

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA**

LETYCIA ALYNE MATEI

**DESENVOLVIMENTO DE MODELOS DE CALIBRAÇÃO
MULTIVARIADA PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS INDIVIDUAIS EM PRÓPOLIS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PATO BRANCO

2021

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

LETYCIA ALYNE MATEI

DESENVOLVIMENTO DE MODELOS DE CALIBRAÇÃO
MULTIVARIADA PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS INDIVIDUAIS EM PRÓPOLIS

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PATO BRANCO

2021

LETYCIA ALYNE MATEI

DESENVOLVIMENTO DE MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS INDIVIDUAIS EM PRÓPOLIS

Development of multivariate calibration models for the determination of individual phenolic compounds in propolis

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentada como requisito para obtenção do título de Bacharel em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni
Coorientadora: Dr^a. Cintia Boeira Batista Lafay

PATO BRANCO

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais.

Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



MINISTERIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS PATO BRANCO



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BACHARELADO

TERMO DE APROVAÇÃO

DESENVOLVIMENTO DE MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA PARA
DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS INDIVIDUAIS EM PRÓPOLIS

POR

LETYCIAALYNE MATEI

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado em 19/05/2021 às 16 horas como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química. A candidata foi argüida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Prof^a. Dr^a. TATIANE LUIZA CADORIN OLDONI

Orientadora

DAVI SILVA

Membro da banca

LARISSA MACEDO DOS SANTOS TONIAL

Membro da banca

Nota: O documento original e assinado pela Banca Examinadora encontra-se no SEI processo 23064019674/2021-71

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família, por todo o suporte durante a trajetória acadêmica.

Dedico aos que acreditam e incentivam a universidade e a ciência pública.

Dedico às mulheres cientistas espalhadas pelo mundo todo.

Dedico também para aqueles que superam todo e qualquer obstáculo para concluir seu objetivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de estar vivendo esse momento da minha vida, agradeço a toda minha família Minotto e Matei, aos meus pais, Aldivo Matei e Bernardete Minotto Matei, que sempre estiveram presentes, nos bons e maus momentos. Ao meu avô José Minotto (*in memorian*), que sempre cativou em seus netos a busca pelo conhecimento, assim como aos meus outros avós, Maria Nuernberg Minotto (*in memorian*), Hermínio Vitório Matei (*in memorian*) e Balvina Wronski Matei (*in memorian*), que marcaram minha vida profundamente e ajudaram a construir quem sou hoje.

Agradeço a minha irmã Giselly, meu cunhado, Adroaldo e ao pequeno ser de luz que veio iluminar nossas vidas, minha sobrinha Lavínea, vocês também foram fundamentais para que fosse possível concluir esse ciclo, ao meu namorado Everton Trento Junior, pois me auxiliaram no meu desenvolvimento pessoal e me incentivaram na busca da evolução.

Agradeço profundamente a minha orientadora, Prof^a Dr^a Tatiane Luiza Cadorin Oldoni, a minha coorientadora, Dr^a Cintia Boeira Batista Lafay, que me deram todo o suporte durante minhas iniciações científicas assim como nesse presente trabalho, me apresentaram ao mundo da pesquisa científica, sempre auxiliando nos momentos de dúvida e dispostas a orientar em momentos turbulentos, vocês foram essenciais.

Agradeço a todos que passaram pelo meu caminho nesses anos de universidade, aos professores do Departamento de Química, os quais contribuíram para a minha formação, aos funcionários que trabalham nos mais variados setores da universidade, aos responsáveis pela limpeza, pois cada um deixou sua marca em mim, e me auxiliaram a evoluir como pessoa. Agradeço ao LabMulti Central de Análises, UTFPR - PB por todo o auxílio nas análises.

Agradeço todas as minhas amigas, que compartilharam comigo os momentos complicados, e me aconselharam, em especial a Anaclara Prasniewisk (*in memorian*), que partiu de uma forma tão inexplicável, mas que deixou seus ensinamentos e seus conselhos no pouco tempo que convivemos juntas, te agradeço profundamente, de onde você estiver!

O ciclo acadêmico é repleto de desafios e conquistas, apesar de as vezes parecer impossível, com dedicação e teimosia, no final sempre tudo se encaixa. Esse

ciclo se encerra e com ele a vida profissional se torna a nova realidade, tenho absoluta certeza que será um novo ciclo incrível. Agradeço por todos os momentos durante essa vivência acadêmica.

EPÍGRAFE

*“A vida vem em ondas, como um mar
Num indo e vindo infinito...”
(Lulu Santos, Nelson Motta)*

RESUMO

MATEI, Letycia Alyne. Desenvolvimento de modelos de calibração multivariada para determinação de compostos fenólicos individuais em própolis. 2021. 59f. TCC (Graduação) – Curso de Bacharelado em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2021.

A própolis é um material resinoso, empregado para várias finalidades na colmeia. Atualmente as pesquisas em torno do emprego das propriedades bioativas da própolis aumentaram, evidenciando assim a importância da própolis, e o quanto rica é sua composição química. O presente trabalho tem como objetivo, elaborar modelos de calibração multivariada, empregando os espectros obtidos pela técnica de NIRS, assim como, as quantificações obtidas pela técnica da CLAE, avaliando as figuras de mérito obtidas. Além de determinar o emprego da quimiometria associada ao NIRS. Os modelos para o ácido trans-cinâmico, para a galangina e para o ácido cumárico, foram construídos no programa MatLab, pacote do PLS. Outras ferramentas como o HCA e PCA, com o programa ChemoStat, foram empregadas para remoção de *outliers* e aplicação do melhor pré processamento. Para os três modelos, o RER ficou acima de 10, apresentando alta utilidade prática, já o coeficiente R^2 de calibração ficou entre 0,90 e 0,96, R^2 de predição entre 0,84 a 0,90. Dentre os três modelos, o que apresentou melhores valores para as figuras de mérito, foi o modelo do ácido trans-cinâmico, sendo os erros: RMSEC de 0,224 mg g⁻¹, RMSECV de 0,437 mg g⁻¹ e RMSEP de 0,476 mg g⁻¹. Foram obtidos os seguintes coeficientes de determinação: R^2 calibração de 0,91, R^2 validação cruzada de 0,67 e R^2 predição de 0,84, os valores obtidos para os coeficientes foram coerentes com os encontrados na literatura. Os três modelos construídos apresentaram figuras de mérito consideradas reprodutíveis, sendo assim, é possível concluir que o NIRS pode ser empregado juntamente com a quimiometria para a predição de compostos fenólicos individuais em própolis, através de pré-processamentos e eliminação de *outliers*.

Palavras-chaves: Própolis. Ácidos fenólicos. Quimiometria. CLAE. NIRS.

ABSTRACT

MATEI, Letycia Alyne. Development of multivariate calibration models for the determination of individual phenolic compounds in propolis. 2021. 59f. TCC (Graduação) – Curso de Bacharelado em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2021.

Propolis is a resinous material, used for various purposes in the hive. Currently, research on the use of propolis bioactive properties has increased, thus showing the importance of propolis, and how rich its chemical composition is. The present work has as objective, to elaborate models of multivariate calibration, using the spectra obtained by the technique of NIRS, as well as, the quantifications obtained by the technique of CLAE, evaluating the figures of merit obtained. In addition to determining the use of chemometry associated with NIRS. The models for trans-cinnamic acid, galangin and cumaric acid were built using the MatLab program, a PLS package. Other tools such as HCA and PCA, with the ChemoStat program, were used to remove outliers and apply the best pre-processing. For the three models, the RER was above 10, showing high practical utility, whereas the R^2 calibration coefficient was between 0.90 and 0.96, the prediction R^2 between 0.84 to 0.90. Among the three models, the one with the best values for the figures of merit, was the model of trans-cinnamic acid, with the following errors: RMSEC of 0.224 mg g^{-1} , RMSECV of 0.437 mg g^{-1} and RMSEP of 0.476 mg g^{-1} . The following determination coefficients were obtained: R^2 calibration of 0.91, R^2 cross-validation of 0.67 and R^2 prediction of 0.84, the values obtained for the coefficients were consistent with those found in the literature. The three models built presented figures of merit considered reproducible, so it is possible to conclude that NIRS can be used together with chemometry to predict individual phenolic compounds in propolis, through pre-processing and elimination of outliers.

