamos que a perda de componentes afetou a atividade biológica da GR. A amostra 1, sem nenhum descongelamento, apresentou a maior capacidade antioxidante e ao longo dos ciclos de descongelamento essa capacidade foi diminuindo gradativamente. Diferenças significativas na capacidade antioxidante foram evidenciadas no 21º dia dos ciclos de descongelamento. A amostra de geleia real de uso diário, com cerca de 45 dias de uso com descongelamentos não padronizados, apresentou resultados semelhantes aos da amostra do dia 21, enquanto a geleia real vencida apresentou níveis ainda mais baixos de capacidade antioxidante, mesmo permanecendo congelada durante todo o tempo de armazenamento.

A forma de armazenamento da geleia real foi avaliada por períodos de tempo específicos e temperatura constante por Borguini et al. (2012) que verificou que o método tradicionalmente utilizado para conservação da geleia real (congelamento a -18°C) durante 120 dias foi eficiente para manter a capacidade antioxidante da geleia real sem alterações expressivas ao longo do tempo de armazenamento. Na literatura não identificamos nenhum outro trabalho que avaliou ciclos de descongelamento ao longo do tempo de armazenamento, como realizado nesse trabalho.

Além disso, avaliamos a capacidade antioxidante da geleia real em cultura de células de macrófagos, estimulados com zymosan para a produção de EROs. Os resultados in vitro confirmaram os resultados encontrados pelo método de FRAP. A geleia real nas concentrações de 10 e 1 mg/mL manteve sua capacidade antioxidante até o 15º dia dos ciclos de descongelamento, em contrapartida, no 21º dia as amostras de geleia real não foram capazes de neutralizar a produção de EROs em relação ao controle.

Em relação a viabilidade celular, os ciclos de descongelamento e a amostra de geleia real vencida não alteraram a viabilidade dos macrófagos, o que sugere que a degradação de componentes da geleia real por descongelamento ou por não estarem no prazo de validade não gera produtos citotóxicos. A concentração de 100mg/mL da geleia real que apresentou elevada capacidade antioxidante não foi citotóxica. Além disso, a geleia real a 1mg/mL apresentou um resultado interessante, aumentando a viabilidade celular acima do meio de cultura, sugerindo um possível benefício desse produto natural para as células. Corroborando com esses dados, Chen* et. al (2016) propôs o uso de proteínas da geleia real como meio de cultura para crescimento de células humanas e concluiu que as MRJPs seriam eficientes para substituir parcialmente o soro fetal bovino.

Portanto, considerando os resultados da capacidade antioxidante e do ATR-FTIR é possível concluir que a propriedade antioxidante da geleia real está associada à sua composição íntegra, e mudanças causadas pelos descongelamentos consecutivos geraram alterações em sua composição e, conseqüentemente, em sua capacidade antioxidante. Além disso, por meio da técnica de ATR-FTIR, neste estudo indicamos alguns picos potenciais para avaliação da viabilidade da GR. Até o presente momento, esse é o primeiro trabalho a avaliar a geleia real simulando as condições de uso desse produto natural pelos consumidores. armazenada congelada em porções individuais que permitam ao consumidor um descongelamento único para que a composição molecular deste produto natural seja mantida nos mesmos níveis de concentração, descongelar apenas a porção que será ingerida após o descongelamento. Dessa forma, há uma necessidade de atenção a esses fatores em avaliações de qualidade da geleia real e orientação dos consumidores, principalmente na utilização da geleia real para fins medicinais.

7. Referências

AHMAD, S.; CAMPOS, M.G.; FRATINI, F.; ALTAYE, S.Z.; LI, J. New Insights into the Biological and Pharmaceutical Properties of Royal Jelly. **Int. J. Mol. Sci.** 2020, v.21, n.2, .382, Jan 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21020382>

ALMEER, R.S.; ALARIFI, S.; ALKAHTANI, S.; IBRAHIM, S.R.; Ali, D.; MONEIM, A. The potential hepatoprotective effect of royal jelly against cadmium chloride-induced hepatotoxicity in mice is mediated by suppression of oxidative stress and upregulation of Nrf2 expression. **Biomed Pharmacother**; v.106, p.1490-1498, Out 2018, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.089>

