

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

ANA CLARA PRASNIEWSKI

**DESENVOLVIMENTO DE MODELOS DE CALIBRAÇÃO
MULTIVARIADA PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM EXTRATO
ETANÓLICO DE PRÓPOLIS UTILIZANDO A TÉCNICA FT-NIR**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**PATOBranco
2015**

ANA CLARA PRASNIEWSKI

**DESENVOLVIMENTO DE MODELOS DE CALIBRAÇÃO
MULTIVARIADA PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM EXTRATO
ETANÓLICO DE PRÓPOLIS UTILIZANDO A TÉCNICA FT-NIR**

Pré-projeto referente ao Trabalho de Conclusão de Curso como requisito parcial para a conclusão do Curso de Química – habilitação bacharelado da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Pato Branco.

Professor Orientador: Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni.

TERMO DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado **Desenvolvimento de modelos de calibração multivariada para determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante em extrato etanólico de própolis utilizando a técnica FT-NIR** foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora N° **2.2.2015-B** de 2015.

Fizeram parte da banca os professores.

Dr.^a Tatiane Luiza Cadorin Oldoni

Dr. Vanderlei Aparecido de Lima

Me. Cíntia Batista Boeira

DEDICATÓRIA

À minha mãe. Por ser mãe, pai e meu exemplo diário de mulher guerreira, batalhadora, honesta e de amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente, por ter me guiado neste caminho, por ter propiciado todos os acasos dessa vida e por ter colocado sempre ao meu lado pessoas de bem.

À minha mãe, por todo o esforço que fez para eu estar aqui hoje.

À Amanda e Betany, por compreenderem a minha ausência na linda Céu Azul.

À Eduarda por esses quatro anos de amizade e parceria.

À Profa Me. Juliane Bocardi, por me apresentar a química com tanta dedicação.

À Profa Dr.^a Tatiane Luiza Cadorin Oldoni, por ter me confiado este trabalho, pela sua orientação, generosidade e exemplo na pesquisa.

À Me. Cíntia Batista Boeira, pelas gentilezas e parceria nas descobertas do NIR e da quimiometria.

À Profa Dr.^a Taciane Finatto, pela colaboração neste trabalho.

Ao Matheus companheiro de andanças, pela amizade, generosidade e gentileza com que me ensinou/ajudou em vários momentos deste trabalho.

À Roberta, por sua amizade, generosidade e os inúmeros tubos de ensaio emprestados.

Aos meus amigos: Leticia, Karoline, Marizete, Felipe e Andressa pelas vezes que vocês somaram a este trabalho.

Aos professores da UTFPR campus Dois Vizinhos, Dr.^a Fabiana Martins Costa Maia e Dr. Ricardo Yuji Sado por cederem as amostras.

À Central de Análises, LAQUA e estagiários pelo auxílio, espaço e equipamentos cedidos.

À equipe do pontinho verde, por todos os momentos de descontração, amizade e auxílio na realização deste trabalho (Rafaela, Matheus e Cleidi).

À todos os professores que compartilharam seus conhecimentos e colaboraram para que eu fosse capaz de realizar esse trabalho.

Por fim, aos amigos e familiares que não citei, mas que são sempre responsáveis pelas minhas realizações.

EPÍGRAFE

“Somos nós que fazemos a vida. Como der, ou puder, ou quiser (...)”

Gonzaguinha

RESUMO

PRASNIEWSKI, Anaclara. Desenvolvimento de modelos de calibração multivariada para determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante em extrato etanólico de própolis utilizando a técnica FT-NIR. 60 f. TCC (Curso de Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2015.

A própolis é um produto produzido por abelhas que possui uma composição química complexa, entre seus principais constituintes estão os compostos fenólicos, que colaboram para que a própolis apresente propriedades farmacológicas, como atividade antioxidante (AA). Devido a essas propriedades benéficas o extrato de própolis (EEP) é comumente consumido como suplemento alimentar. Desta forma, a fim de se estimar a qualidade do EEP análises de referência são utilizadas e, em sua maioria, são demoradas, necessitam de reagentes específicos e técnico treinado. Com o propósito de desenvolver uma análise alternativa às metodologias de quantificação existentes, este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de modelos de calibração multivariada por regressão por mínimos quadrados parciais (*Partial Least Square-PLS*) para quantificação de compostos fenólicos totais e AA em extrato etanólico de própolis (EEP) produzida por abelhas selecionadas *Apis mellifera* utilizando a técnica de espectroscopia de infravermelho na região do próximo (NIR). Primeiramente, os extratos hidroalcoólicos etanol: água (80:20 v/v) foram analisados utilizando metodologias de referência para a determinação dos teores de compostos fenólicos e flavonoides totais e a AA pelos métodos de sequestro do radical ABTS, redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} (FRAP) e sequestro do radical livre DPPH. Após, os EEP foram analisados em espectrômetro Bruker FT-NIR e os modelos foram desenvolvidos e validados em software OPUS quant2 através da correlação entre as análises de referência e os espectros gerados. Os parâmetros de coeficiente de correlação (R^2) e razão RMSEP/RMSECV foram utilizados para avaliar a capacidade preditiva e robustez dos modelos respectivamente. O modelo gerado para compostos fenólicos totais apresentou os maiores coeficientes de correlação e robustez, indicando uma excelente capacidade preditiva e robustez. Os parâmetros avaliados para flavonoides totais sugerem que o modelo ainda não apresenta uma boa capacidade de predição e robustez. Já os modelos gerados para a determinação de atividade antioxidante sugerem boa capacidade preditiva e uma robustez satisfatória. Desta forma, entende-se que o modelo de flavonoides é capaz de estimar os teores nos extratos e os modelos de fenólicos totais, DPPH, ABTS e FRAP desenvolvidos tornam-se uma alternativa às análises de referência apresentadas, diminuindo a geração de resíduos e o tempo das análises.

Palavras-chave: PLS. *Apis mellifera*. Modelos de regressão.

ABSTRACT

PRASNIEWSKI, Anaclara. Development of multivariate calibration models for determination of phenolic compounds and antioxidant activity of ethanol extract of propolis using FT-NIR technique. 60f. TCC (Course of Chemistry) - Federal University of Technology - Paraná. Pato Branco, 2015.

Propolis is produced by bees and has a complex chemical composition. Among the main constituents of propolis are phenolic compounds that contribute to the present propolis pharmacological properties, such as antioxidant activity (AA). Because of these beneficial properties, propolis extract (EEP) is commonly consumed as food supplement. Thus, in order to estimate the quality of the EEP, reference analyzes are used and, in most cases, they are time consuming, require specific reagents and trained technician. For the purpose of developing an alternative analysis to existing quantification methodologies, this work aims to the development of multivariate calibration models for regression by partial least squares (PLS) for quantification of total phenolic compounds and AA in ethanol extract of propolis (EEP) produced by selected *Apis mellifera* using the infrared spectroscopy technique in near region (NIR). First, the hydroalcoholic ethanol extracts: water (80:20 v / v) were analyzed by reference methods for the determination of the phenolics levels and total flavonoids and AA by sequestration methods ABTS radical, reduction of Fe³⁺ to Fe²⁺ (FRAP) and scavenging of free radical DPPH. After, the EEP were analyzed in Bruker FT-NIR spectrometer and models have been developed and validated in OPUS quant2 software through the correlation between the reference analysis and the generated spectra. The correlation coefficient parameter (R²) and reason RMSEP / RMSECV were used to evaluate the robustness and predictive ability of the models respectively. The model generated for total phenolic compounds showed the highest correlation coefficients and robustness, indicating an excellent predictive ability and robustness. The parameters evaluated for total flavonoid suggest that the model does not have a good ability to predict and robustness yet. However, the generated models for the determination of antioxidant activity suggest good predictive capability and a satisfactory robustness. Therefore, it can be understood that the flavonoids model is able to estimate the levels in the extracts and models of total phenolics, DPPH, ABTS and FRAP developed become an alternative to the presented reference analyzes, reducing the generation of residue and the analysis time.

Keywords: PLS. *Apis mellifera*. Regression models.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EEP – Extrato Etanólico de Própolis

MC- *Mean Centering* (média centrada).

MSC – *Multiplicative Scatter Correction* (Correção de espalhamento multiplicativo).

FT-NIR– *Fourier Transform Near Infrared* (Espectroscopia do Infravermelho próximo com transformada de Fourier)

PLS – *Partial Least Squares* (Regressão por mínimos quadrados parciais)

R^2 - Coeficiente de correlação

RPD – *Ratio of Performance Deviation* (Razão da performance do desvio).

RM – *Root Mean* (média da raiz)

SEV – *Standard Error of Validation* (erro padrão de validação).

SEC - *Standard Error of Calibration* (erro padrão de calibração).

SEP - *Standard Error of Prediction* (erro padrão de predição).

SECV - *Standard Error of Cross Validation* (erro padrão de validação cruzada)

SNV -*Standard Normal Variate* (variação normal padrão).

SG – Savitzky-Golay

SLS – *Straight Line Subtraction* (subtração da linha reta)

RER–*Range Error Ratio* (Taxa do alcance do erro)

VL – Variáveis Latentes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 APICULTURA.....	15
3.1.1 Abelhas <i>Apis mellifera</i>	15
3.1.2 Própolis	16
3.2 ANTIOXIDANTES	17
3.2.1 Compostos fenólicos	18
3.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO	18
3.3.1 Espectroscopia do infravermelho próximo (NIRS).....	19
3.4 QUIMIOMETRIA.....	20
3.4.1 Calibração multivariada	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 AMOSTRAS DE PRÓPOLIS	25
4.1.1 Preparo do Extrato Etanólico de Própolis (EEP)	25
4.2 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	25
4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL LIVRE DPPH.....	26
4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL ABTS ⁺	26
4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO (FRAP)	26
4.6 DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES	27
4.7 ESPECTROSCOPIA DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO	27
4.8 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA.....	28
4.9 VALIDAÇÃO.....	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 ANÁLISES DE REFERÊNCIA.....	29

5.1.1 Determinação de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante.....	29
5.2 ANÁLISES NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-NIR)	34
5.3 DESENVOLVIMENTO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO	35
5.3.1 Compostos fenólicos totais.....	35
5.3.2 Flavonoides	39
5.3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL LIVRE DPPH.....	42
5.3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL ABTS ^{•+}	45
5.3.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO (FRAP)	49
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

A própolis é uma mistura complexa resinosa coletada pelas abelhas de diversas partes das plantas, como brotos, flores e exsudatos resinosos. As abelhas, do gênero *Apis*, são as principais produtoras (FERNANDES-SILVA et al., 2013). Elas modificam esta resina a partir do pólen, da cera e por meio de seu metabolismo; e utilizam este produto como barreira de proteção para entrada de insetos na colmeia (FISCHER et al., 2008).

A composição química da própolis varia de acordo com o período de coleta, a espécie de abelha e a flora, sendo a última o fator mais determinante. Essas variantes fazem com que a própolis possua uma composição muito complexa com diversos compostos diferentes já identificados, dentre os principais componentes destacam-se os flavonoides, ácidos aromáticos, aldeídos, ácidos graxos, cetonas, polissacarídeos, álcoois, aminoácidos entre outros (FISCHER et al., 2008; FARNESI et al., 2009).

Essa variedade na sua composição colabora para que a própolis possua propriedades terapêuticas como atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante, anestésica, antiviral, antioxidante e antitumoral (FERNANDES-SILVA et al., 2013; BANKOVA, 2005).

A presença de compostos fenólicos, como os flavonoides na própolis, atua diretamente como colaborador das propriedades farmacológicas, contribuindo principalmente na atividade antioxidante do produto, que resulta na inibição da oxidação provocada pelos radicais livres. Dessa forma, o extrato etanólico de própolis torna-se uma alternativa de consumo para a população visando seus efeitos benéficos a saúde.

As técnicas instrumentais de análise são uma alternativa para a identificação e quantificação dos compostos ativos na própolis, pois, minimizam os erros das análises realizadas em bancada. Com a evolução dessas técnicas, houve a necessidade da utilização de técnicas sofisticadas para o processamento dos dados. Portanto, algumas análises instrumentais passaram a ter a necessidade de tratamentos matemáticos e estatísticos que traduzissem estes resultados. Por consequência, é criada a área da quimiometria, que se destina a análise de dados químicos de natureza multivariada (FERREIRA et al., 1999).

Dentre as técnicas instrumentais, a espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) identifica o movimento vibracional e rotacional de moléculas orgânicas na região entendida entre 800 nm a 2500 nm (SUN, p.5, 2009; VOGUEL, 2008, p. 386). A grande quantidade de informações geradas pelo espectro, a rapidez da análise, o baixo custo, o não preparo prévio da amostra e o desenvolvimento de ferramentas quimiométricas, fizeram do NIR ótima opção para análises analíticas.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver modelos de calibração multivariada para quantificação de compostos fenólicos e atividade antioxidante em extrato etanólico de própolis produzida por abelhas selecionadas *Apis mellifera* utilizando a técnica de espectroscopia no infravermelho próximo (NIR).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver modelos de calibração multivariada baseado na análise de espectroscopia de infravermelho na região do próximo (NIR) combinado a ferramenta quimiométrica de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) para determinação de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante em extrato etanólico de própolis.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar extratos etanólicos de própolis (EEP), a partir de material produzido por abelhas selecionadas, e quantificar os teores de compostos fenólicos totais pela metodologia de referência de Folin-Ciocalteu;
- Determinar o teor de compostos fenólicos flavonoides nos EEP pelo método de referência;
- Determinar a atividade antioxidante nos EEP pelo método de referência de sequestro do radical livre DPPH; de sequestro do radical ABTS e de redução de ferro (FRAP);
- Avaliar os EEP pela técnica de espectroscopia no infravermelho na região do próximo com transformada de Fourier (FT-NIR) na região de 4.000 a 12.000 cm^{-1} , com leitura em absorbância, resolução de 8 cm^{-1} e 32 acumulações;
- Avaliar os espectros obtidos a partir das amostras de EEP através de teste estatístico multivariado;
- Validar o modelo de calibração multivariado desenvolvido através da validação externa e interna.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 APICULTURA

A exploração das abelhas pelo homem existe desde as épocas mais remotas, os primeiros relatos ocorreram nos povos egípcios, gregos e romanos (CENTEC, 2004, p. 9; LUSTOSA et al., 2008). Como o alimento era consumido da forma que se extraia da natureza, o “mel” era um misto de pólen, mel e cera. Os egípcios foram a primeira civilização a armazenar e separar esse alimento para consumo. Devido à riqueza alimentar do mel e das dificuldades de extraí-lo, muitas civilizações passaram a associar a abelha a um *status* de riqueza e poder, servindo até como moeda de troca (BACAXIXI et al., 2011). Atualmente, esta prática de criação de abelhas é conhecida como apicultura (EMBRAPA, 2007).