Key-words: Propolis. Phenolic acids. Chemometrics. CLAE. NIRS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura química do ácido trans-cinâmico.	19
Figura 2: Estrutura química do flavonóide genérico.	19
Figura 3: Estrutura química da galangina.....	20
Figura 4: Estrutura química da cumarina.	20
Figura 5: Estrutura química do ácido o-cumárico.....	21
Figura 6: Dendograma.	25
Figura 7: Esquema da Análise de Componentes Principais.....	26
Figura 8: Extrato Etanólico de Própolis (EEP).....	31
Figura 9: Cromatograma da mistura de padrões.....	33
Figura 10: Espectros brutos.	36
Figura 11: Espectros processados: (A) ácido trans-cinâmico; (B) galangina; (C) ácido cumárico.....	37
Figura 12: HCA do ácido trans-cinâmico.	38
Figura 13: HCA da galangina.	39
Figura 14: HCA do ácido cumárico.....	40
Figura 15: PCA do ácido trans-cinâmico.	41
Figura 16: PCA da galangina.....	42
Figura 17: PCA do ácido cumárico.....	43
Figura 18: Y Predito (▽) x Y Medido (•) dos ácidos fenólicos. (A) ácido trans-cinâmico; (B) galangina; (C) ácido cumárico.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros de qualidade para os modelos obtidos do NIRS.	29
Tabela 2: Identificação dos padrões utilizados e seus respectivos tempos de retenção e absorbâncias.	33
Tabela 3: Limites de detecção dos ácidos fenólicos e flavonóides.	34
Tabela 4: Resultados dos ácidos fenólicos e flavonóide nas amostras de EEP.	35
Tabela 5: Pré-processamentos para os ácidos fenólicos e flavonóide.	40
Tabela 6: Figuras de mérito para os modelos dos ácidos fenólicos.	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
EEP	Extrato Etanólico de Própolis
HCA	Hierarchical Cluster Analysis (Análise por Agrupamento Hierárquico)
mg EAG g ⁻¹	Miligrama equivalente a ácido gálico por grama de própolis
mg g ⁻¹	Unidade de medida para a quantificação por CLAE
MSC	Multiplicative Scatter Correction (Correção do Espalhamento Multiplicativo)
NIRS	Near Infrared Spectroscopy (Espectroscopia no Infravermelho Próximo)
nm	Nanômetro
PCA	Principal Component Analysis (Análise de Componentes Principais)
PC	Principal Component (Componente Principal)
PLS	Partial Least Squares (Regressão por Mínimos Quadrados Parciais)
R ²	Coefficiente de Determinação
RMSEC	Root Mean Square Error of Calibration (Raiz do Erro Médio Quadrado de Calibração)
RMSECV	Root Mean Square Error of Cross Validation (Raiz do Erro Médio Quadrado da Validação Cruzada)
RMSEP	Root Mean Square Error of Prediction (Raiz do Erro Médio Quadrado da Predição)
RER	Error Interval Ratio (Razão de Intervalo de Erro)
SNV	Standard Normal Variate (Variável Normal Padrão)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	16
2.1. GERAL.....	16
2.2. ESPECÍFICOS	16
3. REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1. PRÓPOLIS.....	17
3.2. ÁCIDOS FENÓLICOS.....	18
3.3. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM AMOSTRAS DE PRÓPOLIS	21
3.3.1. Método espectrofotométrico: Redução do reagente Folin-Ciocalteu.....	21
3.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE.....	22
3.4. Espectroscopia no Infravermelho Próximo – NIRS.....	22
3.5. CHEMOSTAT	23
3.5.1. Análise por Agrupamento Hierárquico - HCA.....	24
3.5.2. Análise de Componentes Principais – PCA	25
3.6. CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA	26
3.6.1. Regressão Por Quadrados Mínimos Parciais – PLS.....	26
3.6.2. Figuras de Mérito	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. AMOSTRAS.....	30
4.2. ESPECTROS	31
4.3. FENÓLICOS INDIVIDUAIS POR CLAE.....	31
4.4. MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
5.1. MODELOS ÁCIDOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDE	34
6. AUXÍLIO AO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO	47
7. CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	49
APÊNDICE	59

1. INTRODUÇÃO

A própolis é um material resinoso produzido pelas abelhas com objetivo de proteção da colmeia, de vedação e embalsamar possíveis invasores. A própolis apresenta propriedades que são benéficas ao organismo humano, possuindo potencial antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatório, (SALATINO et al., 2005; OLDONI et al., 2015) entre outros. Desta forma, as pesquisas com os compostos bioativos presentes na própolis vêm crescendo nos últimos anos e ganhando notoriedade internacional. Sua composição química depende das fontes botânicas disponíveis na região geográfica onde é encontrada (PELATI et al., 2011).

Recentemente, para a quantificação dos compostos presentes na própolis, de forma mais específica, os compostos fenólicos, começou a ser empregada a análise NIR (Espectroscopia de Infravermelho Próximo), juntamente com a análise multivariada. Essa união possibilita a interpretação de dados com maior grau de complexidade, e uma quantificação em tempo reduzido.

Por apresentar pontos positivos relevantes, essa técnica despertou interesse em várias áreas de pesquisa, e a mesma está sendo empregada na predição da composição de cafés (ASSIS et al., 2018), na determinação do colesterol em gemas de ovos (PUERTAS & VAZQUEZ, 2020), na predição da atividade antioxidante da própolis (CALEGARI et al., 2020; MATEI et al., 2020).

Atualmente para identificar e quantificar os compostos fenólicos individuais, a CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), é amplamente usada, por sua elevada sensibilidade. É extremamente importante quantificar os compostos fenólicos individuais presentes na própolis, visto que, a proporção desses compostos varia de acordo com a região onde a própolis é coletada, além da importância do conhecimento químico do produto a ser posteriormente comercializado.

O presente trabalho de conclusão de curso surgiu da necessidade de unir as propriedades biológicas e químicas importantes da própolis com um método que apresente maior rapidez, menor custo, maior precisão, e capacidade de comprovar a existência e reconhecer essas propriedades, em especial os compostos fenólicos individuais.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Desenvolver modelos de calibração multivariada, a partir de resultados cromatográficos, utilizando Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS, do inglês, *Partial Least Squares*) - para quantificar compostos fenólicos individuais presentes em própolis.

2.2. ESPECÍFICOS

- I. Comparar o teor de fenólicos individuais presentes em amostras do Extrato Etanólico de Própolis (EEP), com seus respectivos espectros obtidos pelo NIRS.
- II. Desenvolver os modelos de calibração multivariada para determinação de fenólicos individuais em própolis baseado em suas quantificações cromatográficas.
- III. Analisar as figuras de mérito envolvidas nos modelos de calibração multivariada, tais como: R^2 , RMSEC, RMSECV, RMSEP, RER, RMSEP/RMSECV.
- IV. Determinar se a espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS) associada à quimiometria pode ser empregada na predição de compostos fenólicos individuais presentes em própolis.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. PRÓPOLIS

A própolis é um material resinoso resultante da mistura da saliva das abelhas com o pólen e a cera, apresentando em sua composição polifenóis (flavonoides, ácidos fenólicos), terpenos e aminoácidos, fornecendo complexidade química estrutural (REVILLA et al., 2017). Na colmeia a própolis é usada para diversas finalidades, principalmente na vedação. A própolis começou a ganhar espaço nos anos 1950 quando foi utilizada como tratamento alternativo de problemas de saúde, sendo vista até então como um subproduto da produção de mel (SALATINO et al., 2005).

A principal característica que a própolis possui é a atividade antioxidante (OLDONI et al., 2015, SULAIMAN et., 2011), que é definida como a capacidade de combater os radicais livres no organismo. Outras propriedades biológicas e farmacológicas merecem relevância, como anticâncer (VALENCIA et al., 2012), antibacteriana (VELAZQUEZ et al., 2007), antiviral (SCHNITZLER et al., 2010), antifúngico (WATANABE et a., 2011), antisséptica, antimicrobiana (SALATINO et al., 2005), imunostimulantes e anti-inflamatória (SILVA et al., 2012, PAULINO et al., 2003).

Os compostos fenólicos encontrados na própolis apresentam em sua estrutura química, radicais hidroxila e anéis aromáticos, os quais conferem a estes compostos o potencial antioxidante e podem variar com a região geográfica. Os compostos fenólicos são divididos em diversas classes, uma classe de compostos encontrada na própolis de forma natural são os ácidos fenólicos, com destaque para: ácido cumárico, canferol, galangina, crisina, ácido cafeico e quercetina (KUMAZAWA et al., 2004).

Segundo Pimentel (2005), é evidenciado que a atividade anticarcinogênica dos fenólicos tem sido relacionada à inibição dos cânceres de cólon, esôfago, pulmão, fígado, mama e pele. Os compostos fenólicos que possuem este potencial são resveratrol, quercetina, ácido cafeico e flavonóis.