AL-SAEED, T.A.; KHALIL, D.A.; Dispersion compensation in moving-optical-wedge Fourier transform spectrometer. **Appl Opt.** v. 48, n.20, .3979-87, Jul 2009. <https://doi.org/10.1364/AO.48.003979>

ANTINELLI, J. F.; ZEGGANE, S.; DAVICO, R, ROGNONE, C.; FAUCON, L. L.; Evaluation of (E)-10-hydroxydec-2-enoic acid as a freshness parameter for royal jelly. **Food Chemistry.** v.80, n.1, p.85-89, Jan 2003. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00243-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00243-1)

ASLAN, Z.; AKSOY, L.; Anti-inflammatory effects of royal jelly on ethylene glycol induced renal inflammation in rats. **Int Braz J Urol.**, v.41, n.5, p.1008-13, Out 2015. <https://doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2014.0470>

AZAB, K.S.; BASHANDY, M.; SALEM, M.; AHMED, O.; TAWFIK, Z.; HELAL, H. Royal jelly modulates oxidative stress and tissue injury in gamma irradiated male Wister Albino rats. **N Am J Med Sci.**, v.3, n.6, p.268-76. Jun 2011. <https://doi.org/10.4297/najms.2011.3268>

BĂLAN, A.; MOGA, M.A.; DIMA, L.; TOMA, S.; ELENA NECULAU, A.; ANASTASIU, C.V. Royal Jelly-A Traditional and Natural Remedy for Postmenopausal Symptoms and Aging-Related Pathologies. **Molecules**, v.25, n.14, p.3291, Jul 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25143291>

BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1767, n. 9, p. 1073-101, Sep 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2007.06.004>

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods Enzymol**, v. 299, p. 15-27, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99005-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99005-5)

BORGUINI, R.G.; DUARTE, F.; ALVES, M. L. T. M. F.; TEIXEIRA, E. W.; MORETI, A. C. de C. C. Avaliação do potencial antioxidante da geleia real ao longo do tempo de armazenamento. **Biotemas**, v.25, n.3, p.257-263, Mai 2012. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2012v25n3p257>

BREITENBACH, M.; ECKL, P. Introduction to Oxidative Stress in Biomedical and Biological Research. **Biomolecules**, v.5, n.2, p.1169-77, Jun 2015. <https://doi.org/10.3390/biom5021169>

CAIXETA, D. C., AGUIAR, E., CARDOSO-SOUSA, L., COELHO, L., OLIVEIRA, S. W., ESPINDOLA, F. S., RANIERO, L., CROSARA, K., BAKER, M. J., SIQUEIRA, W. L.; SABINO-SILVA, R. Salivary molecular spectroscopy: A sustainable, rapid and non-invasive monitoring tool for diabetes mellitus during insulin treatment. **PloS one**, v.15, n.3, e0223461, Mar 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223461>

CAIXETA, D. C.; TEIXEIRA, R. R.; PEIXOTO, L. G.; MACHADO, H.L.; BAPTISTA, N.B.; de SOUZA, A.V.; VILELA, D.D.; FRANCI, C.R.; SALMEN, Espindola F. Adaptogenic potential of royal jelly in liver of rats exposed to chronic stress. **PloS one**, San Francisco, v. 13, n. 1, p. e0191889, Jan 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191889>

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G. de; AUGUSTO, Ohara. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 441-449, Abr 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200036>

CHEN*, D.; XIN, X.X.; QIAN, H.C.; YU, Z.Y.; SHEN, L.R. Evaluation of the major royal jelly proteins as an alternative to fetal bovine serum in culturing human cell lines. **J Zhejiang Univ SciB**, v.17, n.6, p.476-83, Jun 2016. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1500295>

CHEN, Y.; WANG, K.; ZHANG, Y.; ZHENG, Y.; HU, F. In Vitro Anti-Inflammatory Effects of Three Fatty Acids from Royal Jelly. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, p. 1-11, Out 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3583684>

COATES, John. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. **Encyclopedia of Analytical Chemi**, p. 10815–10837, Set 2006. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a5606>

DRAPEAU, M.D.; ALBERT, S.; KUCHARSKI, R.; PRUSKO, C.; MALESZKA, R. Evolution of the Yellow/Major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees. **Genome Res.**, v.16, n.11, p.1385-94, Nov 2006. <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.5012006>