A apicultura é uma área da zootecnia voltada para a criação de abelhas vinculadas a comercialização de seus produtos (mel, própolis, geleia real, cera, apitoxina e pólen apícola), essa atividade possui várias vantagens, pois para a criação de abelhas não há necessidade de uma grande área para exploração, a atividade possui baixo custo, não polui, nem destrói o meio ambiente, além de colaborar para a proteção da mata (EMBRAPA, 2007).

As abelhas e as flores coexistem em relação de dependência recíproca (simbiose), pois, as flores geram o alimento à abelha através de pólen e néctar, enquanto que, a abelha carrega pólen em seu corpo que polinizará outras flores (BACAXIXI et al., 2011). Essa relação torna o cultivo de abelhas uma prática sustentável dos recursos naturais e colabora para que haja conservação da flora nativa onde está inserida a apicultura (AMARAL, 2010).

3.1.1 Abelhas *Apis mellifera*

Abelhas de um modo geral são insetos sociais que sofrem metamorfose completa, e o seu desenvolvimento é dividido em quatro fases (ovo, larva, pupa e

idade adulta). A espécie *Apis mellifera* apresenta características de sociabilidade, apresentam ferrão e são as maiores produtoras de mel. Além do mel, elas também produzem própolis, geleia real, pólen, apitoxina e cera (WANG; MA; XU, 2015; EMBRAPA, 2007, p. 8).

No Brasil, as abelhas *Apis mellifera* são as mais comuns e mais utilizadas (EMBRAPA, 2007, p. 8). A sua característica de ocupar uma ampla distribuição geográfica contribui diretamente na diversidade da composição encontrada em seus produtos (ALVES; KUBOTA, 2013).

3.1.2 Própolis

A própolis é uma mistura complexa resinosa natural obtida de várias partes das plantas como exsudatos resinosos, brotos e flores. As abelhas melíferas levam esse material coletado para a colmeia e então, modificam esses produtos com pólen, cera e através da ação de seu metabolismo liberam enzimas e secreções salivares. A própolis é utilizada pelas abelhas para vedar espaços na colmeia e para proteção do enxame de possíveis invasores (ALVES; KUBOTA, 2013; FISCHER et al., 2008; LUSTOSA et al., 2008). A palavra própolis deriva do grego “pró”, em defesa de, e “polis”, cidade ou comunidade, ou seja, em defesa da comunidade (LUSTOSA et al., 2008).

Como a produção da própolis depende diretamente da flora visitada pelas abelhas, do período de coleta e da espécie da abelha, as variações dessa resina são inúmeras, sendo registradas mais de 300 substâncias diferentes na sua composição (FISCHER et al., 2008), entre as principais pode-se citar os flavonoides, ácidos aromáticos, ésteres, aldeídos, cetonas, ácidos graxos, terpenos, esteroides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos e álcoois (FARNESI et al., 2009).

Devido à grande diversidade química, no Brasil existem treze tipos de própolis já classificadas, descobertas em três regiões do país (cinco na Região Sul, uma na Região Sudeste e sete na Região Nordeste). Sendo estas, caracterizadas quanto a sua aparência, coloração de extratos, características físico-químicas e propriedades biológicas (DAUGSCH et al., 2007).

Dentre as principais atividades biológicas que a própolis apresenta destacam-se a antimicrobiana (JUG; KONCIC; KOSALEC, 2014), antiviral (KAI et al., 2014), anti-inflamatória (FUNAKOSHI-TAGO et al., 2015), antioxidante (ALENCAR, et al., 2007; JUG; KONCIC; KOSALEC, 2014; ALVES; KUBOTA, 2013) cicatrizante (ALMEIDA et al., 2013), anestésica (ALMEIDA et al., 2013) e antitumoral (NOVAK et al., 2014). Devido a essas atividades biológicas a própolis é estudada e empregada mundialmente (KAI et al., 2014).

3.2 ANTIOXIDANTES

Antioxidantes são substâncias que, quando presentes em menores concentrações que as do substrato oxidável, são capazes de retardar ou diminuir a oxidação deste de maneira eficaz (BARBOSA, et al., 2010). Os antioxidantes inibem a ação dos radicais livres causadores de estresse oxidativo e conseqüentemente dos danos do tecido. Evitando a formação desses radicais, eliminando-os ou promovendo a sua decomposição (CASTRO, et al., 2014).

O estresse oxidativo, geralmente decorre de um aumento nos níveis de compostos pró oxidantes em relação aos antioxidantes, esse desequilíbrio é gerado pelo excesso de radicais livres. Esse estresse oxidativo colabora para oxidação de biomoléculas que resultará na perda de funções biológicas e desequilíbrio homeostático, que é evidenciado através do dano oxidativo potencial de células e tecidos, atuando diretamente nos processos de envelhecimento, transformação e morte celular, com conseqüências diretas em muitos processos patológicos (BARBOSA, et al., 2010; VASCONCELOS, et al., 2007).

No extrato de própolis, a atividade antioxidante é atribuída principalmente ao seu teor de compostos fenólicos, que é capaz de combater os radicais livres através da indução à ativação de enzimas antioxidantes tais como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e, assim, proteger o organismo contra a peroxidação lipídica e o estresse oxidativo (ATTIA; ELMAZOU DY; EL-SHENAWY, 2012).

Devido as características multifuncionais da própolis, a eficácia da atividade antioxidante é melhor avaliada com base nos resultados obtidos de diversas análises, considerando as diferentes condições oxidantes, composição e mecanismos

antioxidantes (SILVA, et al., 2007). Desta forma, vários métodos são empregados para a quantificação dos teores de atividade antioxidante, entre os existentes, os métodos: sequestro do radical ABTS, redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} (FRAP), sequestro do radical livre DPPH são comumente utilizados (KITRYTĚ; ŠADUIKIS; VENSKUTONIS, 2015; LATOCHA; ŁATA; STASIAK, 2015).

Por possuir uma atividade antioxidante alta; em alguns países como o Brasil, China e Argentina o extrato de própolis é utilizado extensivamente como um suplemento alimentar (CASTRO, et al., 2014).

3.2.1 Compostos fenólicos

Segundo Angelo e Jorge (2007) compostos fenólicos são “estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, nas formas simples ou de polímeros, que os confere o poder antioxidante. Esses podem ser naturais ou sintéticos”. O poder antioxidante é decorrente da reação do fenol com um agente oxidante forte produzindo uma quinona. Essas por sua vez, constituem uma classe de compostos muito interessante e valiosa em razão de suas propriedades redox, sendo cruciais no funcionamento e manutenção das células vivas (PAVIA et al., 2009, p. 428).

Compostos polifenólicos, encontrados na maioria das plantas, assim como em seus subprodutos, podem ter um efeito positivo sobre muitas doenças crônicas (ORŠOLIĆ, et al., 2014). Os flavonoides, um dos principais grupos de compostos fenólicos em própolis, são os compostos chave para a estimativa de qualidade de própolis, e o teor de flavonoides tem sido implicado nas atividades biológicas de própolis (ALMEIDA et al., 2013).

3.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

A espectroscopia do infravermelho é uma técnica de absorção que utiliza a região do infravermelho do espectro eletromagnético, essa região pode ser subdividida em três partes principais a região do próximo ($12500 \text{ cm}^{-1} - 4000 \text{ cm}^{-1}$),

médio ($4000\text{ cm}^{-1} - 200\text{ cm}^{-1}$) e distante ($200\text{ cm}^{-1} - 10\text{ cm}^{-1}$). As moléculas quando absorvem radiação no infravermelho, são excitadas para atingir um estado de maior energia. Somente frequências selecionadas são absorvidas pelas moléculas (PAVIA, et al., 2009, p.738; VOGUEL, 2008, p.386).

A radiação nessa faixa de energia corresponde à faixa que engloba frequências vibracionais de estiramento e dobramento das ligações na maioria das moléculas mais covalentes. No processo de absorção são absorvidas as frequências de radiação no infravermelho que equivalem às frequências vibracionais naturais da molécula em questão, e a energia absorvida serve para aumentar a amplitude dos movimentos vibracionais das ligações na molécula (PAVIA et al., 2010, p.17).

Essas vibrações moleculares podem ser classificadas como deformações angulares e deformações axiais. No qual, deformações angulares se referem a variações ritmadas de ligações que possuem um átomo em comum, ou ainda ao movimento de um grupo de átomos ao restante da molécula sem que as posições relativas dos átomos se alterem. Enquanto que, a vibração de deformação axial é um movimento rítmico ao longo do eixo da ligação que faz a distância interatômica aumentar e diminuir de maneira alternada (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007, p.70).

Portanto, para cada tipo de ligação há uma frequência própria de vibração que está em um ambiente ligeiramente diferente, e essas moléculas de estruturas diversas absorvem em diferentes posições no infravermelho, ou seja, tem espectros característicos (PAVIA, et al., 2009, p.750).

3.3.1 Espectroscopia do infravermelho próximo (NIRS)

Na região espectral do IV-próximo os espectros são consequências de bandas harmônicas ou de combinação das frequências fundamentais. A região estende-se desde o final da região visível de maior comprimento de onda em cerca de 800 nm até 2500 nm ($12500\text{ a }4000\text{ cm}^{-1}$) (VOGUEL, 2008, p. 387). As bandas de absorção nesta região são sobre tons ou combinações de vibrações fundamentais de estiramento que

ocorrem na região de 3000 a 1700 cm^{-1} . As ligações envolvidas geralmente são C-H, N-H e O-H (HOLLER et al., 2009, p. 487).

A espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de Fourier fornece uma escala de número de ondas altamente reprodutível, com melhor resolução e sensibilidade maior do que com equipamentos dispersivos (VOGUEL, 2008, p. 397). Porém para o processamento dos dados nessa técnica,

(...) os espectros não apresentam bandas espectrais limpas, assim, não se pode estabelecer uma correlação direta com a concentração do analito, portanto para esta instrumentação, técnicas de calibração multivariada são necessárias (HOLLER et al., 2009, p. 488).

3.4 QUIMIOMETRIA

A utilização de ferramentas matemáticas, gráficas e estatísticas para a resolução de problemas químicos, deu origem a uma nova área da química denominada quimiometria, que se destina à análise de dados químicos de natureza multivariada (OLIVEIRA, 2006; FERREIRA 1999).

Esta área teve origem na década de 70, mas só se firmou quando os computadores passaram a fazer parte dos laboratórios químicos (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006). As técnicas instrumentais evoluíram e conseqüentemente houve uma complexidade nos dados gerados por esses equipamentos, assim, as ferramentas quimiométricas passaram a traduzir esses dados (OLIVEIRA, 2006).

A quimiometria não se apresenta como uma ferramenta simples, ela envolve diferentes métodos como otimização de experimentos, otimização e validação de metodologias analíticas, planejamento de experiências, ajuste de curva, processamento de sinal, análise de fatores e calibração multivariada (LUZ, 2003).

3.4.1 Calibração multivariada

A Calibração multivariada geralmente combina uma grande quantidade de informação espectral com os valores da amostra de referência correspondentes, isso leva a uma maior precisão e estabilidade de erro (CONZEN, 2006, p. 21). Essa técnica é mais comumente utilizada para espectroscopia de infravermelho próximo e espectroscopia Raman (ZHANG et al., 2010). Na calibração o número de observações é inferior ao número de covariáveis, e essas covariáveis possuem alta correlação entre si (MORELLATO, 2010).

Esse método quimiométrico tem tornado possível modelar propriedades físicas e químicas de dados simples e complexos, a partir de dados espectroscópicos. Na espectroscopia, a análise multivariada permite manipular dados de absorvância espectrais associados a uma ou mais frequências ao mesmo tempo (SOUZA; FERRÃO, 2006).

3.4.1.1 Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)

A Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, do Inglês *Partial Least Squares*), é uma técnica de predição utilizada para relacionar várias variáveis independentes X com uma ou mais variáveis Y (LUZ, 2003).

A informação dos espectros do analito deve ser comparada com os valores de concentração correspondentes. Alterações que ocorrem em ambas as estruturas de dados de ponto devem ser reconhecidas e correlacionadas uns com os outros (CONZEN, 2006 p. 21).

A PLS apresenta como principais vantagens ser hábil para modelar regressões com múltiplas variáveis resposta e produz fatores com alto poder de predição (MORELLATO, 2010). A seleção da região espectral a ser modelada pode melhorar o desempenho dessa técnica de calibração em relação aos modelos que empregam o espectro inteiro (DA SILVA, et al., 2007).

Como demonstram Konzen et al., (2003) para a modelagem por PLS X e Y são representadas pelos escores (T) e pelos pesos (P), onde:

$$X = TP^T + E \quad (1)$$

$$Y = UQ^T + F \quad (2)$$

Assim, uma relação entre as matrizes de dados X e Y pode ser obtida, correlacionando-se escores de cada bloco, gerando uma relação linear descrita da seguinte forma:

$$U = bT + e \quad (3)$$

Sendo:

“T” uma matriz resposta (como um conjunto de espectros), “U” uma matriz contendo variáveis dependentes (propriedades de todas as amostras), “b” é um vetor contendo os parâmetros do modelo, e “e” é um vetor que representa o ruído do espectro e os erros do modelo.

Como cada matriz x e y é decomposta separadamente, pode ocorrer de o modelo não ser tão satisfatório. Portanto, deve-se buscar um modelo onde as matrizes de resíduos “E” e “F” sejam as menores possível e, ao mesmo tempo, conseguir uma relação linear entre “T” e “U”.

Assim, os modelos de calibração correlacionam a técnica alternativa proposta com um valor de referência (método oficial) com base nos valores do coeficiente de correlação R^2 , erros padrões de calibração (tipo MSEC ou RMSEC), e de predição externa (tipo MSEP ou RMSEP) e predição interna cruzada (tipo MSECv ou RMSECv) (MORGANO, 2005; KONZEN et al., 2003).