Atualmente, o uso da própolis ainda é voltado para a medicina alternativa, recebendo notoriedade por suas propriedades biológicas. Para que possa ser

comercializado o Ministério da Agricultura (MAPA) estabelece os parâmetros físicos químicos que a própolis deve apresentar, entre os parâmetros destaca-se que o teor de fenólicos em própolis seja no mínimo de 5% (m/m) e em relação aos extratos de própolis no mínimo de 0,25% (m/m) (MAPA, 2001).

3.2. ÁCIDOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização (BRAVO, 1998). Podemos dividir esses compostos em grandes grupos: os ácidos fenólicos, flavonóides e cumarinas.

Os ácidos fenólicos são caracterizados por possuírem em sua estrutura, um anel benzênico, um grupo carboxílico, e um ou mais grupos hidroxila e/ou metoxila, conferindo assim potencial antioxidante (SOARES, 2002). Compostos antioxidantes são capazes de reduzir os radicais livres presentes, diminuindo a peroxidação lipídica, e prolongando assim, a vida útil, por exemplo, de comidas e produtos farmacêuticos (HALLIWELL, 1997).

Dentre os ácidos fenólicos, há subdivisões: os ácidos benzóicos são os ácidos fenólicos mais simples que podem ser encontrados e são aqueles que possuem sete átomos de carbono (C_6-C_1). A outra subdivisão é composta pelos ácidos cinâmicos, apresentados na Figura 1, apresentando nove átomos de carbono (C_6-C_3) (SOARES, 2002). O ácido trans-cinâmico é o composto mais comumente identificado, já sua variação, o ácido cis-cinâmico é encontrado numa escala mais reduzida. Com a finalidade de contribuir para a caracterização da própolis, análises de ácidos fenólicos e flavonóides com a própolis de regiões da Amazônia, comprovaram a presença do ácido trans-cinâmico (OLIVEIRA, 2012), assim como, em própolis das regiões Sul e Sudeste do Brasil (CALEGARI, 2018).

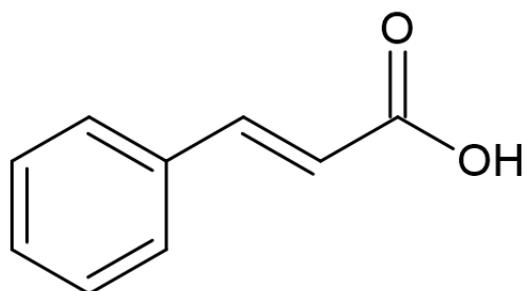


Figura 1: Estrutura química do ácido trans-cinâmico.

Fonte: Autoria própria.

Os flavonóides genéricos, apresentados na Figura 2, são comumente encontrados em várias espécies de plantas, são formados a partir de aminoácidos aromáticos, tirosina e malonato. Caracterizam-se basicamente por possuir um núcleo de flavona de 15 átomos organizados em 2 anéis aromáticos, definidos como A e C (HARBORNE, 1999). A presença de uma ligação dupla, do grupo carbonila e hidroxila no anel C, originam classes e subclasses. Ocorrendo substituição do anéis A e B por grupos funcionais hidroxila permite diferenciar cada componente de sua classe e sua subclasse (MUSIALIK et al. 2009).

Assim como os ácidos fenólicos, os flavonóides são antioxidantes efetivos, e dentre as classes encontram-se: as antocianinas, flavonas, flavonóis, isoflavonas, calçonas (SOARES, 2002). Segundo Oruc, Sorucu & Aydin, (2017), analisando própolis da província da Bursa comparando os efeitos da sazonalidade, perceberam a presença de um flavonóide, a galangina, apresentada na Figura 3. Assim como Calegari (2018), identificou através da CLAE a presença de galangina em própolis de regiões do Brasil.

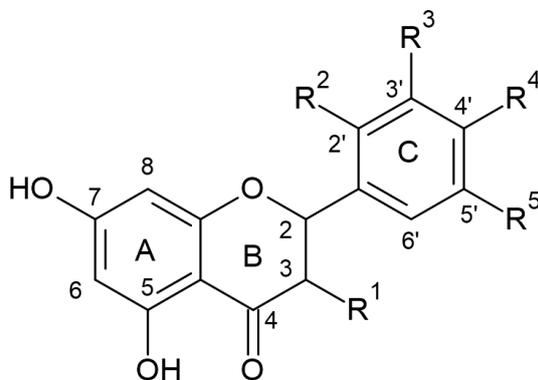


Figura 2: Estrutura química do flavonóide genérico.

Fonte: Autoria própria.

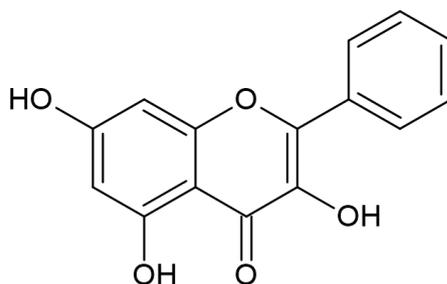


Figura 3: Estrutura química da galangina.

Fonte: Autoria própria.

Através do ácido cumárico, deriva-se a último grupo de compostos fenólicos, as cumarinas, ilustradas na Figura 4, as quais se originam pela ciclização do ácido o-cumárico (Figura 5) (SOARES, 2002).

As substituições que ocorrem na molécula, para as posições *ortho* ou *para*, são responsáveis por aumentar a densidade de elétrons no grupo hidroxila e diminuir a energia da ligação entre oxigênio e hidrogênio, aumentando a reatividade dos radicais livres. Para a posição *meta*, a substituição possui um efeito limitado, porém são essas substituições que conferem a capacidade antioxidante a esses compostos (BARCLAY et al., 1993, GÜLÇİN, 2012). Por ser o principal ácido envolvido nessa classe, o ácido cumárico, já foi identificado em amostras de própolis em vários trabalhos. Em Oliveira (2012), foi possível identificar os tempos de retenção de cada uma das posições do ácido cumárico, a posição *ortho*, *para* e *meta*. Assim como em Calegari (2018), na maior parte das amostras analisadas, houve a identificação do ácido cumárico.

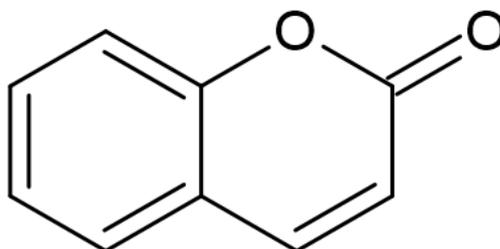


Figura 4: Estrutura química da cumarina.

Fonte: Autoria própria.

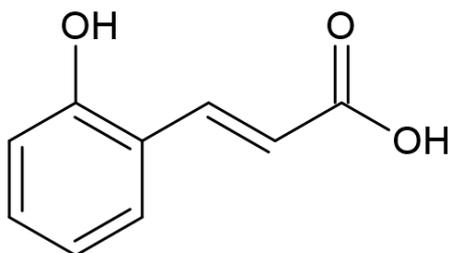


Figura 5: Estrutura química do ácido *o*-cumárico.

Fonte: Autoria própria.

3.3. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM AMOSTRAS DE PRÓPOLIS

3.3.1. Método espectrofotométrico: Redução do reagente Folin-Ciocalteu

O ensaio mais importante utilizado para a determinação de compostos fenólicos totais é o de redução do reagente Folin-Ciocalteu, pela sua simplicidade, rapidez, e baixo custo. Consiste em uma mistura de ácidos de molibdênio e tungstênio, essa mistura, resulta em um complexo de coloração amarela. Os compostos fenólicos podem ser determinados pela mudança de coloração do complexo, pois, na presença dos agentes redutores, que são os compostos fenólicos, o complexo fica com a coloração azul, e os mesmos, podem ser quantificados pela leitura espectrofotométrica em 740 nm (OLIVEIRA, 2011).

Apesar de ser o método mais empregado na determinação de compostos fenólicos por apresentar maior sensibilidade à redução dos fenóis e diminuindo a tendência à precipitação, porém, este método não é específico, pois detecta todos os grupos fenólicos presentes nas amostras analisadas (ANGELO & JORGE, 2007; NACZK & SHAHIDI, 2004). Visando essa problemática utilizaram-se outras técnicas para uma possível separação individual dos compostos fenólicos.

3.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE

A CLAE (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) é uma técnica analítica empregada para separar compostos em uma mistura complexa. Os compostos passam por uma coluna de separação, que é possível acoplar detectores que permitem o trabalho de identificação e quantificação dos compostos de interesse (WIBERG, & JACOBSSON, 2004; CUI et al., 2009).