FADZLILLAH, N.A; ROHMAN, A.; ISMAIL, A.; MUSTAFA, S.; KHATIB, A. Application of ATR-FTIR spectroscopy coupled with multivariate analysis for rapid estimation of butter adulteration. **J Oleo Sci.**, p.62, n.8, p.555-62, Ago 2013. <https://doi.org/10.5650/jos.62.555>

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, Mar 1997. <https://doi.org/10.1590/S0104-42301997000100014>

FILIPIC, B.; GRADISNIK, L.; RIHAR, K.; SOOS, E.; PEREYRA, A.; POTOKAR, J. The influence of royal jelly and human interferon-alpha (HuIFN-alpha N3) on proliferation, glutathione level and lipid peroxidation in human colorectal adenocarcinoma cells in vitro. **Arh. Hig. Rada Toksiko.**, v.66, n.4, p.269–274, Dec 2015. <https://doi.org/10.1515/aiht-2015-66-2632>

FILOMENI, G.; DE ZIO, D.; CECCONI, F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. **Cell Death Differ.**, v.22, n.3, p.377-88, Mar 2015. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.150>

FRATINI, F.; CILIA, G.; MANCINI, S.; FELICIOLI, A. Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. **Microb. Res.**, v. 192, p.130–141, Nov 2016. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.06.007>

FRINGELI, U.P. The structure of lipids and proteins studied by attenuated total reflection (ATR) infrared spectroscopy. II. Oriented layers of a homologous series:

phosphatidylethanolamine to phosphatidylcholine. **Z Naturforsch C Biosci.** vol. 32, n. 1-2, p. 20-45, Jan-Feb 1977. <https://doi.org/10.1515/znc-1977-1-205>

FUJII, A.; KOBAYASHI, S.; KUBOYAMA, N.; FURUKAWA, Y.; KANEKO, Y.; ISHIHAMA, S., YAMAMOTO, H., TAMURA, T. Augmentation of wound healing by royal jelly (RJ) in streptozotocin-diabetic rats. **Jpn J Pharmacol.**, v.53, n.3, p.331-7, Jul 1990. <https://doi.org/10.1254/jip.53.331>

GHANBARI, E.; NEJATI, V.; KHAZAEI, M. Antioxidant and protective effects of Royal jelly on histopathological changes in testis of diabetic rats. **Int J Reprod Biomed.**, v.14, n.8, p.519-26. Aug 2016. <https://doi.org/10.29252/ijrm.14.8.519>

GLASSFORD, S.E.; BYRNE, B.; KAZARIAN, S.G. Recent applications of ATR ATR-FTIR spectroscopy and imaging to proteins. **Biochim Biophys Acta.**v.1834, n. 12, p.2849-58, Dec 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.07.015>

GRIFFITHS, P. R.; HASETH, J. A. de Fourier Transform Infrared Spectroscopy. v.90, n.12, .1240-1241, Dez 1986. <https://doi.org/10.1002/bbpc.19860901224>

HONDA, Y.; FUJITA, Y.; MARUYAMA, H.; ARAKI, Y.; ICHIHARA, K.; SATO, A.; KOJIMA, T.; TANAKA, M.; NOZAWA, Y. ITO, M.; HONDA, S. Lifespan-extending effects of royal jelly and its related substances on the nematode *Caenorhabditis elegans*. **PloS one**, v.6, n.8, e23527. Ago 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023527>

KENDIX, E.L.; PRATI, S.; JOSEPH, E.; SCIUTTO, G.; MAZZEO, R. ATR and transmission analysis of pigments by means of far infrared spectroscopy. **Anal Bioanal Chem.**, v.394, n.4, p.1023-32, Jun 2009. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2691-2>

INOUE, S.; KOYA-MIYATA, S.; USHIO, S.; IWAKI, K.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Royal Jelly prolongs the life span of C3H/HeJ mice: correlation with reduced DNA damage. **Exp Gerontol.**, v.38, n.9, p.965-9, Set 2003. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(03\)00165-7](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(03)00165-7)