Desta forma, após o desenvolvimento da calibração podem ser previstas as propriedades de novas amostras a partir dos sinais espectrais (SOUZA; FERRÃO, 2006).

3.4.1.2 Pré-tratamento espectral

Na busca por menores valores possíveis de erros na construção dos modelos de regressão faz-se o uso de pré-tratamentos de dados espectroscópicos (MORGANO, 2005), entre os principais destacam-se:

Centrar na média (CM): consiste em calcular a média das intensidades para cada comprimento de onda e subtrair-se cada intensidade do respectivo valor médio (FERREIRA, et al., 1999).

Correção de espalhamento multiplicativo (MSC): é aplicada uma transformação linear em cada espectro, de modo que os espectros coincidam melhor com o espectro médio de todo o conjunto (SILVA, 2009).

Primeira derivada: é comumente utilizada para remoção de efeitos aditivos que causam deslocamento na linha base independente de Y (POVIA, 2007).

Filtro Savitzky-Golay (SAVITZKY; GOLAY, 1964): a suavização ocorre da seguinte maneira; primeiramente é definido a origem do sinal, após define-se a largura do intervalo e o ponto central do intervalo, à remoção do ponto central do conjunto de pontos do intervalo, então, há o ajuste de um polinômio de grau variável aos pontos restantes, esse polinômio é então utilizado para estimar o valor do ponto removido (CERQUEIRA; POPPI; KUBOTA, 2004).

Segunda Derivada: é aplicada pois, pode remover a flutuação linear da linha de base (POVIA, 2007).

Normalização (SNV): A normalização é aplicada para corrigir a variação indesejada do sinal observado nos espectros (SYVILAY, et al., 2015).

Constant Offset Elimination: Os espectros são deslocados linearmente de modo que os valores de y-mínimos sejam igual a zero (CONZEN, 2006).

Subtração da linha reta (SLS): Ajusta-se uma linha reta no espectro pelo método PLS. Essa linha reta é então subtraída do respectivo espectro (SILVA, 2009).

3.4.1.3 Validação

A escolha do número de variáveis latentes implica diretamente na capacidade preditiva do modelo criado, pois, o número de variáveis latentes deve conter informações suficientes que permita modelar o sistema de forma a não ser um modelo superajustado e também que não deve modelar ruído, permitindo assim a criação de um modelo com boa capacidade de previsão para amostras externas, a escolha do número de variáveis latentes é comumente determinado através da validação cruzada. (MORGANO, 2005).

Para avaliar a capacidade de predição e robustez dos modelos, vários parâmetro são utilizados como: erro padrão de calibração (RMSEC), erro padrão de predição externa (RMSEP), erro padrão de predição interna cruzada (RMSECV), Taxa

de alcance do erro (RER), e coeficiente de correlação (R^2), Razão da performance do desvio (RPD).

Geralmente valores de RMSEC, RMSEP e RMSECV e seus correspondentes coeficientes de correlação são utilizados para avaliar o modelo de calibração do NIR. Além de que a razão entre o RMSEP e RMSECV (RMSEP/RMSECV) é utilizado para indicar a robustez do modelo (quanto mais próximo de 1 mais robusto o modelo será) (PÁSCOA; MAGALHÃES; LOPES, 2013).

Para valores de RPD acima de 2, as equações de calibração são consideradas boas (DAL ZOTTO, et al., 2008).

O parâmetro de RER *range error ratio* (taxa de alcance do erro) pode ser determinado a partir da equação 4.

$$\text{RER} = \frac{(y_{\text{máx}} - y_{\text{mín}})}{\text{RMSEV}} \quad (4)$$

Sendo: $(y_{\text{máx}} - y_{\text{mín}})$ o intervalo de calibração, e RMSEV o erro de validação (RMSECV ou RMSEP). Valores de RER acima de 10 são indicativos de modelos com boa estimativa (PÁSCOA; MAGALHÃES; LOPES, 2013).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS DE PRÓPOLIS

Amostras de própolis produzidas por abelhas *Apis mellifera* no apiário da UTFPR *Campus* Dois Vizinhos Estado do Paraná foram coletada nos meses de março a agosto de 2013, sendo na sequência limpas, trituradas com auxílio de nitrogênio líquido, homogeneizadas e armazenadas em freezer (-6°C) até o momento das análises.

4.1.1 Preparo do Extrato Etanólico de Própolis (EEP)

Os extratos foram preparados pesando-se 2 gramas de própolis (item 4.1), em tubo falcon e adicionados 25 mL da mistura extratora etanol: água (80:20 v/v) (OLDONI et al., 2015) e extraídos sob aquecimento em banho termostatizado a 70°C por 45 minutos. Todas as extrações foram realizadas em triplicata.

4.2 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada seguindo o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, sugerido por Singleton e Rossi (1965). A uma alíquota de 0,5 mL da amostra a ser analisada foram adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (1:10). Após 5 minutos de repouso da mistura, adicionou-se 2,0 mL de uma solução de Na₂CO₃ (4%). As soluções ficaram encubadas ao abrigo da luz e à temperatura ambiente e após 2 horas foi realizada a leitura da absorbância a 740nm. Utilizou-se como padrão de referência o ácido gálico em concentrações que variavam de 5 a 100 µg.mL⁻¹e os resultados foram expressos em mg equivalente ao padrão ácido gálico (EAG)/g de amostra.

4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL LIVRE DPPH

A quantificação de atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre DPPH foi realizada segundo Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Onde, adicionam-se a 0,5 mL do EEP (1:50) 3 mL de etanol P.A e 0,3 mL da solução do radical DPPH 0,5 mmol L⁻¹ em etanol P.A. A mistura permaneceu por um período de 45 minutos ao abrigo da luz e temperatura ambiente e posteriormente foi realizada a leitura em 517 nm no espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em µmol de Trolox por grama de própolis (µmol de Trolox/g própolis). A curva padrão foi construída a partir do antioxidante sintético Trolox nas concentrações de 15, 25, 50, 75 e 100 µmol L⁻¹.

4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL ABTS^{•+}

O método de sequestro do radical ABTS^{•+} é descrito por Re et al., (1999). Este consistiu no preparo do radical ABTS^{•+} a partir da reação de 5 mL de solução ABTS (7,0mM) com 88 µL de Persulfato de potássio (14µM), sendo a solução armazenada por 16 h ao abrigo de luz sob temperatura ambiente. Após a incubação, a solução foi diluída em etanol P.A até obter uma absorbância de 0,700 ± 0,200 à 734 nm. O método fundamentou-se na adição de 30 µL do EEP (1:5) com 3 mL da solução do radical formado, utilizando o branco com etanol P.A. Para a construção da curva padrão foi utilizado o antiradicalar Trolox nas concentrações de 100, 500, 1000, 1500 e 2000 µmol L⁻¹. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em µmol de Trolox por grama de própolis (µmol de Trolox/g própolis).

4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO (FRAP)

Descrito por Benzie e Strain (1996). O reagente FRAP constitui-se de uma mistura de 25 mL de uma solução de tampão acetato 300 mM e pH 3,6; 2,5 mL da solução de TPTZ 10 mM 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20mM. Uma alíquota de 100 μ L do EEP (1:50) foi pipetada juntamente com 3 mL do reagente FRAP, a mistura permaneceu sob a ausência de luz a temperatura de 37°C em banho de água com controle de temperatura por 30 minutos. A curva de calibração foi realizada com sulfato ferroso como padrão nas concentrações de 200, 500, 1000, 1500 e 2000 μ mol L⁻¹. Os resultados obtidos foram expressos em μ mol de Fe²⁺por grama de própolis (μ mol de Fe²⁺/g própolis).

4.6 DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES

Para a quantificação do teor de flavonoides totais presente no extrato etanólico de própolis (EEP) foi utilizado o método colorimétrico descrito por Park et al (1995). O mesmo consistiu no preparo de duas séries de tubos contendo 0,5 mL do EEP (1:5) e identificados com e sem adição de nitrato de alumínio. Nos tubos que receberam nitrato foram adicionados 4,3 mL de etanol 80% e nos que não receberam nitrato foram adicionados 4,4 mL de etanol 80%. Em todos os tubos foram adicionados 0,1 mL de acetato de potássio CH₃COOK 1 M. Na série de tubos identificada para receber nitrato foram adicionados 0,1 mL de nitrato de alumínio Al(NO₃)₃ 10%. O branco foi preparado com 4,9 mL de etanol 80% e 0,1 mL de CH₃COOK. Os tubos foram agitados e deixados em incubação no escuro durante um período de 40 minutos à temperatura ambiente.

Posteriormente, foram realizadas as leituras da absorbância em espectrofotômetro a 415 nm. Para a quantificação do conteúdo de flavonoides totais, foi construída uma curva analítica utilizando quercetina como padrão, o resultado foi expresso em mg de equivalente de quercetina por grama de amostra (mgEQ/g).

4.7 ESPECTROSCOPIA DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO

Os 82 extratos foram analisados em espectrômetro de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR) equipamento BRUKER MPA em acessório vial, com leitura em absorvância com resolução de 8 cm^{-1} e 32 acumulações na região de comprimento de onda de 4.000 a 12.000 cm^{-1} .

4.8 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

O modelo de calibração multivariada foi desenvolvido através do método estatístico de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) em *software* OPUS 7.2quant2.

4.9 VALIDAÇÃO

A validação do modelo foi realizada por dois métodos distintos validação externa por grupo de teste (*test set*) e validação interna cruzada (*cross validation*). Para a validação externa foram separadas em torno de 30% da quantidade de amostras utilizadas na calibração. Na validação interna é deixado de fora da validação uma amostra para cada 50 amostras de calibração, até que todas as amostras do modelo sejam retiradas uma vez para validação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES DE REFERÊNCIA

5.1.1 Determinação de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante

Neste trabalho, apenas alguns extratos foram quantificados para elucidar as técnicas de bancada, a maioria dos resultados utilizados para a construção do modelo provêm de análises realizadas pelo grupo de pesquisa em própolis coordenado pela professora Dr.^a Tatiane L. C. Oldoni. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 1.

Tabela 1 –Análises de referência

Amostras	ABTS μmolTrolox/g	DPPH μmolTrolox/g	FRAP μmol Fe ²⁺ /g	Flavonoides mgEQ/g	Fenólicos mgEAG/g
1	227,97	60,23	361,36	919,91	18,38
2	248,30	60,39	342,23	836,97	19,05
3	244,65	59,21	363,08	801,15	21,59
4	57,63	37,02	86,09	60,22	9,54
5	56,69	26,74	94,85	288,07	9,69
6	74,37	28,89	130,22	390,42	10,13
7	354,41	103,08	538,59	3185,40	28,44
8	310,41	115,00	593,40	3158,70	30,44
9	316,89	99,33	551,42	2616,77	29,14
10	86,14	50,37	324,81	890,70	17,53
11	92,00	40,52	228,40	960,57	16,17
12	89,30	41,77	277,34	1160,30	17,09
13	240,61	129,93	616,82	4639,01	35,72
14	298,46	175,77	837,17	5653,41	37,52
15	352,53	173,66	709,06	6369,68	36,58
16	82,47	43,62	193,29	1196,41	17,35
17	90,90	49,05	248,82	1383,54	18,48
18	85,69	34,74	225,37	1161,22	14,29
19	95,82	50,22	281,56	908,50	18,73
20	94,75	52,95	287,71	1009,17	18,91
21	98,33	45,78	316,43	1184,21	19,57
22	88,30	81,06	299,29	473,78	23,83

Amostras	ABTS μmolTrolox/g	DPPH μmolTrolox/g	FRAP μmol Fe ²⁺ /g	Flavonoides mgEQ/g	Fenólicos mgEAG/g
23	91,02	59,92	308,36	640,21	25,03
24	92,46	57,07	297,09	519,38	22,96
25	86,59	41,14	213,44	1087,92	17,98
26	95,68	40,65	229,29	866,15	19,77
27	86,95	41,39	227,29	977,03	18,51
28	41,72	18,34	84,33	147,13	8,23
29	49,10	16,41	75,83	132,10	7,63
30	38,05	13,67	66,74	134,48	6,88
31	98,33	31,80	228,32	604,49	13,94
32	92,14	29,68	215,20	519,60	12,92
33	86,22	25,11	203,74	361,05	11,64
34	83,85	25,85	123,04	692,23	9,49
35	75,31	25,36	148,49	637,31	10,02
36	77,78	23,04	111,84	597,39	10,49
37	63,24	26,67	147,83	361,02	9,91
38	55,29	26,46	161,23	335,52	11,04
39	55,72	18,54	125,90	169,65	8,19
40	54,22	18,54	128,16	217,85	8,98
41	46,61	24,83	113,04	291,96	10,07
42	77,99	32,88	155,57	485,38	6,48
43	52,36	18,74	90,26	619,72	8,33
44	49,60	17,71	80,96	662,72	7,49
45	54,39	19,08	86,00	539,22	7,80
46	59,69	19,41	91,88	528,31	8,19
47	59,12	20,18	100,07	493,53	8,25
48	59,35	18,40	106,59	627,83	7,83
49	68,78	19,87	89,88	603,80	7,88
50	56,60	19,06	88,52	535,75	7,62
51	61,82	20,63	98,08	524,26	8,68
52	101,36	34,93	209,12	694,57	14,29
53	97,98	33,71	202,24	795,14	13,36
54	97,08	48,24	217,60	767,94	13,59
55	164,39	110,55	560,18	4012,39	25,17
56	142,76	104,80	538,61	3303,81	23,74
57	101,21	69,26	408,85	972,83	27,41
58	95,01	68,96	384,42	797,26	25,18
59	106,10	73,68	398,90	1539,10	27,52
60	92,82	46,85	228,68	555,54	15,40
61	71,15	48,16	241,15	682,77	15,92
62	76,49	38,18	218,37	453,47	15,67
63	61,33	21,78	162,09	506,22	8,35
64	59,71	19,39	143,46	929,50	9,01
65	61,82	19,64	155,99	787,07	8,58

Amostras	ABTS $\mu\text{molTrolox/g}$	DPPH $\mu\text{molTrolox/g}$	FRAP $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$	Flavonoides mgEQ/g	Fenólicos mgEAG/g
66	108,27	59,06	309,74	2521,31	19,15
67	113,98	51,18	283,04	2175,48	17,57
68	85,57	31,77	232,77	917,86	13,54
69	91,16	32,38	231,42	806,53	14,76
70	90,43	38,85	268,87	704,67	15,05
71	94,20	39,42	258,75	821,17	15,41
72	99,48	39,93	266,6	835,34	19,75
73	94,10	40,70	252,57	703,04	15,48
74	26,54	11,68	90,73	159,22	5,43
75	24,00	11,89	88,68	183,27	6,70
76	22,49	13,68	81,81	167,86	5,29
77	53,75	30,03	276,71	712,20	13,45
78	50,77	30,04	265,11	648,34	13,34
79	51,71	29,82	271,17	577,91	13,88
80	56,91	35,05	220,91	746,94	12,57
81	52,41	33,98	254,61	639,78	10,89
82	58,58	32,06	187,68	748,70	11,22

Para exemplificar os valores e variações dos resultados obtidos em cada análise foram realizados histogramas em *software* EViews 9 Student (Figuras 1 a 5). Desta forma pode-se visualizar de maneira gráfica a repetitividade de concentrações das amostras.