Dentre os detectores empregados em CLAE, destaca-se o arranjo de fotodiodos na região do ultravioleta (UV) e visível (VIS) que apresenta como principais vantagens: o baixo tempo de análise e o baixo ruído associado ao sinal medido. Para que seja realizada a correta interpretação dos resultados, é importante definir os comprimentos de onda em que os analitos apresentam máxima absorção de radiação (TISTAERT, DEJAEGHER, & HEYDEN, 2011).

A técnica de CLAE é capaz de realizar uma análise mais detalhada em amostras, onde permite identificar, através dos tempos de retenção, compostos específicos presentes na própolis, porém, é uma técnica com alto custo de consumíveis, assim como, o emprego de padrões específicos para as análises, demandando de profissionais treinados para operação do equipamento.

3.4. Espectroscopia no Infravermelho Próximo – NIRS

A espectroscopia de infravermelho na região do próximo (NIRS, do inglês *Near Infrared Spectroscopy*) é empregado em análises químicas por várias indústrias, como de alimentos (POREP, KAMMERER & CARLE, 2015), farmacêutica (RODIONOVA et al., 2019), plantas (SANCHEZ et al., 2018) com o objetivo de verificar os constituintes de determinadas amostras, de forma eficaz, rápida, não destrutiva, geralmente não necessitam de preparação e custo baixo (SUN et al., 2009).

A região que compreende o NIRS se estende de 13330 a 4000 cm^{-1} , e é nessa região onde há a absorção de *overtones* ou combinações de movimentos ou vibrações das moléculas, os espectros variam conforme a composição das amostras (KUMAR, 2015). Os *overtones* são formados por bandas de combinação, na técnica de NIRS é possível detectar até 4 *overtones*, que são os elétrons excitados para níveis mais

energéticos (SUN et al., 2009). Por compreender uma ampla faixa do espectro, as informações obtidas de NIRS são geralmente complexas, auto correlacionadas, na maioria das vezes ficam distribuídas em todo o espectro, e necessitam de algum tratamento estatístico para possibilitar o emprego em fins analíticos (PASQUINI, 2018).

Um dos passos mais importantes para ajudar a simplificar a interpretação das informações presentes nos espectros de NIRS, é a aplicação de pré-processamentos, responsáveis por remover fenômenos físicos, que são capazes de melhorar a regressão multivariada, a análise exploratória, e conseqüentemente, a caracterização das amostras. Os pré-processamentos podem ser divididos em duas categorias: métodos que corrigem a dispersão e derivadas espectrais (RINNAN, VAN DEN BERG & ENGELSEN, 2009).

Em Souza (2013), a NIRS e a quimiometria podem ser empregadas juntas, pois os espectros gerados pela técnica apresentam muita informação e certa complexidade, e as técnicas estatísticas auxiliam na interpretação dos dados. Segundo Callegari (2018), o uso da espectroscopia no infravermelho próximo associada à quimiometria, é capaz de ser aplicada na caracterização de amostras de própolis, pois os modelos PLS construídos apresentam robustez e capacidade de predição.

Uma particularidade da espectroscopia NIRS é a de detectar propriedades físicas e químicas, e tem sido explorado em vários trabalhos na literatura devido à importância desta característica. Segundo Sánchez (2018) e Pérez-Marín (2019), foi possível demonstrar a viabilidade de na medição *in situ* de parâmetros de qualidade, como cor e firmeza, assim como, parâmetros de segurança, como a presença de nitrato em espinafres utilizando a técnica do NIRS.

3.5. CHEMOSTAT

A quimiometria, com o decorrer dos anos e com a capacidade que os equipamentos apresentam em adquirir e armazenar dados se tornou indispensável na análise, e melhoramentos dos dados químicos. Vários *softwares* foram desenvolvidos para atender a necessidade do tratamento de resultados, sendo alguns mais

acessíveis, sem custo com licenças, outros já mais complexos e com alto valor de aquisição.

O desenvolvimento do ChemoStat surgiu com o objetivo de oferecer ao usuário uma ferramenta simples, versátil e livre. Este *software* possui um direcionamento para tratamentos de dados espectrais na região do infravermelho e também na utilização da quimiometria de imagens, onde há uma decomposição das camadas de cor por pixels (HELFER et al., 2015).

Segundo Helfer et al., (2015) o software possui ferramentas matemáticas de transformação e pré-processamento de sinais como correções, suavizações e normalizações, de acordo com, os métodos da 1ª e 2ª derivadas, MSC (Multiple Scatter Correction), SNV (Standard Normal Variate), e método de Savitky-Golay, a partir de dados centrados na média ou escalonados, além de conversões de medidas entre absorvância e transmitância. Assim como permite o tratamento dos dados utilizando ferramentas como Análise por Agrupamento Hierárquico (HCA), Análise por Componentes Principais (PCA) e detecção de amostras anômalas.

O software possui sua aplicação também na quimiometria de imagens, como já mencionado, é possível analisar dados do histograma R, G e B. Para as imagens, são ofertadas ferramentas que facilitam a interpretação, sendo possível exportar os resultados em extensões compatíveis (HELFER et al., 2015).

3.5.1. Análise por Agrupamento Hierárquico - HCA

A análise por agrupamento hierárquico (HCA, do inglês *Hierarchical Cluster Analysis*) é um método de reconhecimento de padrões entre as amostras, ou seja, o comportamento entre amostras com base em seu perfil multivariado. Essa técnica é útil para reduzir a dimensionalidade de grande porte. Onde se maximiza a homogeneidade interna dentro dos grupos e maximiza-se a heterogeneidade entre os grupos (FERREIRA, 2016).

A HCA também é conhecida como método não supervisionado, onde as estruturas dos dados são estudadas, sendo possível, assim, perceber a similaridade entre as amostras e verificar *outliers*. O resultado dessa análise é possível visualizar

na Figura 6, onde é expresso e geralmente na forma de um gráfico bidimensional, o dendograma (SOUSA et al., 2006, GRANATO et al., 2018).

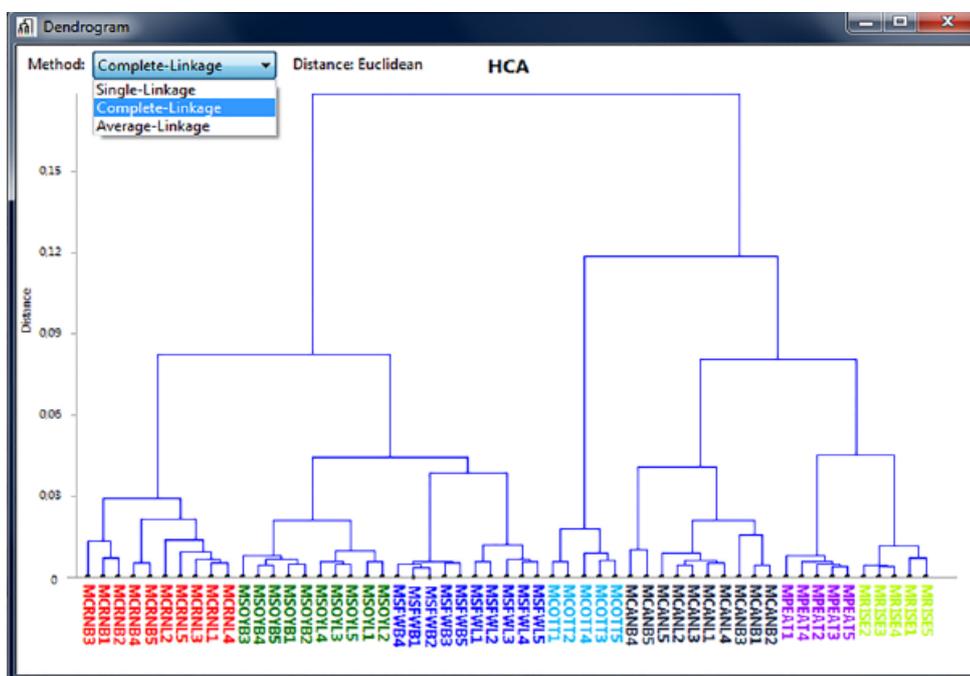


Figura 6: Dendograma.

Fonte: HELFER et al., 2015.

3.5.2. Análise de Componentes Principais – PCA

A análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) também utiliza a similaridade entre as amostras, por meio de combinações lineares das variáveis originais, se obtém gráficos menores dos dados multivariados, formando as componentes principais. Os gráficos obtidos geralmente são bi ou tridimensionais da distribuição das amostras e importância das variáveis (SOUSA et al., 2006).

Uma vantagem dessa técnica é a capacidade de descobrir, visualizar e interpretar as diferenças existentes entre as variáveis, e examinar as relações que podem existir entre as amostras. Também é possível detectar amostras que apresentam um comportamento atípico, pois com a projeção dos dados essa característica fica evidente. Os métodos de projeção são usados para o tratamento de dados espectrais e cromatográficos, visto que, a quantidade de variáveis atinge um

número significativo, e além dessas variáveis apresentarem alta correlação (FERREIRA, 2016).