KAMAKURA, M.; FUKUDA, T.; FUKUSHIMA, M.; YONEKURA, M. Storage-dependent Degradation of 57-kDa Protein in Royal Jelly: a Possible Marker for Freshness. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 65, n.2, p. 277–284, Jan 2001. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.277>

KAMAKURA, M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. **Nature**, v.473, n.7348, p.478-83, Mai 2011. <https://doi.org/10.1038/nature10093>

KHAUSTOVA, S.; SHKURNIKOV, M.; TONEVITSKY, E.; ARTYUSHENKO, V.; TONEVITSKY, A. Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. **Analyst.**, v.135, n.12, p.3183-92, Dec 2010. <https://doi.org/10.1039/C0AN00529K>

KOCOT, J.; KIEŁCZYKOWSKA, M.; LUCHOWSKA-KOCOT, D.; KURZEPA, J.; MUSIK, I. Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application. **Oxid Med Cell Longev.**, v.2018, ID 7074209, p. 1-29, Mai 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7074209>

KOLAYLI, S.; SAHIN, H.; CAN, Z.; YILDIZ, O.; MALKOC, M.; ASADOV, A. A Member of Complementary Medicinal Food: Anatolian Royal Jellies, Their Chemical Compositions, and Antioxidant Properties. **J Evid Based Complementary Altern Med.**, v.21, n.4, p.43-8. Out 2016. <https://doi.org/10.1177/2156587215618832>

HÖHN, A.; WEBER, D.; JUNG, T.; OTT, C.; HUGO, M.; KOCHLIK, B.; KEHM, R.; KÖNIG, J.; GRUNE, T.; CASTRO, J.P. Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. **Redox Biol.**, v.11, p.482-501, Abr 2017. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.001>

HOJO, M.; KAGAMI, T.; SASAKI, T. et al. Reduced expression of major royal jelly protein 1 gene in the mushroom bodies of worker honeybees with reduced learning ability. **Apidologie**, v.41, n.2, p.194–202, Mar 2010. <https://doi.org/10.1051/apido/2009075>

LAZAREVSKA, S.; MAKRESKI, P. Insights into the infrared and Raman spectra of fresh and lyophilized Royal Jelly and protein degradation IR spectroscopy study during heating. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v.34, n.1, p. 87–88, Jun 2015. <http://dx.doi.org/10.20450/mjcce.2015.669>

LEE, J. Y.; PARK, W. Anti-inflammatory effects of oroxylin A on RAW 264.7 mouse macrophages induced with polyinosinicpolycytidylic acid. **Experimental and therapeutic medicine** v.12, n.1, p. 151–156, Jul 2016. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3320>

LI, J.; AIPING, W. Comprehensive technology for maximizing royal jelly production. **Am. Bee J.** v.145, p.661-664, Ago 2005. Disponível

em:<https://www.researchgate.net/publication/292821721_Comprehensive_technology_for_maximizing_royal_jelly_production>.

LI, J.K.; FENG, M.; ZHANG, L.; ZHANG, Z.H.; PAN, Y.H. Proteomics analysis of major royal jelly protein changes under different storage conditions. **J Proteome Res.**, v.7, n. 8, p. 3339-53, Jul 2008. <https://doi.org/10.1021/pr8002276>

LIN, Y.; SHAO, Q.; ZHANG, M.; LU, C.; FLEMING, J.; SU, S. Royal jelly-derived proteins enhance proliferation and migration of human epidermal keratinocytes in an in vitro scratch wound model. **BMC Complement Altern Med.**, v.19, n.1, ID175, Jul 2019. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2592-7>

LIU, J.R.; YANG, Y.C.; SHI, L.S.; PENG, C.C. Antioxidant properties of royal jelly associated with larval age and time of harvest. **J Agric Food Chem.**, v. 56, n.23, p.11447-52, Dec 2008. <https://doi.org/10.1021/jf802494e>

MALEKINEJAD, H.; AHSAN, S.; DELKHOSH-KASMAIE, F.; CHERAGHI, H.; REZAEI-GOLMISHEH, A.; JANBAZ-ACYABAR, H. Cardioprotective effect of royal jelly on paclitaxel-induced cardio-toxicity in rats. **Iran J Basic Med Sci.**, v.19, n.2, p.221-7, Fev 2016. Disponível em:<https://www.researchgate.net/publication/296384790_Cardioprotective_effect_of_royal_jelly_on_paclitaxel-induced_cardio-toxicity_in_rats>.