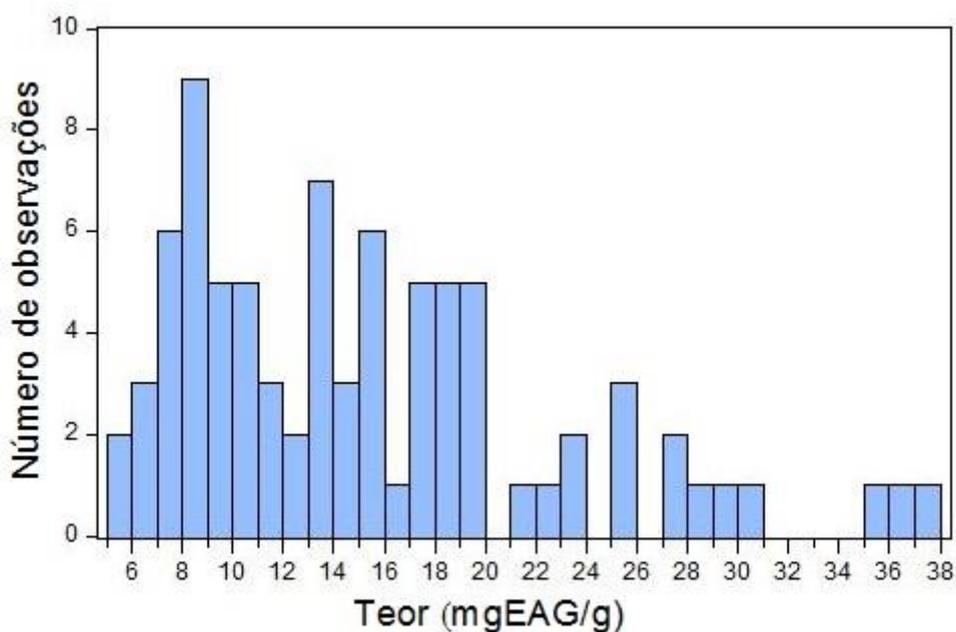


Figura 1 -Histograma dos valores reais fenólicos totais.

As análises de fenólicos tiveram valores de quantificação que variaram de 5,29 a 37,51 (mgEAG/g), com uma média de 15,33 (mgEAG/g) (Figura 1).

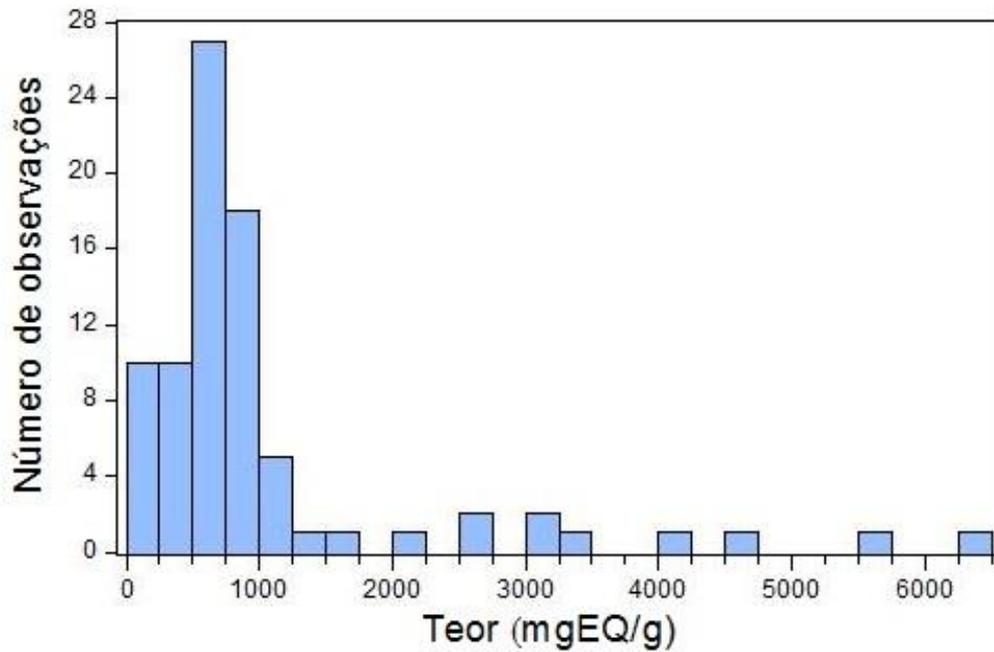


Figura 2 - Histograma dos valores reais Flavonoides.

As análises de flavonoides tiveram valores que variaram de 60,22 a 6369,68 (mgEQ/g), como um valor médio de 1024,196 (mgEQ/g) (Figura 2).

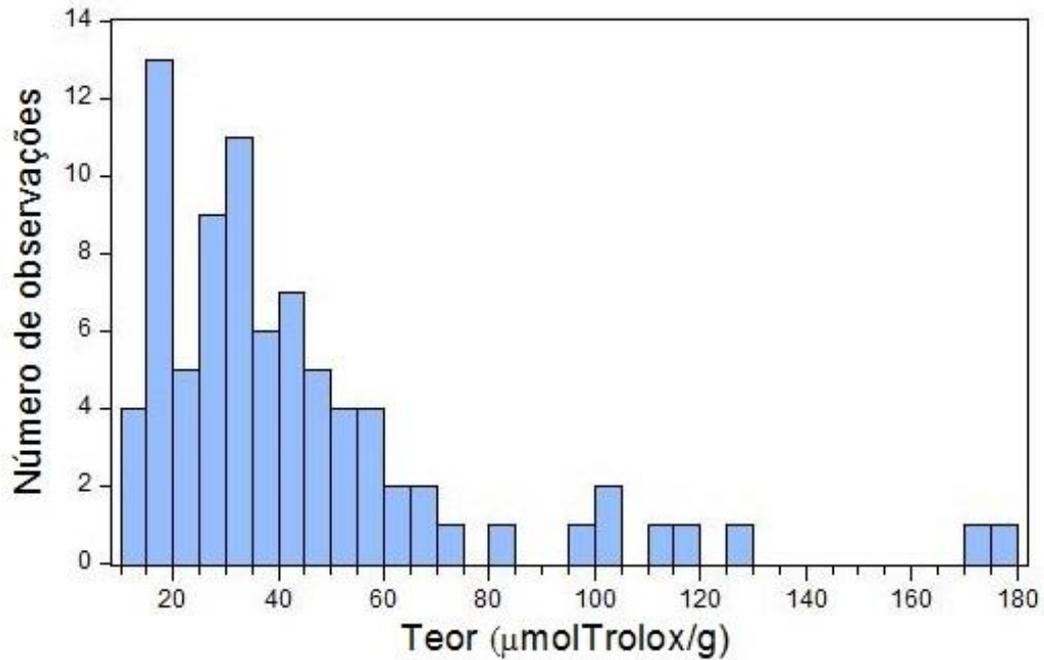


Figura 3 - Histograma dos valores reais DPPH.

A figura 3, apresenta as variações das quantificações de DPPH, com valores que variaram de 11,68 a 175,77 ($\mu\text{molTrolox/g}$) com valor médio de 44,26 ($\mu\text{molTrolox/g}$).

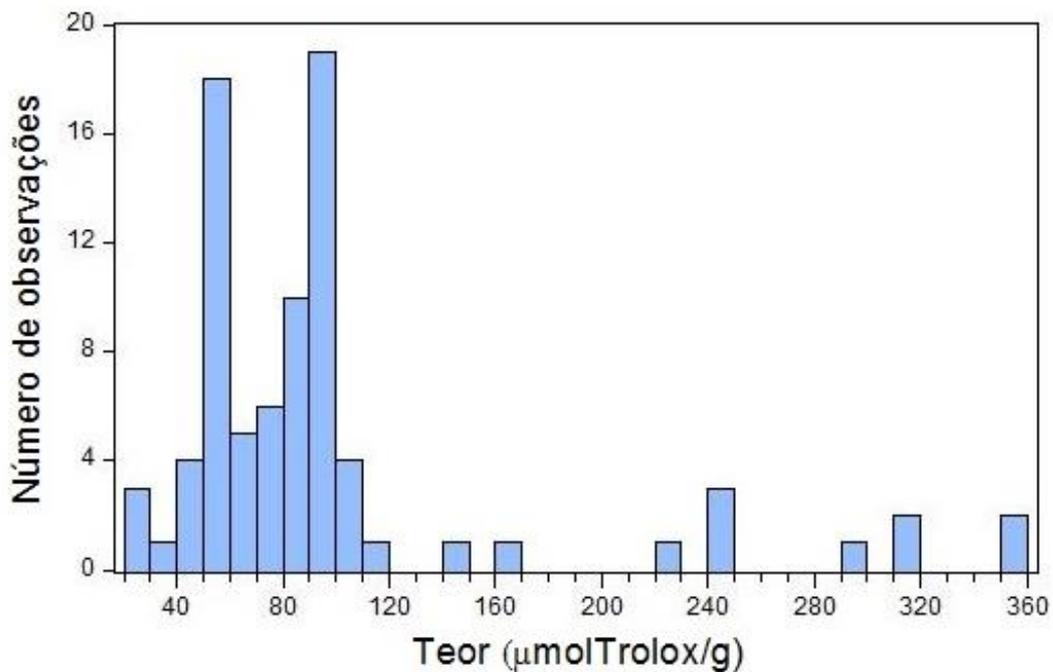


Figura 4 - Histograma dos valores reais ABTS

Para as análises de ABTS as quantificações variaram de 22,49 a 354,40 ($\mu\text{molTrolox/g}$) com valor de médio de 99,51 ($\mu\text{molTrolox/g}$) (Figura 4).

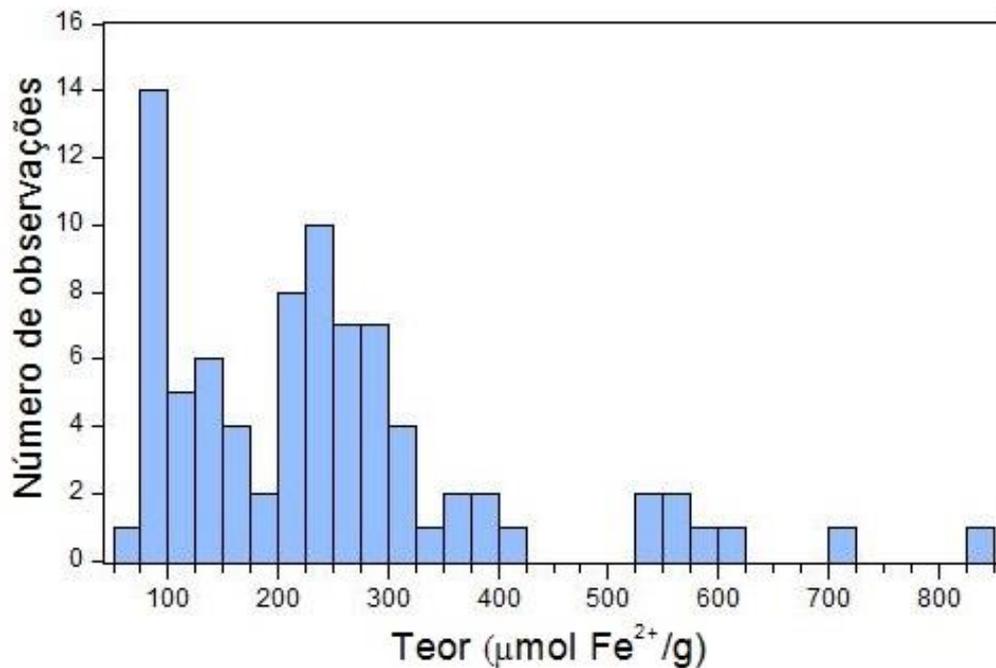


Figura 5 - Histograma dos valores reais FRAP.

A figura 5 mostra que os valores da análise de referência para FRAP variaram de 66,74 a 837,17 ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$), com valor médio de 244,08 ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$) para as amostras.

5.2 ANÁLISES NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-NIR)

Foram obtidos os espectros na região do infravermelho próximo dos 82 extratos etanólicos de própolis (Figura 6), no entanto, como os espectros apresentam basicamente sinais referentes à sobretons e sobreposições de ligações, há a necessidade de análises multivariadas para que seja possível a geração dos modelos de calibração.