Havendo uma correlação significativa entre as amostras, é possível fazer uma redução no número de variáveis, as quais ainda sejam capazes de descrever todo o conjunto de variáveis. Esse novo conjunto de variáveis é chamado de Componentes Principais (PC), uma característica das componentes principais é que não são correlacionadas, mas ortogonais entre si, a informação que está presente em uma não estará na outra. Define-se como PC1 a direção que descreve a máxima variância dos dados originais, e como PC2 a direção da máxima variância dos dados ortogonais a PC1 (FERREIRA, 2016), fazendo que a PC1 explique mais a variação de dados do que a PC2 (GRANATO et al., 2018).

A Figura 7 permite visualizar como as amostras se comportarem em uma PCA.

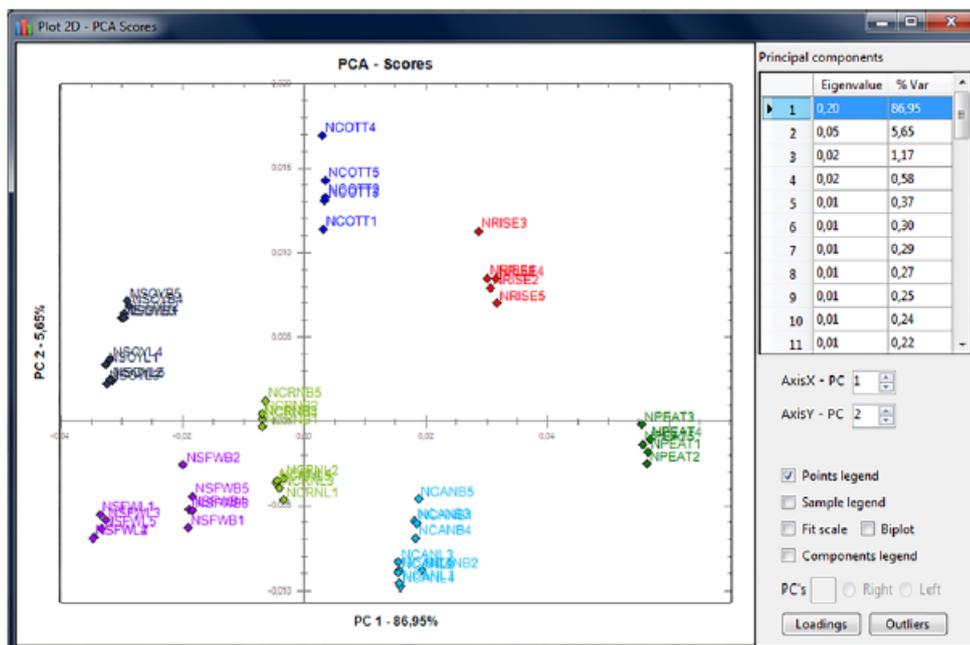


Figura 7: Esquema da Análise de Componentes Principais.

Fonte: HELFER et al., 2015.

3.6. CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

3.6.1. Regressão Por Quadrados Mínimos Parciais – PLS

O PLS é um dos métodos lineares de calibração multivariada mais usada em quimiometria. É geralmente empregado quando se trata de dados oriundos de instrumentos de espectroscopia, em que se obtém como resposta intensidades, e se deseja saber a concentração de um dos constituintes (FERREIRA, 2016).

Entretanto, sua aplicabilidade é muito variada de transtorno de personalidade de Borderline (SUNDBOM et al., 1995), distinguir tipos de Alzheimer (GOTTFRIES et al., 1995) até diferenciar tipos de trigo vermelho usando infravermelho próximo (DELWICHE et al., 1994) e sua facilidade na classificação contempla várias áreas de estudo.

Segundo Ferreira (2016), o modelo PLS é construído em uma única etapa, na qual as informações da matriz X e da propriedade de interesse são consideradas durante a decomposição e compressão dos dados. Espera-se que os resultados que o PLS produza sejam melhores, visto que, os fatores e os escores são definidos para incorporar mais informação da propriedade de interesse durante a construção do modelo (FERREIRA, 2016). O PLS garante que para um conjunto de dados que envolvam uma matriz mais complexa, não haja sobreposição de bandas, como pode ocorrer em análises que envolvam um espectro amplo como o encontrado na espectroscopia de infravermelho próximo (RECH, WEILER, & FERRÃO, 2018).

Juntamente com o PLS, é possível utilizar uma extensão, o iPLS, que realiza a regressão por mínimos quadrados, para cada intervalo em toda a extensão do espectro, possibilitando uma avaliação das informações nas diferentes subdivisões espectrais, selecionando os intervalos que cujas variáveis mostram as informações mais importantes (XIAOBO et al., 2010). É possível a utilização de polimentos, a fim de melhorar a qualidade e a robustez do modelo elaborado, os mesmos são chamados de pré-processamentos (RINNAN, VAN DEN BERG & ENGELSEN, 2009).

3.6.2. Figuras de Mérito

As figuras de mérito, que podem ser observadas na Tabela 1, também são conhecidas como parâmetros de qualidade, são estas, que ao fim do modelo multivariado determinam a confiabilidade e validade do modelo. Dentre as figuras de mérito, destacam-se: o coeficiente de correlação (R^2) erros médios padrões de

calibração (RMSEC), validação cruzada (RMSECV), predição (RMSEP). (KONSEN, et al., 2003). Pelo R^2 é capaz de se observar a variância que existe entre os dados de referência, ele expressa a capacidade de previsão do modelo, o que se explica através da variância nos dados previstos (ELFADL et al., 2010).

Segundo KUMAR (2015), o RMSECV expressa o desvio padrão entre os valores do conjunto amostral da validação cruzada e os dados espectrais obtidos, e também, é capaz relacionar informações da calibração e predição, sendo possível informar o erro de previsão no modelo de calibração. Tratando de dados obtidos de análises analíticas, uma característica que se procura é tornar o método obtido o mais útil possível, a razão de intervalo de erro (RER) é capaz de mensurar essa utilidade e a capacidade do método em ser reproduzido (WILLIAMS & SOBERING, 1993).

Visto a importância das figuras de mérito, as equações utilizadas para o cálculo das figuras de mérito como: R^2 , RMSEP e RER, podem ser visualizados abaixo:

$$R^2 = \sqrt{1 - \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad (1)$$

Na equação (1): n, corresponde ao número de observações no grupo da calibração e no grupo da predição, $(\hat{y}_i - y_i)$, corresponde a diferença dos valores medidos das amostras e preditos no grupo da calibração e no grupo da predição e \bar{y} , corresponde ao valor médio dos valores medidos obtidos das amostras (VIEGAS et al., 2016, DA SILVA et al., 2018).

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{I_p} (y_i - \hat{y}_i)^2}{I_p}} \quad (2)$$

Na equação (2): I_p , corresponde ao número de observações no grupo da predição e $(y_i - \hat{y}_i)$, corresponde a diferença dos valores medidos das amostras e os valores preditos (VIEGAS et al., 2016, DA SILVA et al., 2018).

$$RER = \frac{(y_{max} - y_{min})}{RMSEP} \quad (3)$$

Na equação (3): $(y_{max} - y_{min})$, corresponde a diferença entre o maior e menor valor do grupo da calibração, dividido pelo RMSEP (VIEGAS et al., 2016, DA SILVA et al., 2018).

Tabela 1: Parâmetros de qualidade para os modelos obtidos do NIRS.

Parâmetros	Significado	Valores Esperados	Influência nos modelos	Referências
R ²	Coefficiente de determinação	0,83	A robustez da previsão de calibração do modelo é mantida	Elfadl et al. (2010)
RER	Razão de intervalo de erro	Acima de 10	Alta utilidade prática	Williams & Sobering (1993)
RMSEP/RMSECV	Raiz do erro quadrático médio da raiz da previsão / Raiz do erro quadrático médio da validação cruzada	Inferior a 1,2	Robustez	Coûteaux et al. (2005) Wang et al. (2017)
RMSEP	Raiz do erro quadrático médio da predição	Mais baixo mais satisfatório	Erro baixo na análise da validação	Conzen (2006)
RMSEC	Raiz do erro quadrático médio da calibração	Mais baixo mais satisfatório	Erro baixo na análise da calibração	Oliveira et al. (2015)
RMSECV	Raiz do erro quadrático médio da validação cruzada	Mais baixo mais satisfatório	Erro baixo na predição, aumentando a robustez.	Kumar (2015)

Fonte: Adaptado de Callegari, (2019).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O conjunto de dados utilizado, tais como, concentrações de fenólicos totais, concentrações dos ácidos fenólicos, espectros e cromatogramas, foram obtidos pelo nosso grupo de pesquisa de produtos naturais, supervisionado pela Prof^a Dr^a Tatiane Luiza Cadorin Oldoni, a partir da dissertação de mestrado do Me. Matheus Callegari (CALEGARI, 2018) para o extrato etanólico de própolis (EEP). O espectrômetro de NIRS (Espectroscopia no Infravermelho Próximo) e no equipamento de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), ambos estão alocados no LabMulti Central de Análises, na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Pato Branco.