MUREȘAN, C.; MARGHITAȘ, L. A.; DEZMIREAN, D.S.; BOBIȘ, O.; BONTA, V.; ZACHARIAS, I.; MARGAOAN, R.; PAȘCA, C. Quality Parameters for Commercial Royal Jelly. **Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies**, v. 73, n. 1, p. 37-44, Jan 2016. <http://dx.doi.org/10.15835/buasvmcn-asb:11630>

NASCIMENTO, A.P.; MORAES, L.A.; FERREIRA, N.U.; MORENO, G. de P.; UAHIB, F.G.; BARIZON, E.A.; BERRETTA, A.A. The Lyophilization Process Maintains the Chemical and Biological Characteristics of Royal Jelly. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v.2015, e825068, Abr 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/825068>

OKA, H.; EMORI, Y.; KOBAYASHI, N.; HAYASHI, Y.; NOMOTO, K. Suppression of allergic reactions by royal jelly in association with the restoration of macrophage function and the improvement of Th1/Th2 cell responses. **Int Immunopharmacol.**, v.1, n.3, p.521-32, Mar 2001. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(00\)00007-2](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(00)00007-2)

OMER, K.; GELKOPF, M. J.; NEWTON, G. Effectiveness of royal jelly supplementation in glycemic regulation: A systematic review. **World journal of diabetes**, v. 10, (2), p.96–113, Fev 2019. <https://doi.org/10.4239/wjd.v10.i2.96>

PARK, H.M.; HWANG, E.; LEE, K.G.; HAN, S.-M.; CHO, Y.; KIM, S.Y. Royal Jelly Protects Against Ultraviolet B–Induced Photoaging in Human Skin Fibroblasts via Enhancing Collagen Production. **J. Med. Food**, v.14, n.9, p.899-906, Ago 2011. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.1363>

PASUPULETI, V.R.; SAMMUGAM, L.; RAMESH, N.; GAN, S.H. Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. **Oxid Med Cell Longev.**, v.2017, ID 1259510, 21 pages, Jul 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1259510>

POURMORADIAN, S.; MAHDAVI, R.; MOBASSERI, M.; FARAMARZI, E.; MOBASSERI, M. Effects of royal jelly supplementation on glycemic control and oxidative stress factors in type 2 diabetic female: a randomized clinical trial. **Chin J Integr Med.**, v.20, n.5, p.347-52, Mai 2014. <https://doi.org/10.1007/s11655-014-1804-8>

SABATINI, A.; MARCAZZAN, G.; CABONI, M.; BOGDANOV, S.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Quality and standardisation of Royal Jelly. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**. v.1, n.1, p 16-21, Fev 2009. <https://doi.org/10.3896/IBRA.4.01.1.04>

SALAHSHOOR, M.R.; JALILI, C.; ROSHANKHAH, S. Can royal jelly protect against renal ischemia/reperfusion injury in rats? **Chin J Physiol.**, v.62, n.3, p.131-137, Mai-Jun 2019. https://doi.org/10.4103/CJP.CJP_36_19

SANTOS, P. M. dos; CARDOSO, M. A. G.; KHOURI S.; JUNIOR, A. R. de P.; UEHARA, M.; SAKANE, K. K. Utilização da microespectroscopia infravermelha (FT-IR) para teste de algoritmos estatísticos na diferenciação dos micro-organismos *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* e *Candida parapsilosis*. **Rev. Bras. Eng. Bioméd.**, vol.28, n.4, p.398-409, Jul 2012. <http://dx.doi.org/10.4322/rbeb.2012.037>

SHAPAVAL, V.; SCHMITT, J.; MØRETRØ, T.; SUSO, H.P.; SKAAR, I.; ÅSLI, A.W.; LILLEHAUG, D.; KOHLER, A. Characterization of food spoilage fungi by ATR-FTIR

spectroscopy. **J Appl Microbiol.**, v. 114, n.3, .788-96, Mar 2013.
<https://doi.org/10.1111/jam.12092>