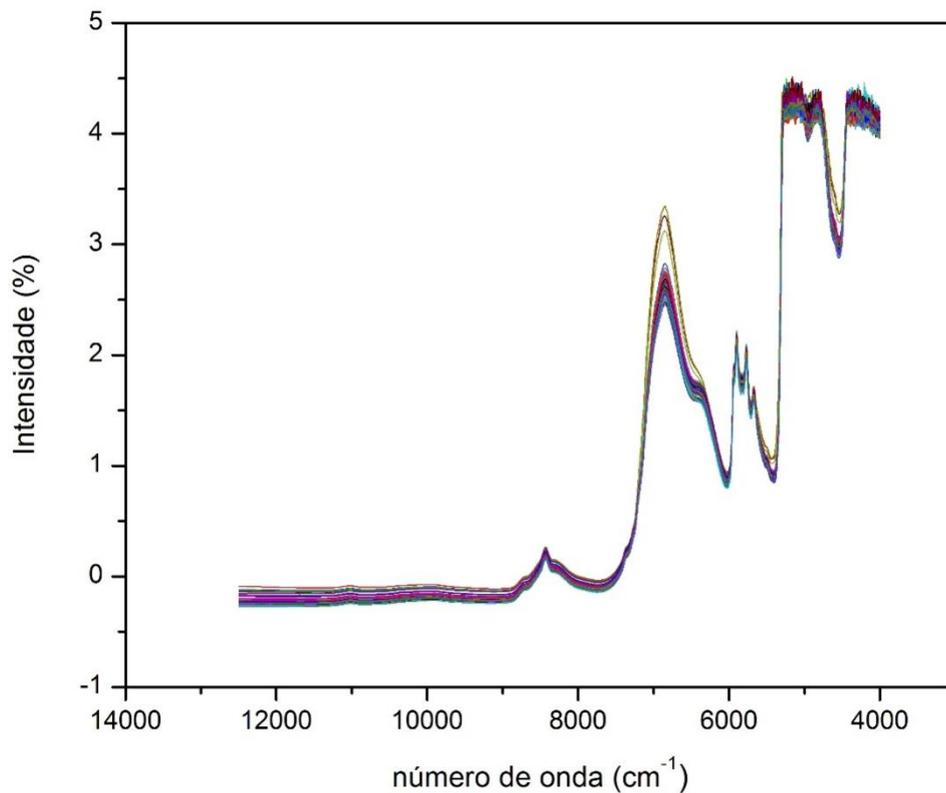


Figura 6 - Espectros de NIR para as 82 amostras de EEP analisadas sem pré-tratamento.

5.3 DESENVOLVIMENTO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO

Para construção dos modelos de calibração, o método PLS foi desenvolvido em *software* opus 7.2 quant2, onde as informações espectrais foram organizadas em uma matriz de dados e correlacionadas a um vetor que armazena dados da concentração de cada espectro. Para a minimização de erros e consequente melhoria da capacidade preditiva do modelo, foram empregados pré-tratamentos, escolha do número de variáveis latentes, remoção de *outliers* e utilização de regiões espectrais específicas para cada modelo sugeridas pelo *software*, baseado em valores de RMSECV.

5.3.1 Compostos fenólicos totais

5.3.1.1 Pré-tratamento, região espectral e remoção de *outliers*

O número de variáveis latentes (VL) para a construção deste modelo foi determinado a partir da validação cruzada (NIKOLICH; SERGIDES; PITTAS, 2001). Essa metodologia de determinação das VL por validação cruzada é comumente utilizada, pois os métodos de projeção produzem modelos tendenciosos e é necessário evitar o sobreajuste (*overfitting*) (MARTINS; FERREIRA, 2013).

Desta forma, a melhor relação de baixo RMSECV foi utilizada, sendo para este modelo de 8 VL (Figura 7).

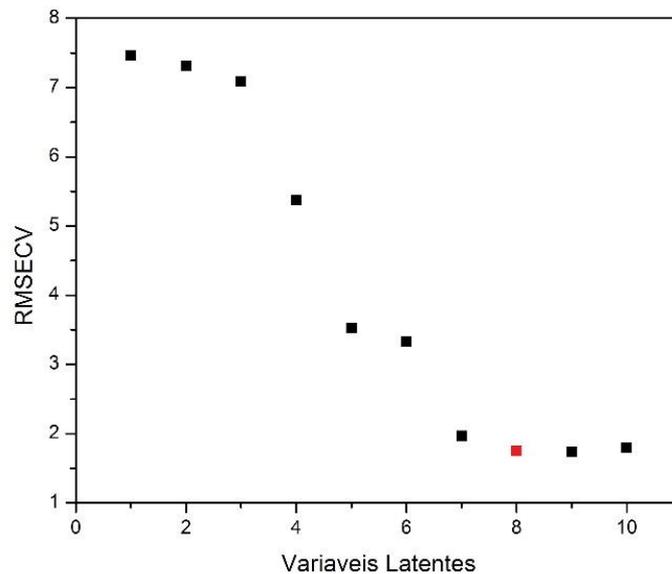


Figura 7 - Determinação do número de variáveis latentes do PLS para o modelo de Compostos Fenólicos Totais.

O pré-tratamento utilizado para minimização de erros foi o *constant offset elimination*. A remoção de amostras anômalas foi realizada e por meio da análise de variância, sendo as amostras 55, 56, 66 e 72 identificadas como *outliers* e excluídas do modelo de calibração. O conjunto de validação externa não apresentou *outliers*. Para a construção do modelo de compostos fenólicos totais as regiões do espectro utilizadas para a calibração foram (9400 - 7498,4 cm^{-1}) e (6102,1 - 5774,3 cm^{-1}) (Figura 8).

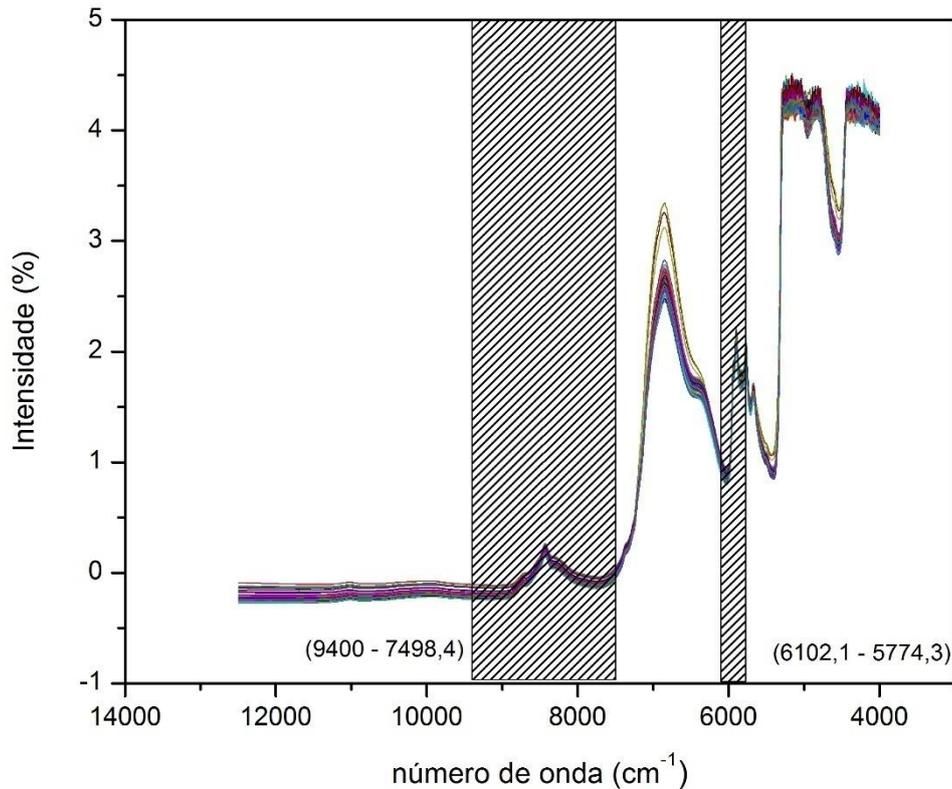


Figura 8- Região espectral (hachurada) utilizada na construção do modelo

Oliveira e colaboradores (2004) reportam que a escolha de regiões espectrais pode melhorar significativamente a eficiência das técnicas de calibração (OLIVEIRA, et al., 2004).

5.3.1.2 Modelos de calibração e validação

Após a remoção de amostras anômalas, a calibração contou com cinquenta e oito amostras. As amostras utilizadas como conjunto de teste foram: 4, 9, 12, 13, 16, 23, 27, 31, 34, 40, 43, 46, 50, 52, 54, 59, 63, 70, 73 e 77.

Os resultados de calibração podem ser visualizados na figura 9B, que exibe os valores experimentais *versus* os valores preditos. Os parâmetros de erro e predição do modelo de calibração são apresentados na tabela 2.

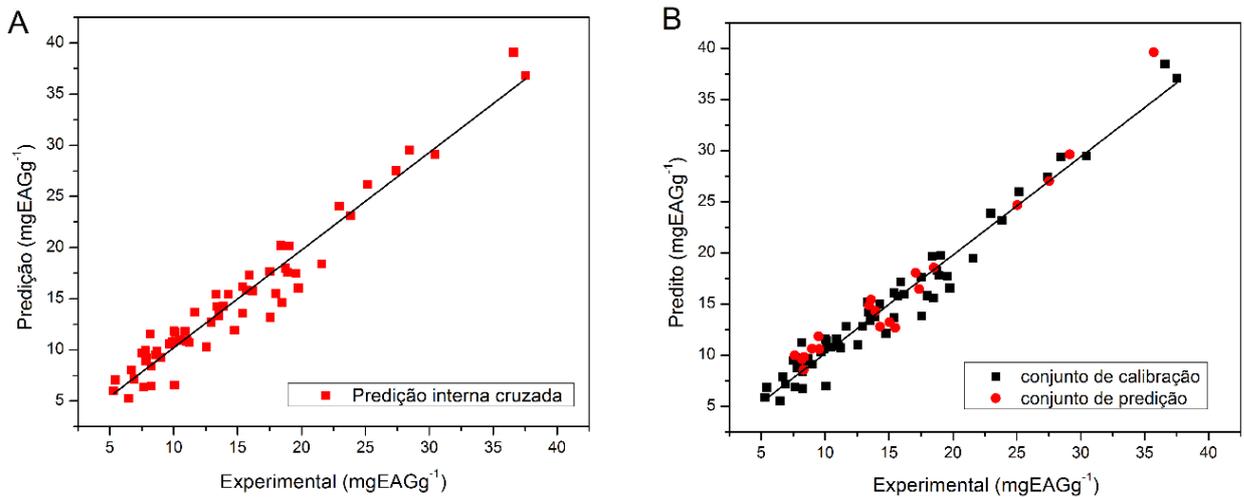


Figura 9 - Diagrama de correlação entre a predição e o valor verdadeiro de fenólicos das amostras por validação interna cruzada (A) e validação externa (B).

Na figura 9A e 9B são apresentados em vermelho os resultados de validação interna cruzada e validação externa do modelo respectivamente.

Tabela 2 – Resultados de calibração e validação para o modelo de compostos fenólicos totais

Compostos Fenólicos Totais	Calibração	Validação	
		Cross Validation	Test set
R²	0,96	0,94	0,95
RMSEC	1,44	-	-
RMSECV	-	1,75	-
RMSEP	-	-	1,67
RPD	5,07	4,19	4,94
RER	-	18,41	19,30
RMSEP/RMSECV	-	0,95	

Ao analisar os valores de RMSEC, RMSEP, RMSECV e seus respectivos coeficientes de correlação, nota-se que os resultados apresentam uma correlação satisfatória entre os valores experimentais e os preditos pelo modelo. Os valores de R² para a validação foram maiores que 0,94. Os modelos que apresentam R² > 0,90 são considerados excelentes (DAL ZOTTO, et al., 2008). Os valores de RPD ficaram próximos a 5, indicando que as equações de calibração são boas e os valores de RER de 18,41 e 19,30 indicam uma boa capacidade preditiva para o modelo. Ainda, a razão RMSEP/RMSECV apresentou valor de 0,95 demonstrando um excelente parâmetro

de robustez, visto que, o modelo com a máxima robustez possui razão igual a 1 (PÁSCOA; MAGALHÃES; LOPES, 2013).

Pascoa et al. (2013) utilizaram a mesma metodologia para quantificação de compostos fenólicos em café e o modelo desenvolvido em sua pesquisa apresentou valores de coeficiente de correlação e erro padrão de predição e calibração ($R^2_{\text{pred}}=0,94$; RMSEC= 1,37; RMSECV=1,65; RMSEP= 1,48; RER= 16,1) muito próximos aos obtidos neste modelo, podendo ser um indício de que esses valores de erro sejam característicos da técnica de referência utilizada (PÁSCOA; MAGALHÃES; LOPES, 2013).

Deste modo, todos os parâmetros avaliados indicam que o modelo de fenólicos é capaz de prever as quantificações analíticas para os EEP com excelente capacidade e robustez.

5.3.2 Flavonoides

5.3.2.1 Pré-tratamento, região espectral e remoção de *outliers*

Neste modelo o número de variáveis latentes que possibilitou o menor erro de validação cruzada foi o de 8VL para o PLS (Figura 10).

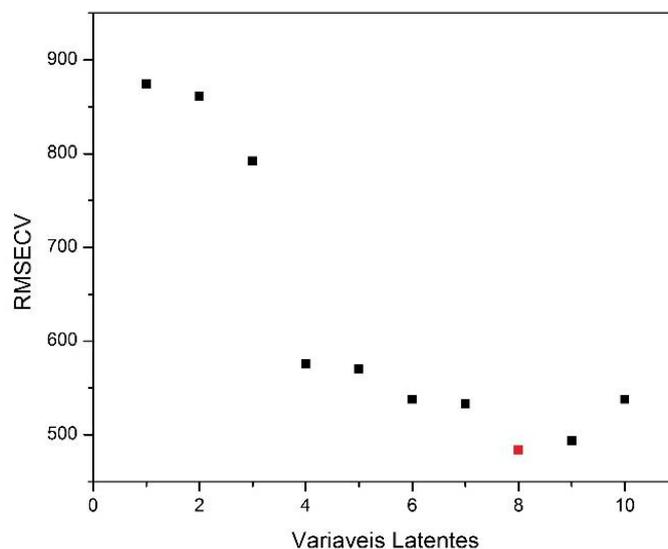


Figura 10 - Determinação do número de variáveis latentes do PLS para o modelo de Flavonoides.

Os pré-processamento empregados foram de SNV em região espectral de 7216,9 – 5326,8 cm^{-1} (Figura 11A) e primeira derivada com suavização de 17 pontos em região espectral de 9400 – 8447,3 cm^{-1} e 6102 – 5446,4 cm^{-1} (Figura 11B), ainda na figura 11B é demonstrado o pré-processamento de primeira derivada com suavização Savitzky-Golay (SG) utilizado nos espectros.

As amostras sugeridas pelo *software* como anômalas (14, 15, 23, 66, 67) foram retiradas do modelo.