4.1. AMOSTRAS

As amostras de própolis são orgânicas e foram coletadas de produtores regionais nos estados do Paraná e Santa Catarina, e, também, algumas amostras foram doadas pela empresa Breyer e Cia Ltda. A empresa localiza-se em União da Vitória (Paraná) e ganhou espaço no mercado industrial por possuir uma estrutura moderna, ficando conhecida por ser a primeira a produzir produtos utilizando como base à própolis. A empresa atende o mercado nacional e internacional, e preza pela qualidade de seus produtos, em especial a própolis. A qualidade e a caracterização, através da quantificação de compostos fenólicos, podem ser verificadas pelas técnicas de NIRS e CLAE.

Foram empregadas 50 amostras de EEP (Figura 8), obtidas através da metodologia descrita por Oldoni et al. (2015), foram utilizados 4 g de própolis macerada e acrescentados 50 mL da mistura de etanol:água (80:20 v v⁻¹) em seguida, foi utilizado o banho térmico a 45°C por 45 min. Através do emprego do evaporador rotativo nas condições de 120 mbar a 40°C para a concentração dos EEP, e na sequência, a água residual foi eliminada em liofilizador. Após a concentração, foram preparados extratos padronizados (1000 mg L⁻¹) de EEP.



Figura 8: Extrato Etanólico de Própolis (EEP).

Fonte: Matheus Calegari.

4.2. ESPECTROS

Os espectros foram obtidos em triplicata através do espectrômetro de NIRS com transformada de Fourier da BRUKER modelo MPA. Para as amostras líquidas, ou seja, o EEP foi utilizada uma configuração do equipamento, onde é empregada uma cubeta de quartzo com bomba de sucção para contínua homogeneização da amostra, nas configurações de 32 acumulações e com resolução de 8 cm^{-1} .

4.3. FENÓLICOS INDIVIDUAIS POR CLAE

Os cromatogramas foram obtidos utilizando o Cromatógrafo Líquido (marca VARIAN de modelo: – 90 LC) acoplado a um detector de arranjo de fotodiodo e a uma coluna de fase reversa MICROSORB-MV C18. Foram utilizados alguns padrões, sendo eles: ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido trans-cinâmico, rutina, quercetina, pinocembrina, crisina, canferol e galangina.

Condições para a análise foram estabelecidas no equipamento como: o fluxo de 1 mL min^{-1} , a temperatura da coluna de 30°C , a composição da fase móvel A: $\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$ (99,8:0,2 v v⁻¹); fase móvel B: CH_3OH (100%) com gradiente iniciando com

30% de B, em 15 min 64% de B, 11 min 75% de B, 2 min 95% de B, 1 min 95% de B, 3 min 30% de B e finalmente 10 min em 30% de B, totalizando 42 min de análise. A quantificação foi realizada por padronização externa em uma faixa de concentração que variou de 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

O processo de identificação e quantificados dos compostos fenólicos, foi realizado pelo Me. Matheus Augusto Calegari (2018) (Apêndice).

4.4. MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

A construção dos modelos de calibração multivariada, empregou três *softwares*, o ChemoStat versão 1.0.1.0, com os ensaios estatísticos HCA e PCA, o MatLab versão R2009a para o PLS e o Excel versão 2101

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

As amostras de própolis apresentaram no aspecto geral, uma composição química muito rica, permitindo assim a quantificação de compostos bioativos. Sendo possível identificar e quantificar 11 compostos fenólicos através da técnica de CLAE, como apresentado no cromatograma da Figura 9. Observando a diversidade de padrões quantificados houve a construção de modelos de calibração multivariada utilizando os valores de quantificação dos padrões por CLAE (eixo y) associando com os espectros obtidos do NIRS (no eixo x).

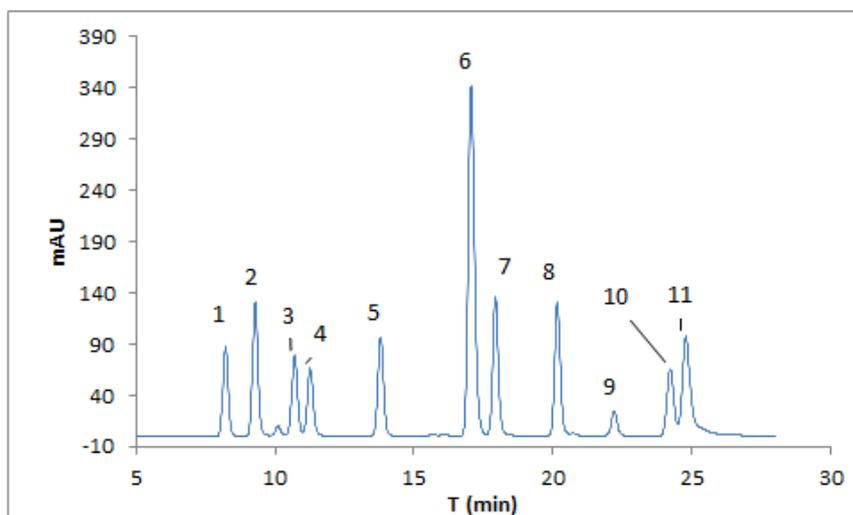


Figura 9: Cromatograma da mistura de padrões.

Fonte: Adaptado de CALEGARI, 2018.

Podemos identificar cada sinal do cromatograma, através do seu tempo de retenção correspondente e perfil de absorvância, expresso na Tabela 2:

Tabela 2: Identificação dos padrões utilizados e seus respectivos tempos de retenção e absorvâncias.

Sinal	Padrão	Tempo de retenção	Abs (nm)
1	Ácido cafeico	7,56	323
2	Mangiferina	8,61	256-317-366
3	Ácido cumárico	9,96	309
4	Ácido ferúlico	10,52	322

5	Rutina	13,11	257-355
6	Ácido trans-cinâmico	16,21	276
7	Quercetina	17,23	254-370
8	Canferol	19,57	263-367
9	Pinocembrina	21,56	289
10	Crisina	23,51	267-313
11	Galangina	24,07	264-311-361

Fonte: Adaptado de CALEGARI, 2018.

Foram utilizadas 50 amostras na construção dos modelos, nas amostras em que não foi possível quantificar os compostos identificados (Apêndice), foram utilizados os valores do limite de detecção (Tabela 3). Ao todo, foram construídos 6 modelos, para os ácidos fenólicos – cumárico, ferúlico, trans-cinâmico, canferol, crisina e galangina – escolhidos pelo fato de serem identificados e quantificados em um número considerável de amostras de própolis.

Tabela 3: Limites de detecção dos ácidos fenólicos e flavonóides.

Padrão	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Ácido cumárico	0,4365
Ácido ferúlico	0,3990
Ácido trans-cinâmico	0,2970
Canferol	0,2280
Crisina	0,2318
Galangina	0,4661

Fonte: Adaptado de CALEGARI, 2018.

5.1. MODELOS ÁCIDOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDE

A construção dos modelos ocorreu para seis ácidos fenólicos, porém, apenas os modelos de três ácidos fenólicos – ácido trans-cinâmico, galangina e ácido cumárico – resultaram em figuras de mérito dentro dos valores de literatura, e possibilitando o modelo ser reprodutível. Houve a tentativa de construção com os espectros do EEPC, porém, assim como, nos resultados obtidos na iniciação científica

em Matei (2019), os modelos utilizando esses espectros resultaram em uma calibração superestimada, prejudicando a robustez do modelo construído.

Para os modelos de calibração multivariada com os padrões canferol, crisina e ácido ferúlico, os modelos não obtiveram boas figuras de mérito, podendo ser explicado, pelo fato de possuírem poucas amostras de própolis identificadas e quantificadas por CLAE em relação aos outros compostos fenólicos escolhidos.

É necessário que as amostras sejam separadas em dois grupos fundamentais para elaboração do modelo, o grupo de calibração e o grupo de validação, para isso, foi utilizado o algoritmo de Kennard & Stone (KENNARD & STONE, 1969). Os valores relacionados aos ácidos fenólicos, assim como o valor máximo, o mínimo, a média e o desvio padrão são apresentados na Tabela 4:

Tabela 4: Resultados dos ácidos fenólicos e flavonóide nas amostras de EEP.