SHAN, X.; Aw TY, Jones DP. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther.**, v. 47, n.1, p. 61-71, 1990. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(90\)90045-4](https://doi.org/10.1016/0163-7258(90)90045-4)

SHEN, L.R.; WANG, Y.R.; ZHAI, L.; ZHOU, W.X.; TAN, L.L.; LI, M.L.; LIU, D.D.; XIAO, F. Determination of royal jelly freshness by ELISA with a highly specific anti-apalbumin 1, major royal jelly protein 1 antibody. **J Zhejiang Univ Sci B.**, v.16, n.2, p.155-166, Feb 2015.
<https://doi.org/10.1631/jzus.B1400223>

SHIH, D.; KANAZAWA, Y.; HAMILL, A.; MCGOVERN, D.; FUKATA, M.; TARGAN, S. P-189 atg16l1 Deficiency Leads to Mitochondria Defect and Increased Oxidative State in Mice and Human Macrophages. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 22, n.1, p.66–67, Mar 2016. <https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000480289.10566.84>

SCHULTZ, C.P.; The Potential Role of Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Imaging in Cancer Diagnosis Incorporating Complex Mathematical Methods. **Technology in Cancer Research & Treatment.**, v. 1, n. 2, p. 95-104, Abr 2002.
<https://doi.org/10.1177/153303460200100201>

SMITHSON, S.C.; FAKAYODE, B.D.; HENDERSON, S.; NGUYEN, J.; FAKAYODE, S.O. Detection, Purity Analysis, and Quality Assurance of Adulterated Peanut (*Arachis Hypogaea*) Oils. **Foods.**, v.7, n.8, p.122. Jul 2018.
<https://doi.org/10.3390/foods7080122>

TARANTILIS, P. A.; PAPPAS, C.S.; ALISSANDRAKIS, E.; HARIZANIS, P.C.; POLISSIOU, M.G. (2012). Monitoring of royal jelly protein degradation during storage using Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy. **Journal of Apicultural Research**, v.51, n.2, p.185-192, Abr 2015. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.51.2.07>

TEIXEIRA, R.R.; de SOUZA, A. V.; PEIXOTO, L.G.; MACHADO, H. L.; CAIXETA, D.C.; VILELA, D.D.; BAPTISTA, N.B.; FRANCI, C.R.; ESPINDOLA, F.S. Royal jelly decreases corticosterone levels and improves the brain antioxidant system in restraint

and cold stressed rats. **Neurosci Lett.**, v.655, p.179-185, Ago 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.07.010>

TIAN, W.; LI, M.; GUO, H.; PENG, W.; XUE, X.; HU, Y.; LIU, Y.; ZHAO, Y.; FANG, X.; WANG, K.; LI, X.; TONG, Y.; CONLON, M. A.; WU, W.; REN, F.; CHEN, Z. Architecture of the native major royal jelly protein 1 oligomer. **Nat Commun.**, v.9, n. 1, p.3373, Ago 2018. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05619-1>

VALASI, L.; ARVANITAKI, D.; MITROPOULOU, A.; GEORGIADOU, M.; PAPPAS, CS. Study of the Quality Parameters and the Antioxidant Capacity for the ATR-FTIR - Chemometric Differentiation of Pistacia Vera Oils. **Molecules.** 2020 Apr v.25, n.7, p.1614, Abr 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25071614>

YANG, W.; TIAN, Y.; HAN, M.; MIAO, X. Longevity extension of worker honey bees (*Apis mellifera*) by royal jelly: optimal dose and active ingredient. **PeerJ.**, v.5, e3118, Mar 2017. <https://doi.org/10.7717/peerj.3118>

YANG, X.; LI, Y.; WANG, L.; LI, L.; GUO, L.; HUANG, F.; ZHAO, H. Determination of 10-Hydroxy-2- Decenoic Acid of Royal Jelly Using Near-Infrared Spectroscopy Combined with Chemometrics. **J Food Sci.**, v. 84, n.9, p. 2458-2466, Set 2019. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14748>

YONEZAWA, L.A. et al. Efeito da suplementação com vitamina E sobre os metabolismos oxidativo e cardíaco em equinos submetidos à exercício de alta intensidade. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 67, n. 1, p. 71-79, Feb 2015. <https://doi.org/10.1590/1678-7019>