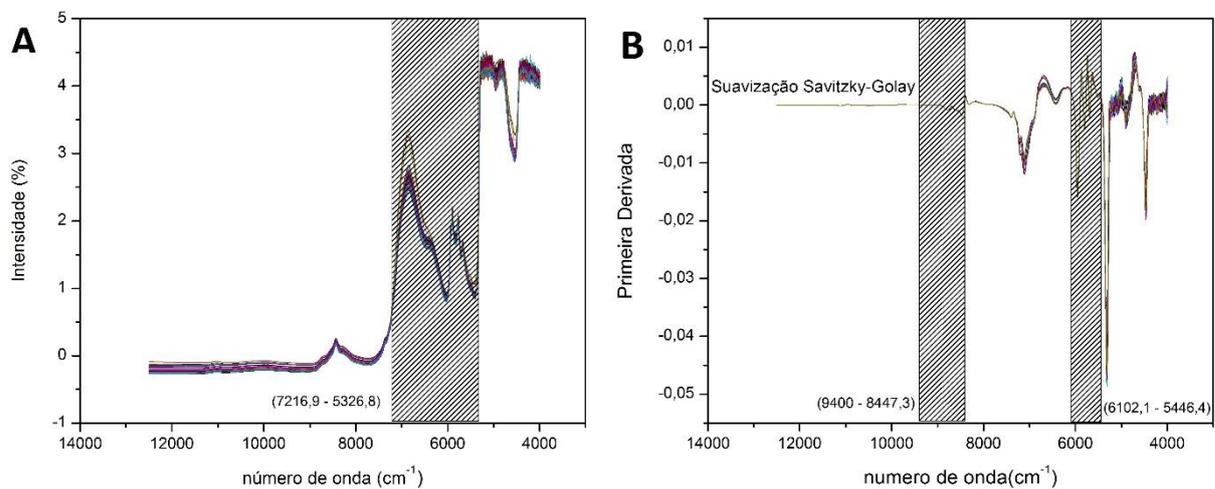


Figura 11– Regiões utilizadas (hachurada) na construção do modelo de calibração (A) e espectros com a suavização SG (B)

5.3.2.2 Modelos de calibração e validação

Para construção do modelo a calibração utilizou cinquenta e nove amostras, para conjunto de teste de validação as amostras utilizadas foram: 1, 3, 6, 10, 19, 21, 25, 28, 31, 36, 37, 40, 46, 49, 53, 56, 71 e 74.

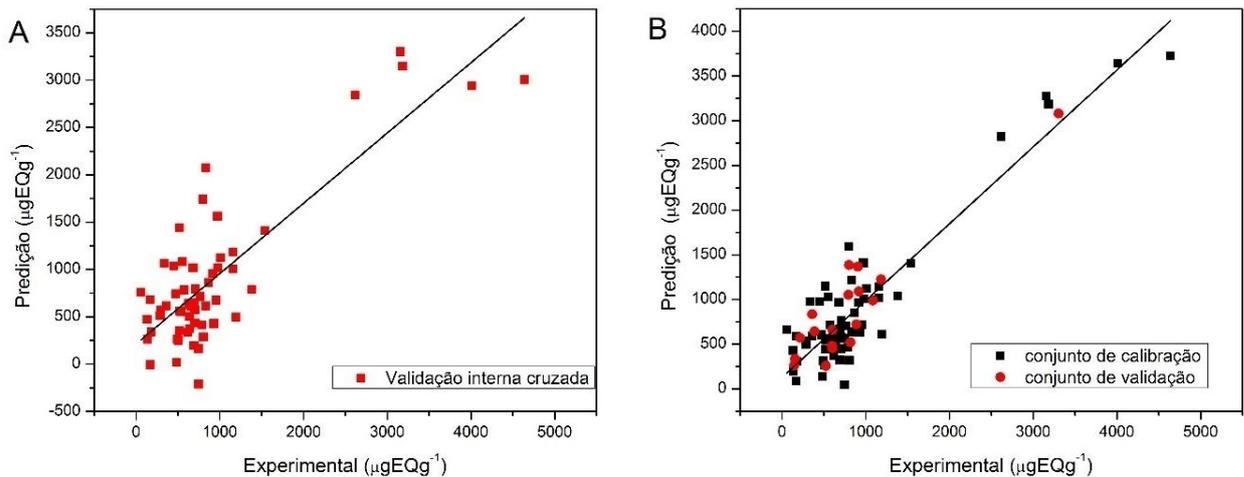


Figura 12- Diagrama de correlação entre a predição e o valor verdadeiro de flavonoides das amostras por validação cruzada interna (A) e validação externa (B).

Na figura 12, são apresentados em vermelho as amostras utilizadas para validação interna cruzada (Figura 12A) e validação cruzada externa (Figura 12B). A tabela 3, indica os principais parâmetros para estimar a qualidade dos modelos gerados.

Tabela 3 - Resultados de calibração e validação para o modelo de Flavonoides.

Flavonoides	Calibração	Validação	
		Cross Validation	Test set
R ²	0,86	0,69	0,83
RMSEC	327,23	-	-
RMSECV	-	484	-
RMSEP	-	-	279
RPD	2,68	1,81	2,6
RER	-	9,46	16,41
RMSEP/RMSECV	-	0,57	

A estimativa dos coeficientes de correlação para o valor experimental com o valor predito tiveram valores de 0,83 para o conjunto de validação (*test set*) e 0,69 para a validação cruzada (*cross validation*). Dal Zotto e colaboradores (2008) sugerem que R²_{cv} entre 0,66 e 0,81 indica previsões quantitativas aproximadas dos reais. (DAL ZOTTO, et al., 2008).

A razão RMSEP/RMSECV apresentou valor inferior a 0,60 indicando que o modelo não é robusto. A capacidade preditiva avaliada pelo valor de RER apresentou

valores de 9,46 e 16,41, estando dentro do sugerido pela literatura, para modelos com boa estimativa (PÁSCOA; MAGALHÃES; LOPES, 2013), porém como foi o único parâmetro com um bom indicativo, sugere-se que esse valor seja atribuído ao grande intervalo de referência dos valores experimentais de flavonoides.

Os parâmetros apresentados sugerem que o modelo ainda não apresenta uma boa capacidade de predição e robustez.

Como sugere Luz (2003) modelos de calibração com baixo R^2 são atribuídos principalmente, a pouca variação nos valores reais utilizados na construção do modelo, este mesmo problema pode ser verificado para os modelos de flavonoides (Figura 2) as amostras de referência apresentaram pouca variabilidade, desta forma propõem-se que, para a obtenção de melhores resultados, o modelo deve conter um intervalo de referência com uma distribuição mais homogênea de valores de quantificação (LUZ, 2003).

5.3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL LIVRE DPPH

5.3.3.1 Pré-tratamento, região espectral e remoção de *outliers*

Para o modelo de calibração de DPPH foram utilizadas 8 VL a escolha foi realizada a partir dos valores de RMSECV para cada número de variáveis como demonstra a figura 13.

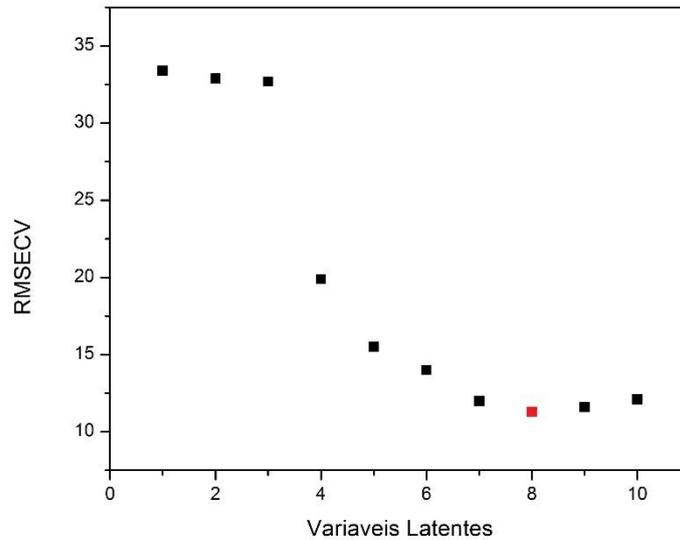


Figura 13 - Determinação do número de variáveis latentes do PLS para o modelo de DPPH.

O pré-tratamento espectral que possibilitou o desenvolvimento do melhor modelo para DPPH foi com SNV e primeira derivada com suavização Savitzky-Golay (SG) de 17 pontos, para a construção do modelo a região utilizada foi de 9400 – 8447,3 cm^{-1} evidenciada na figura 14B.

A figura 14A, apresenta o pré-tratamento de primeira derivada realizado nos espectros sem a suavização (SG), já a figura 14B apresenta os espectros após o pré-tratamento, tornando visível a minimização dos ruídos após a aplicação do SG.

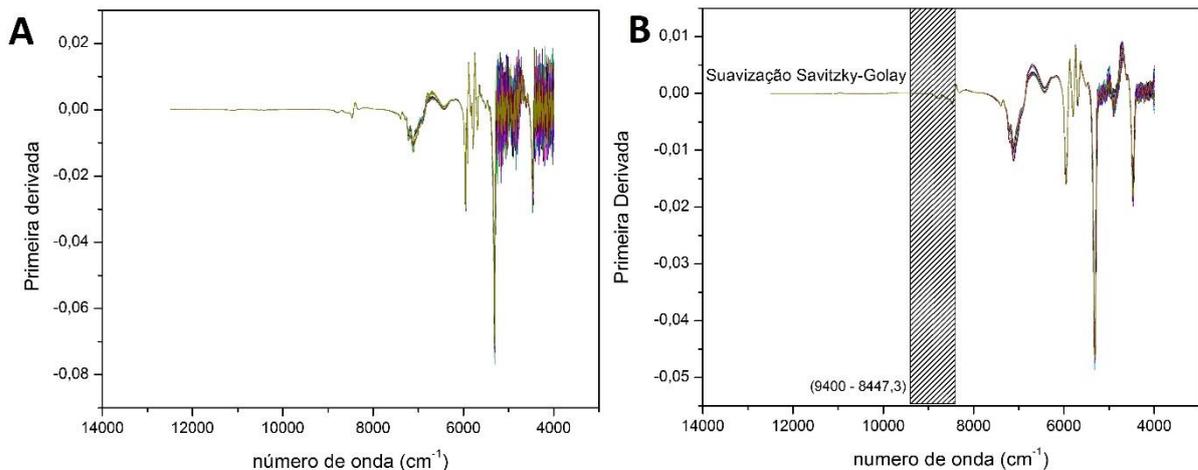


Figura 14 - Espectro das amostras com pré tratamento de primeira derivada (A) e após suavização SG (17 pontos) e região espectral (hachurada) utilizada na construção do modelo (B).

5.3.3.2 Modelos de calibração e validação

Como não houve a presença de amostras anômalas no modelo, foram utilizadas sessenta e duas amostras para calibração e vinte para o conjunto de teste, sendo estas: 3, 6, 7, 10, 13, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 46, 53, 59, 61, 65, 74 e 78.

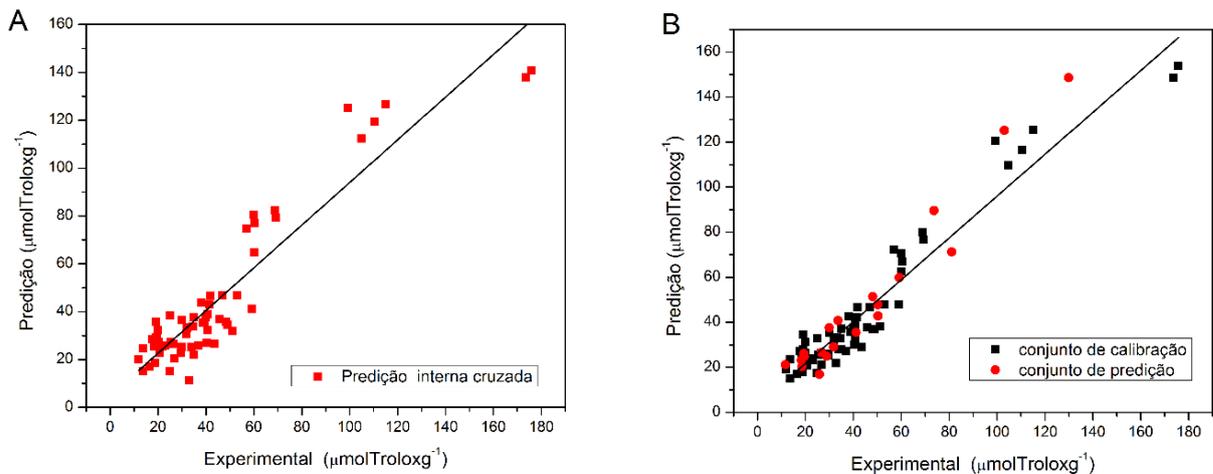


Figura 15 - Diagrama de correlação entre a predição e o valor verdadeiro de atividade antioxidante pelo método DPPH das amostras por validação cruzada interna (A) e validação externa (B).

A figura 15, apresentam a curva de calibração (B) obtida para o modelo de DPPH e suas respectivas curvas de validação (A e B), essas curvas relacionam o valor experimental *versus* o predito pelo modelo, as amostras utilizadas para validação cruzada (Figura 15A) e validação externa (figura 15B) são evidenciadas em vermelho.

Tabela 4 - Resultados de calibração e validação para o modelo de DPPH.

DPPH	Calibração	Validação	
		<i>Cross Validation</i>	<i>Test set</i>
R ²	0,94	0,88	0,91
RMSEC	8,76	-	-
RMSECV	-	11,3	-
RMSEP	-	-	8,88
RPD	4,35	2,92	3,83
RER	-	13,65	17,81
RMSEP/RMSECV	-		0,77

Analisando os valores de coeficiente de correlação obtidos nota-se que a validação cruzada apresentou valor de $R^2 = 0,88$ e a validação interna $R^2 = 0,91$. Os valores de RPD foram maiores que 2 demonstrando boa capacidade preditiva, o RER apresentou valores acima de 10 indicando excelente predição e o modelo apresentou razão RMSEP/RMSECV de 0,77 para o indicativo de robustez. Deste modo, os parâmetros sugerem que o modelo desenvolvido tem boa capacidade preditiva e uma robustez satisfatória.

5.3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL ABTS⁺

5.3.4.1 Pré-tratamento, região espectral e remoção de *outliers*

Para o desenvolvimento do modelo de ABTS o número de variáveis latentes do PLS utilizado foi de 8 VL, que foi sugerida pelo *software* quant2 a partir dos valores de RMSECV (Figura 16).