	Dados	Unidade	Faixa	Média	Desvio Padrão
Ácido trans-cinâmico	Calibração	mg g ⁻¹	0,043 - 3,78	0,645	0,861
	Validação	mg g ⁻¹	0,074 - 4,39	0,674	1,032
Galangina	Calibração	mg g ⁻¹	0,466 - 45,95	3,880	8,232
	Validação	mg g ⁻¹	0,466 - 52,66	5,569	12,644
Ácido Cumárico	Calibração	mg g ⁻¹	0,034 - 22,80	2,928	5,008
	Validação	mg g ⁻¹	0,357 - 15,15	2,786	4,362

Fonte: Autoria própria.

É possível observar que para os modelos da galangina e do ácido cumárico, apresentaram valores altos de concentrações, podendo evidenciar a variabilidade encontrada nas amostras de própolis analisadas, não apresentando um perfil único na quantificação de ácidos fenólicos presentes. Xavier et al., (2019), identificaram ácido trans-cinâmico em amostras de própolis do nordeste brasileiro, assim como Peter et al., (2017) identificou e quantificou ácido cumárico em amostras de própolis marrom no Rio Grande do Sul. Segundo Oruc, Sorucu & Aydin (2017), em amostras analisadas de própolis, a galangina foi identificada na maioria das amostras analisadas e em maior quantidade, variando as estações do ano e a altitude onde foram coletadas.

Os espectros brutos não apresentaram diferença entre os modelos, podendo ser explicado pela forma de obtenção, e pelas amostras estarem no estado líquido, podendo ser observados na figura 10. Nos espectros brutos o que se diferencia de um modelo para outro, são os valores empregados dos limites de detecção do ácido trans-cinâmico, da galangina e do ácido cumárico.

Para a construção do modelo, foi utilizada toda a faixa espectral, compreendida entre 4000 cm^{-1} e 12000 cm^{-1} . Geralmente em amostras de própolis, as bandas espectrais correspondem ao segundo sobretons C-H, as primeiras combinações de sobretons C-H, CH_2 e CH_3 , e também aos primeiros sobretons N-H. Faixas espectrais entre 5.556 cm^{-1} e 6.000 cm^{-1} podem corresponder aos primeiros sobretons CH. Entre 5.000 cm^{-1} e 5.300 cm^{-1} as bandas representam combinações de O-H e segundo sobretons de extensão C=O (KUMAR, 2015; STUART, 2004).

A região de 4.000 a 4.500 cm^{-1} representa a combinação de moléculas, combinações de N-H, O-H, C-H + C-H e C-H + C-C. Os principais grupos fenólicos encontrados na própolis são os flavonóides e ácidos fenólicos que são caracterizados principalmente pela presença de O-H ligado ao anel aromático, também C-H, C-C, C=C, C=O e ligações C-O (OLDONI et al., 2015; CALEGARI et al., 2020).

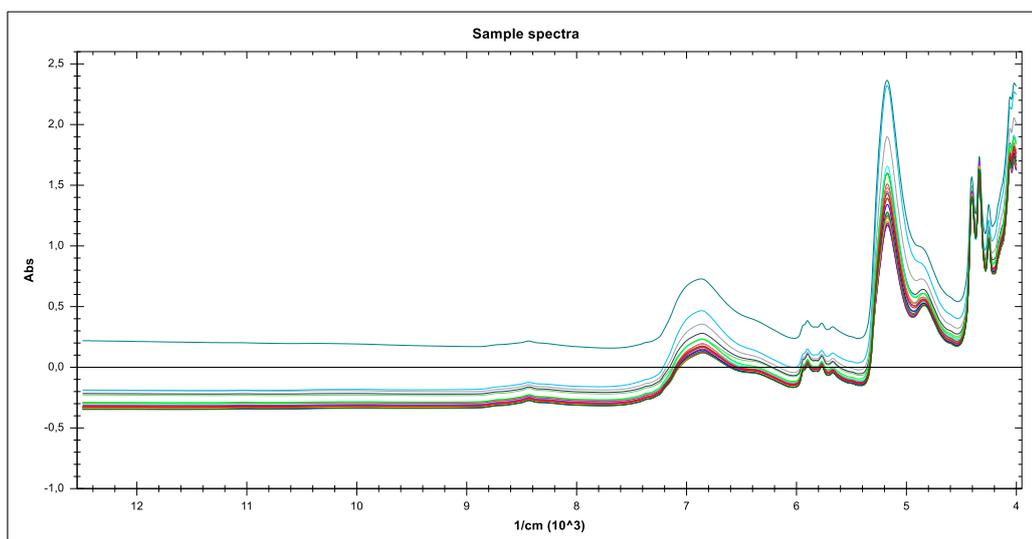


Figura 10: Espectros brutos.

Fonte: Autoria própria.

Os espectros brutos geram muitas informações, e por isso, precisaram ser processados, com diferentes pré-processamentos para cada ácido fenólico, para que fosse possível reduzir possíveis interferentes, como os ruídos, e assim melhorar a qualidade, é possível visualizar os espectros processados na Figura 11.

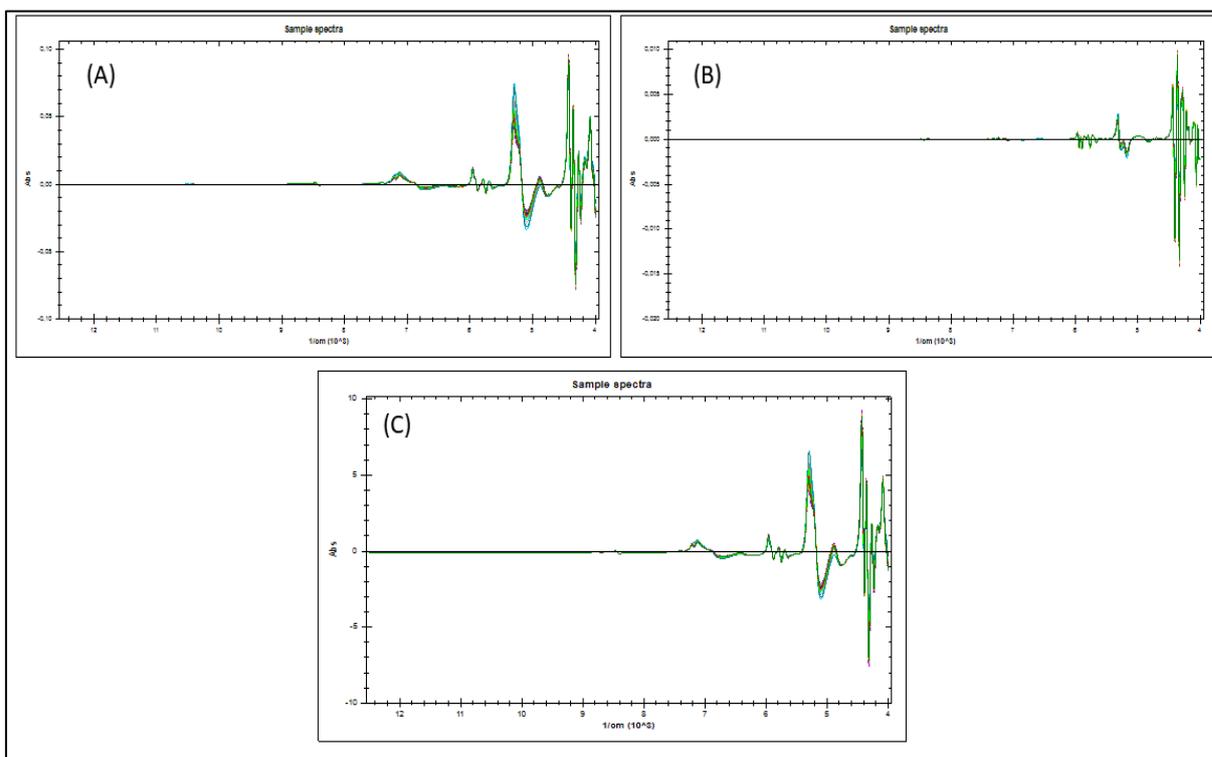


Figura 11: Espectros processados: (A) ácido trans-cinâmico; (B) galangina; (C) ácido cumárico.

Fonte: Autoria própria.

Os modelos começaram a ser construídos utilizando o software ChemoStat, empregando as ferramentas quimiométrica HCA e PCA.