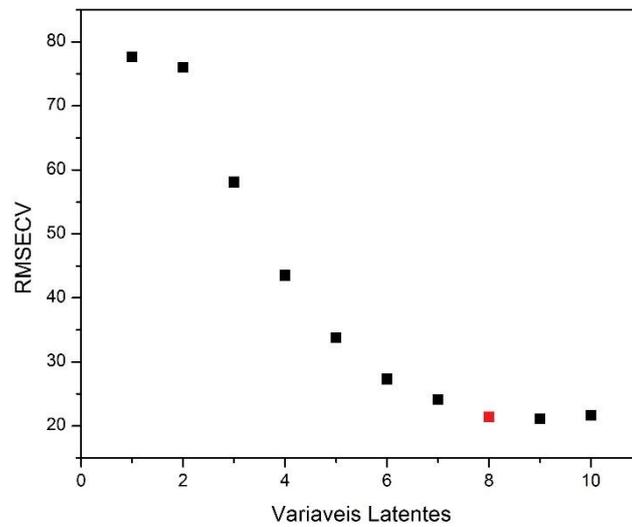


Figura 16 - Determinação do número de variáveis latentes do PLS para o modelo de ABTS.

Primeiramente os dados foram centrados na média, ainda para a melhor minimização dos erros nesse modelo foram utilizados os pré-tratamentos *Internal Standard* na região de (8956,5 - 5311,4 cm^{-1}) e SLS (9400 - 8447,3 cm^{-1}) (Figura 17), a curva de calibração não apresentou amostras anômalas, porém a curva de validação externa apresentou sugestão de *outlier* para amostra 13, a mesma foi descartada da curva.

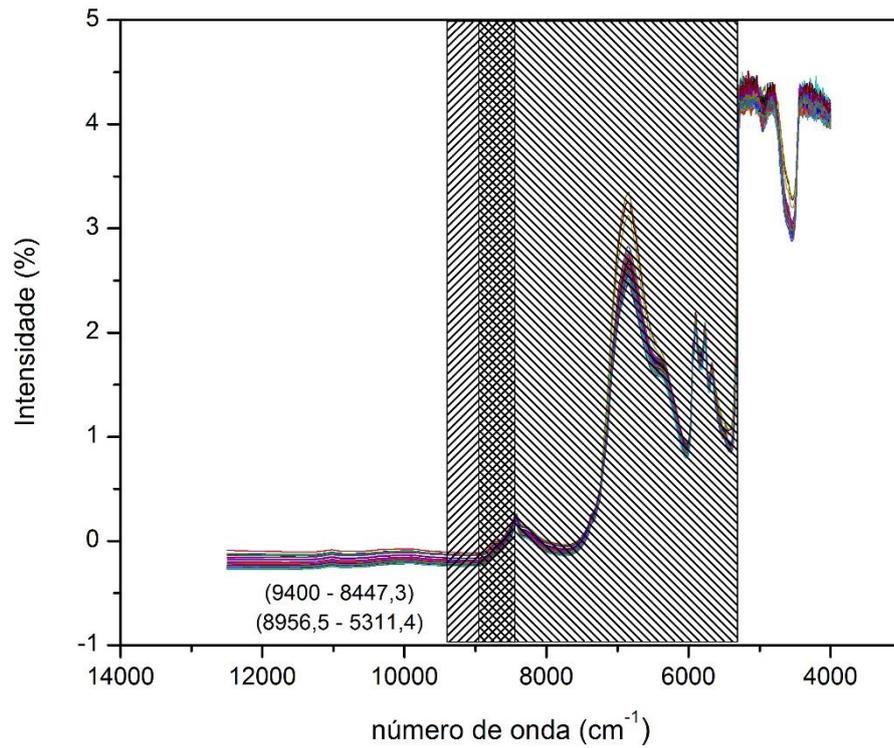


Figura 17 - Regiões espectrais (hachurada) utilizadas na construção do modelo

5.3.4.2 Modelos de calibração e validação

Para construção da curva de calibração sessenta e duas amostras foram utilizadas. E para a validação por grupo de teste dezenove amostras foram utilizadas, sendo estas: 3, 6, 10, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 40, 43, 46, 53, 56, 57, 63, 65 e 78.

A figura 18, apresenta a curva de calibração (B) e as curvas de validação (A e B) do modelo de ABTS.

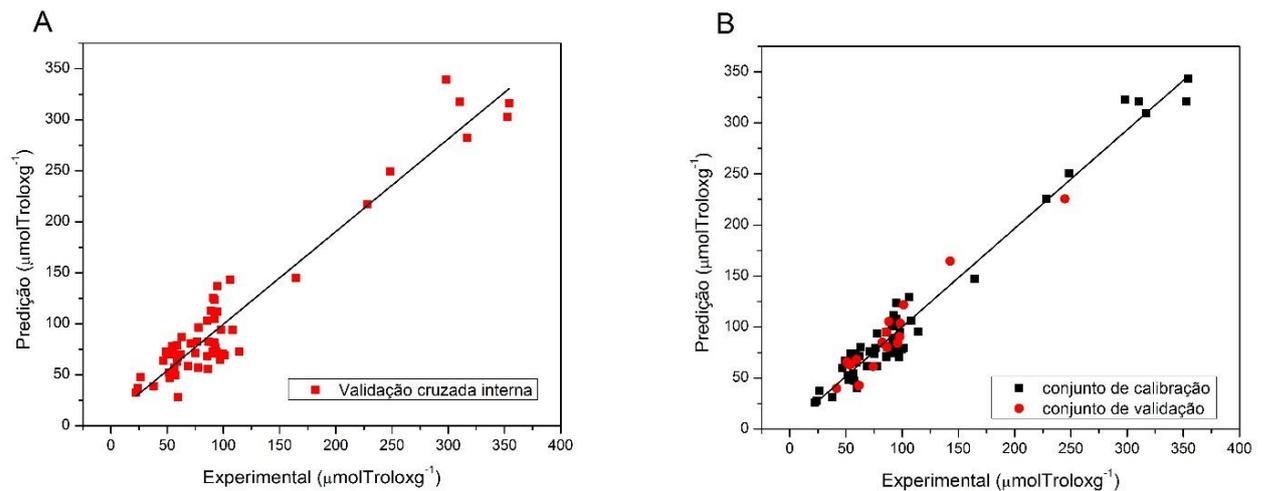


Figura 18- Diagrama de correlação entre a predição e o valor verdadeiro de atividade antioxidante por método ABTS das amostras por validação cruzada interna (A) e validação externa (B).

Na figura 18, são expressos em vermelho as amostras utilizadas para validação interna cruzada (Figura 18A) e validação cruzada externa (Figura 18B). Pode-se observar que as curvas apresentaram pouca variação nos resultados de predição versus experimental em relação a linha de tendência. Os parâmetros de predição do modelo são apresentados na tabela 5.

Tabela 5 - Resultados de calibração e validação para o modelo de ABTS

ABTS	Calibração	Validação	
		<i>Cross Validation</i>	<i>Test set</i>
R²	0,96	0,90	0,92
RMSEC	12,81	-	-
RMSECV	-	21,9	-
RMSEP	-	-	13,2
RPD	5,45	3,52	3,34
RER	-	15,16	25,14
RMSEP/RMSECV	-	0,60	

As curvas de validação do modelo de ABTS apresentaram valores de $R^2 > 0,90$; a capacidade de predição do modelo avaliada por RPD é considerada satisfatória, pois possui valores superiores a 2, o RER apresentou valores de validação cruzada de 15,16 e validação externa de 25,14, valores acima de 10 para RER consideram as curvas de calibração com boas estimativas, em ambos os casos os resultados indicam novamente uma boa predição para o modelo. Os modelos

apresentaram erros altos, modelos de calibração desenvolvidos por Pascoa, Magalhães e Lopes para ABTS em café apresentaram $RMSECV= 21,2$ e $RMSEP=17,2$, similares aos valores reportados neste trabalho, desta forma sugere-se que estes valores de erro sejam característicos para as análises de referência de sequestro do radical ABTS. A razão dos erros de predição que indica a robustez do modelo apresentou valor de 0,60; indicando pouca robustez no modelo. Portanto o modelo desenvolvido apresenta boa capacidade preditiva com uma robustez razoável.

5.3.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO (FRAP)

5.3.5.1 Pré-tratamento, região espectral e remoção de *outliers*

Para este modelo o número de variáveis latentes do PLS que propiciou o menor $RMSECV$ foi o de 7VL (Figura 19).

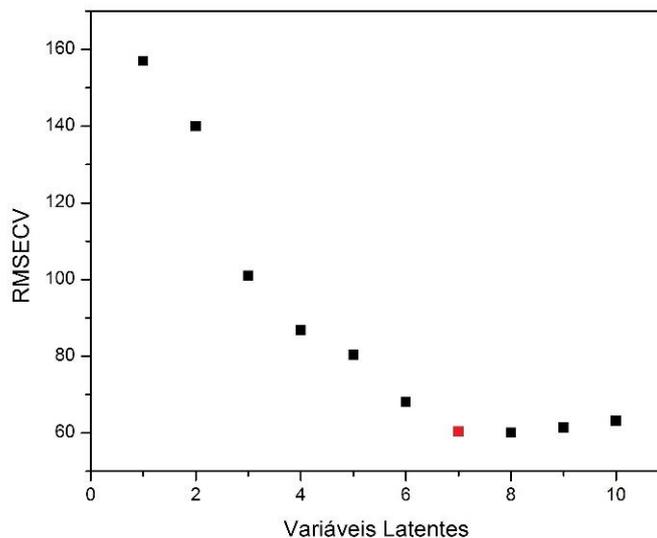


Figura 19 - Determinação do número de variáveis latentes do PLS para o modelo de FRAP.

Primeiramente os dados foram centrados na média, e os outros pré-processamentos que propiciaram melhores resultados a curva de calibração foram

primeira derivada, segunda deriva e MSC, as regiões utilizadas na construção do modelo foram de $(9400 - 7498,4 \text{ cm}^{-1})$ e $(6102 - 5446,4 \text{ cm}^{-1})$ (Figura 20).

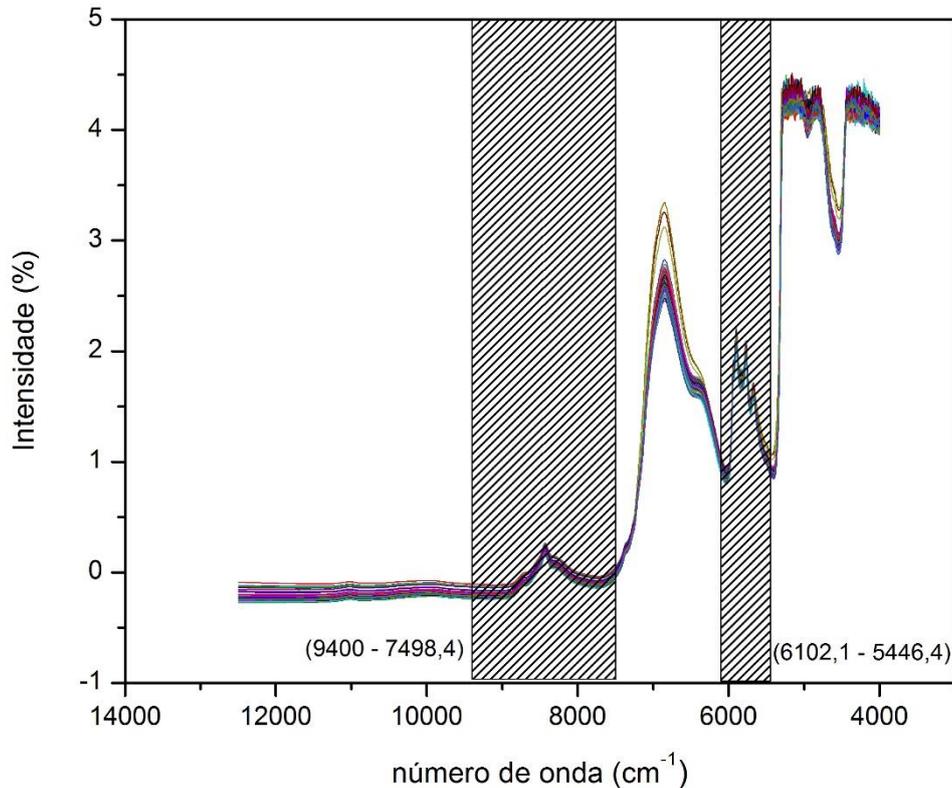


Figura 20 - Região espectral (hachurada) utilizada na construção do modelo

Nas curvas não houveram constatação de amostras anômalas. Desta forma, para a construção do modelo as amostras separadas para validação externa foram: 3, 6, 7, 11, 13, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 40, 46, 53, 59, 61, 63, 65, 74, 78. As amostras restantes foram utilizadas na calibração.

5.3.5.2 Modelos de calibração e validação

O conjunto utilizado para a curva de calibração de FRAP é apresentado em preto na figura 21B. Na figura 21, são demonstradas em vermelho as amostras

utilizadas para validação interna cruzada (Figura 21A) e validação cruzada externa (Figura 21B).

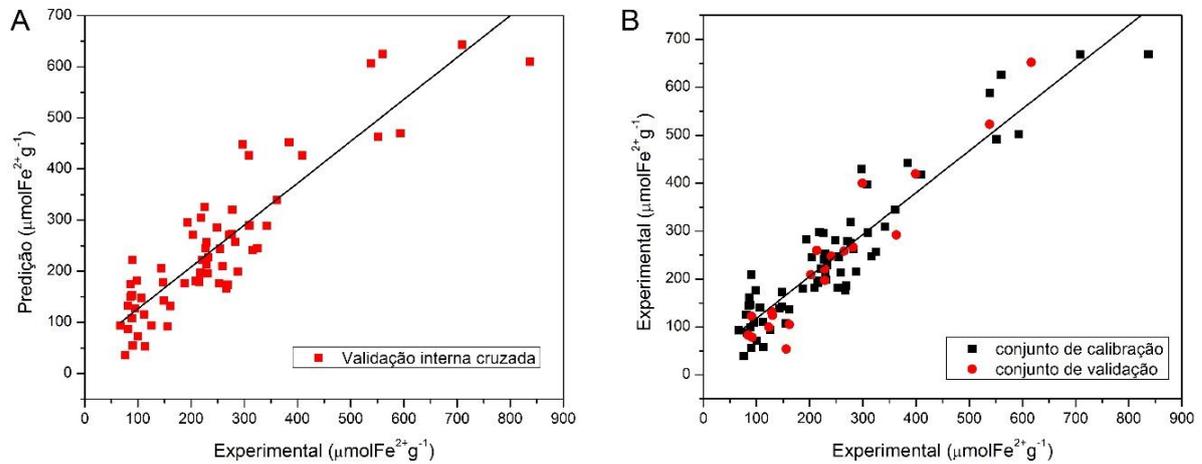


Figura 21- Diagrama de correlação entre a predição e o valor verdadeiro de atividade antioxidante por FRAP das amostras por validação cruzada interna (A) e validação externa (B).

A tabela 6, indica os principais parâmetros obtidos da validação das curvas geradas.

Tabela 6 - Resultados de calibração e validação para o modelo de FRAP

FRAP	Calibração		Validação	
			<i>Cross Validation</i>	<i>Test set</i>
R²	0,90		0,85	0,84
RMSEC	55,62		-	-
RMSECV	-		60,4	-
RMSEP	-		-	57,1
RPD	3,21		2,59	2,48
RER	-		12,55	13,49
RMSEP/RMSECV	-			0,94

O modelo desenvolvido apresentou valores de R² de predição de 0,85 e 0,84 para validação interna e externa respectivamente, modelos de calibração com R²_{cv} entre 0,81 a 0,90 são considerados bons (DAL ZOTTO, et al., 2008).

Os valores de RER foram superiores a 10, indicando um modelo com boa estimativa, e por apresentar valores de RPD acima de 2 o modelo apresenta boas calibrações. A razão de RMSEP/RMSECV apresentou valor de 0,94, muito próximo de 1, sendo um indicativo de que o modelo é robusto.

Desta forma entende-se que o modelo de calibração gerado é capaz de prever as quantificações de FRAP em EEP de maneira robusta.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho propôs um método alternativo para a determinação de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante *in vitro* para extratos etanólicos de própolis. A grande vantagem de utilizar a técnica de espectroscopia no infravermelho próximo aliada à PLS é a facilidade, rapidez e baixo custo para desenvolver as quantificações dos parâmetros anteriormente citados.

No desenvolvimento dos modelos foi possível observar que, para a garantia de bons modelos, eles devem conter um número mínimo de amostras que representem a maior faixa possível de estudo. Os modelos criados apresentaram de maneira geral uma boa capacidade de predição, desta forma as validações utilizadas sugerem que o modelo de flavonoides é capaz de estimar as quantificações dos EEP e os modelos de fenólicos, DPPH, ABTS e FRAP tornam-se uma alternativa as análises de referência apresentadas, diminuindo a geração de resíduos e o tempo das análises.

REFERÊNCIAS

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

ALMEIDA, E. B.; CARDOSO, J. C.; LIMA, A. K.; OLIVEIRA, N. L.; PONTES-FILHO, N. T.; LIMA, S. O.; SOUZA, I. C. L.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C. The incorporation of Brazilian própolis intocollagen-based dressing films improves dermal burn healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, p. 419–425, 2013.

ALVES, E.; KUBOTA, E. H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**, V.34 N.1, P. 37-41, 2013.

AMARAL, A. M. **Arranjo Produtivo Local e Apicultura como estratégias para o desenvolvimento do sudoeste do Mato Grosso**. 2010. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências). UFSCar, São Carlos – SP, 2010.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n.1, p. 1-9, 2007.

ATTIA, A. A.; ELMAZOU DY, R. H.; EL-SHENAWY, N. S. Antioxidant role of propolis extract against oxidative damage of testicular tissue induced by insecticide chlorpyrifos in rats. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, p. 87–93, 2012.

BACAXIXI, Pamela et al. A importância da apicultura no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, São Paulo, n. 20, dez. 2011.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **eCAM** v. 2, n.1, 2005.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n.4, p.629-643, jul./ago., 2010.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química. Nova**. v.29, n.6, p. 1401-1406, 2006.

BENZIE, I. F.F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 239, p. 70-76, 1996.

BRAND-WILLIAN, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

CASTRO, C.; MURA, F.; VALENZUELA G.; FIGUEROA, C.; SALINAS, R.; ZUÑIGA, M. C.; TORRES, J. L.; FUGUET, E.; DELPORTE, C. Identification of phenolic compounds by hplc-esi-ms/ms and antioxidant activity from Chilean própolis. **Food research international**. V.64, P. 873–879, 2014.

CENTEC – Instituto Centro de Ensino Tecnológico. **Apicultura**. Edições Demódrilo Rocha, v.1, 2. ed, Fortaleza, 2004.

CERQUEIRA, E. O.; POPPI, R. J.; KUBOTA, L.T. Utilização de filtro de transformada de fourier para a minimização de ruídos em sinais analíticos. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 690-698, 2004.

CONZEN, J-P. **Multivariate Calibration: A practical guide for developing methods in the quantitative analytical chemistry**, BRUKER, v. 1, 2006.

DA SILVA, F. E. B.; SABIN, G. P.; MÜLLER, E. I.; PARISOTTO, G.; FLORES, E. M. M.; FERRÃO, M. F. Otimização de métodos de regressão multivariada para quantificação de sulfametoxazol e trimetoprima em medicamentos. **Revista Produção Online**, ed. especial, 2007.

DAL ZOTTO, R.; DE MARCHI, M; CECCHINATO, A.; PENASA, M.; CASSANDRO, M.; CARNIER, P.; GALLO, L.; BITTANTE, G. Reproducibility and Repeatability of Measures of Milk Coagulation Properties and Predictive Ability of Mid-Infrared Reflectance Spectroscopy. **Journal of Dairy Science**. V. 91, n.10, p. 4103-12, 2008.

DAUGSCH, A. MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian red propolis – chemical composition and botanical origin. Evidence – Based Complementary and Alternative Medicine, **Oxford**, v. 5, n. 4, p. 435-441, 2007.

EMBRAPA. **ABC da agricultura familiar: Criação de abelhas (apicultura)**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília – DF, v. 18, 2007.

FARNESI, A. P.; AQUINO, R. F.; DE JONG, D.; BASTOS, J.K.; SOARES A.E. Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 635-640, 2009.

FERNANDES-SILVA, C. C.; SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F. Chemical profiling of six samples of Brazilian própolis. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 237-240, 2013.

FERREIRA, M. M. C; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, L. O. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, 1999.

FISCHER, G.; HÜBNER, S.O.; VARGAS, G.D.; VIDOR, T. Imunomodulação pela própolis. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.75, n.2, p.247-253, abr./jun., 2008.

FUNAKOSHI-TAGO, M.; OKAMOTO, K.; IZUMI, R.; TAGO, K.; YANAGISAWA, K.; NARUKAWA, Y.; KASAHARA, T.; TAMURA, H. Anti-inflammatory activity of flavonoids in Nepalese propolis is attributed to inhibition of the IL-33 signaling pathway. **International Immunopharmacology**, v. 25, n. 1, p.189-198, 2015.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. Tradução Celio Pasquini. V.1, 6 ed., Porto Alegre : Bookman, 2009.

JUG, M.; KONCIC, M. Z.; KOSALEC, I. Modulation of antioxidant, chelating and antimicrobial activity of poplar chemo-type propolis by extraction procedures. **Food science and technology**, v. 57, p. 530-537, 2014.

KAI, H.; OBUCHI, M.; YOSHIDA, H.; WATANABE, W.; TSUTSUMI, S.; PARK, Y. K.; MATSUNO, K.; YASUKAWA, K.; KUROKAWA, M. In vitro and in vivo anti-influenza virus activities of flavonoids and related compounds as components of Brazilian propolis (AF-08). **journal of functional foods**, v.8, p. 214–223, 2014.

KITRYTĖ, V.; ŠADUIKIS, A.; VENSKUTONIS, P. R. Assessment of antioxidant capacity of brewer's spent grain and its supercritical carbon dioxide extract as sources of valuable dietary ingredients, **Journal of Food Engineering**, v. 167, Part A, p.18-24, 2015.

KONZEN, P. H. A.; FURTADO, J. C.; CARVALHO C. W.; FERRÃO M. F.; MOLZ, R. F.; BASSANI, I. A.; HÜNING, S. L. otimização de métodos de controle de qualidade de fármacos usando algoritmo genético e busca tabu. **Pesquisa Operacional**, v.23, n.1, p.189-207, 2003.

LATOCHA, P.; ŁATA, B.; STASIAK, A. Phenolics, ascorbate and the antioxidant potential of kiwiberry vs. common kiwifruit: The effect of cultivar and tissue type, **Journal of Functional Foods**, v. 19, Part A, p. 155-163, 2015.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; NETO, P. J. R. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n.3, p. 447-454, Jul./Set. 2008.

LUZ, E. **Predição de propriedades de gasolinas usando espectroscopia FTIR acoplada à regressão por mínimos quadrados parciais**. 2003. 103 f. Dissertação (Mestrado em Química) - PUC-Rio, Rio de Janeiro, 2003.

MARTINS, J. P. A.; FERREIRA, M. M. C. *QSAR modeling*: um novo pacote computacional *open source* para gerar e validar modelos QSAR. **Química Nova**. vol.36, n.4, p. 554-560, 2013.

MORELLATO, S. A. **Modelos de regressão PLS com erros heteroscedásticos**. 2010. 49 f. Dissertação (Mestrado em Estatística) - UFSCar, São Carlos, 2010.

MORGANO, M. A. **Aplicação de métodos quimiométricos em análise de alimentos**. 2005. 109f. Tese (Doutorado em Química) – Unicamp, Campinas, 2005.

NIKOLICH, K.; SERGIDES, C.; PITTAS, A. The application of Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) for the quantitative analysis of hydrocortisone in primary materials. **J.Serb.Chem.Soc.** v. 66, n. 3, p. 189–198, 2001.

NOVAK E. M.; MARCUCCI, M. C.; SAEAYA, A. C. H. F.; LÓPEZ, B. G-C.; FORTES, M. A. H. Z.; GIORGI, R. R.; MARUMO, K. T.; RODRIGUES, R. F.; MARIA, D. A. Antitumoural activity of Brazilian red propolis fraction enriched with xanthochymol and formononetin: An in vitro and in vivo study. **journal of functional foods** v. 2, P. 91–102, 2014.

OLDONI, T. L. C.; OLIVEIRA, S. C.; ANDOLFATTO, S.; KARLING, M.; CALEGARI, M. A.; SADO, R.Y. et al. Chemical Characterization and Optimization of the Extraction Process of Bioactive Compounds from Propolis Produced by Selected Bees *Apis mellifera*. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 26, n. 10, p. 2054-2062, 2015.

OLIVEIRA, F. C. C.; DE SOUZA, A. T. P. C.; DIAS, J. A.; DIAS, S. C. L.; RUBIM, E J. C. A escolha da faixa espectral no uso combinado de métodos espectroscópicos e quimiométricos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 2, p. 218-225, 2004.

OLIVEIRA, F. C. C. **Modelos de calibração multivariada associados a espectroscopia vibracional para análise de misturas diesel – óleos vegetais**. 2006. 120 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de química, UnB, Brasília, 2006.

ORŠOLIĆ, N.; SKURIĆ, J.; ĐIKIĆ, D.; STANIĆ, G. Inhibitory effect of a propolis on Di-n-Propyl Disulfide or n-Hexyl salicylate-induced skin irritation, oxidative stress and inflammatory responses in mice. **Fitoterapia**, v. 93, p. 18–30, 2014.

PARK, Y. K.; KOO, M. H.; SATO, H. H.; CONTADO, J. L. Estudo de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 38, n.4, p. 1235-1259, 1995.

PÁSCOA, R. N. M.J.; MAGALHÃES, L. M.; LOPES, J. A. FT-NIR spectroscopy as a tool for valorization of spent coffee grounds: Application to assessment of antioxidante properties, **Food Research International**, v. 51, n.2, 2013.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; ENGEL, R. G. **Química orgânica experimental: técnicas de escala pequena**; tradução de Alencastro, R. B. 2 ed., Porto Alegre :Bookman, 2009.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J.R. **Introdução a espectroscopia**; tradução Pedro Barros. 4 ed., São Paulo :Cengage Learning, 2010.

POVIA, G. S. **Determinação dos parametros de qualidade de detergents empóutilizandoespectroscopia do infravermelhopróximo**. 2007. 70 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Unicamp, Campinas – SP, 2007.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidante activity aplying and improved ABTS radical cation de colorization assay. **Free Radcial Biologocial Medicine**, 1999.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E.; Smoothing and differentiation of data by simplified leasts quares procedures, **Analytical Chemistry**, v.36, p. 1627 – 1639, 1964.

SINGLETON, V. L.; ROSSI J. A. J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagentes. **Amer. J. Enol. Viticult.**, v. 16, p. 144-58, 1965.

SILVA, W. K. **Monitoramento em linha em tempo real do diâmetro médio das partículas e dos teores de não voláteis e monômero de durante a polimerização em emulsão usando espectroscopia NIR.** 2009. 106f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Escola Politécnica USP, São Paulo. 2009.

SILVA, E. M.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H.; REES, J. F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **FoodChem.**, v. 101, p. 1012-1018, 2007.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos;** tradução Alencastro, R. B. 7 ed., Rio de Janeiro : LTC, 2007.

SOUZA, J. S.; FERRÃO, M. F. Aplicações da espectroscopia no infravermelho no controle de qualidade de medicamentos contendo diclofenaco de potássio. Parte I : Dosagem por regressão multivariada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 42, n. 3, jul./set., 2006.

SUN, D-W. **Infrared spectroscopy for food quality analysis and control.** 1 ed., Academic Press (ELSEVIER), 2009.

SYVILAY, D. WILKIE-CHANCELLIER, N. TRICHEREAU, B. TEXIER, A. MARTINEZ, L. SERFATY, S. DETALLE, V. Evaluation of the standard normal variate method for Laser-Induced Breakdown Spectroscopy data treatment applied to the discrimination of painting layers. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 114, p. 38-45, 2015.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V. E BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VOGUEL, A. I. **Análise química quantitativa;** tradução Afonso, J. C.; Aguiar P. F.; Alencastro, R. B. 6 ed., Rio de Janeiro : LTC, 2008.

ZHANG, Z-M.; LIANG, Y-Z.; CHEN, S. A novel storage method for the NIR infrared spectroscopy chemometrics models. **Analytica Chimica Acta**. v. 688, p. 149-154, 2010.

WANG, Y.; MA, L-T. XU, B-H. Diversity in life history of queen and worker honey bees, *Apis mellifera* L. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 18, p. 145–149, 2015.