É importante ressaltar que a ferramenta HCA foi empregada para a retirada de *outliers* espectrais, ou seja, os espectros em triplicata extraídos do equipamento de NIRS foram analisadas através do HCA. Através dessa interpretação, foi possível perceber quais triplicatas não apresentam o mesmo comportamento, e a subsequente retirada das mesmas. Os HCA de cada composto fenólico apresentado, foi elaborado com as médias dos espectros, obtidos após a primeira análise de *outliers*.

O emprego do HCA no modelo do ácido trans-cinâmico foi necessário principalmente para a identificação de *outliers*, a retirada destes possibilita a obtenção

de um melhor modelo, pois, em um conjunto de amostras, se existirem algumas que diferem do comportamento geral, ocasionam resultados não satisfatórios. Observando a Figura 12, é possível retirar a princípio 4 *outliers*, as amostras que não se agrupam com as demais, que seriam: 37M, 38M, 05M, 39M.

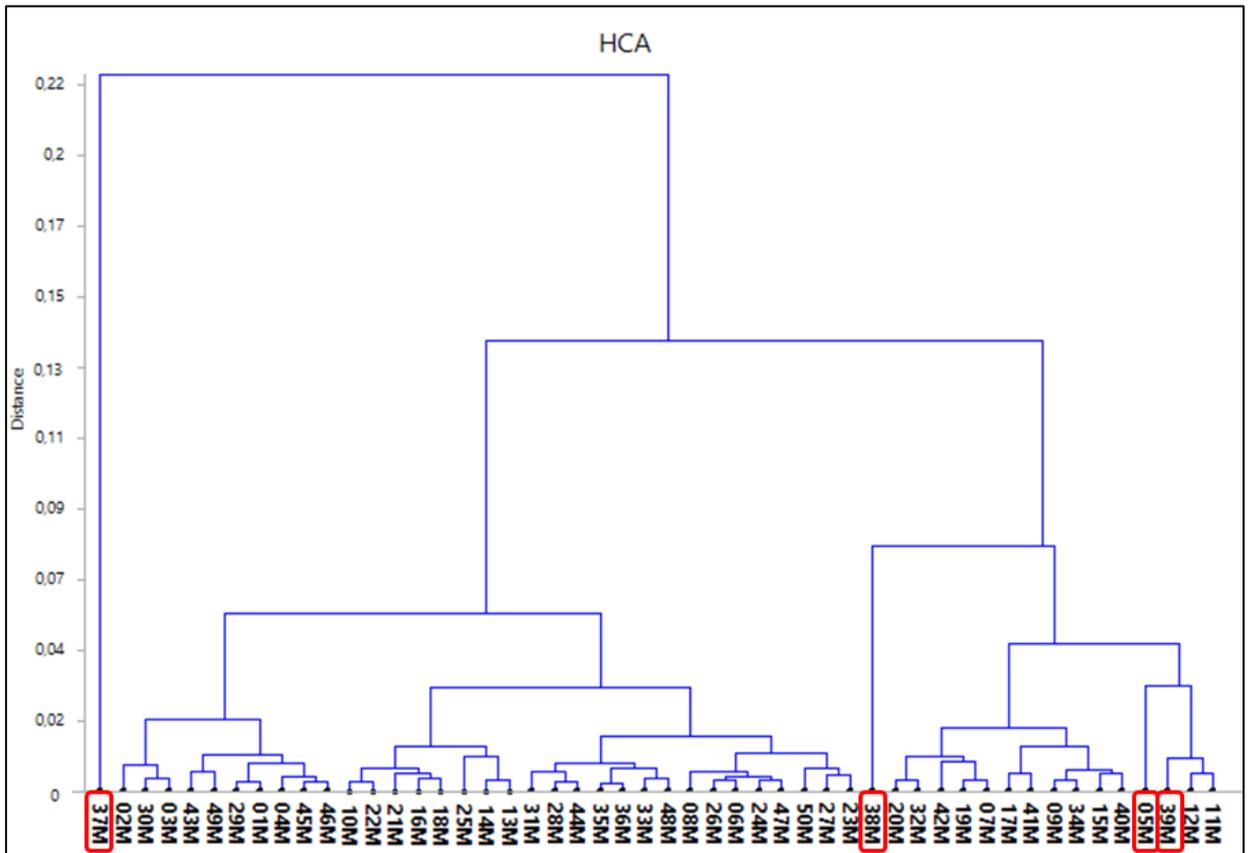


Figura 12: HCA do ácido trans-cinâmico.

Fonte: Autoria própria.

Para o modelo da galangina, foi essencial a retirada de *outliers* através do HCA, permitindo assim a eliminação das amostras: 05M, 37M, 43M, 31M, 38M, as quais afetavam o modelo negativamente. A Figura 13 demonstra a distribuição das amostras e a formação dos grupos entre elas, sendo possível observar quais amostras conversam entre si.

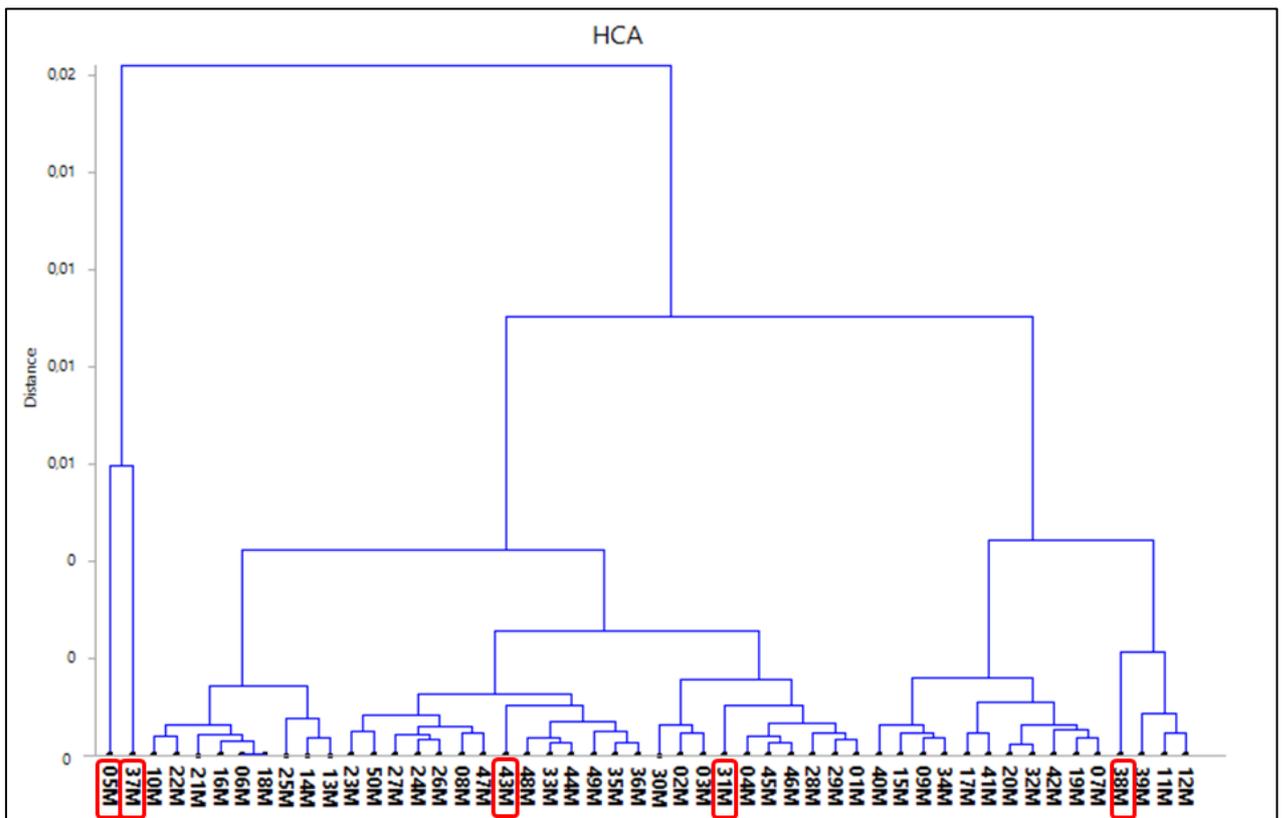


Figura 13: HCA da galangina.

Fonte: Autoria própria.

O HCA (Figura 14) para o ácido cumárico, possibilitou visualização dos grupos formados entre as amostras, e identificar os *outliers*, ou seja, as amostras que discordam das demais amostras, tais como: 37M, 38M, 05M e 39M, garantindo que esses *outliers* espectrais não afetassem o modelo.

Para os modelos construídos, foi possível perceber que os mesmos *outliers* espectrais foram retirados, nesse caso, não foram as que apresentaram concentrações mais altas, mas sim, as amostras que não se comportavam conforme as demais amostras no contexto geral.

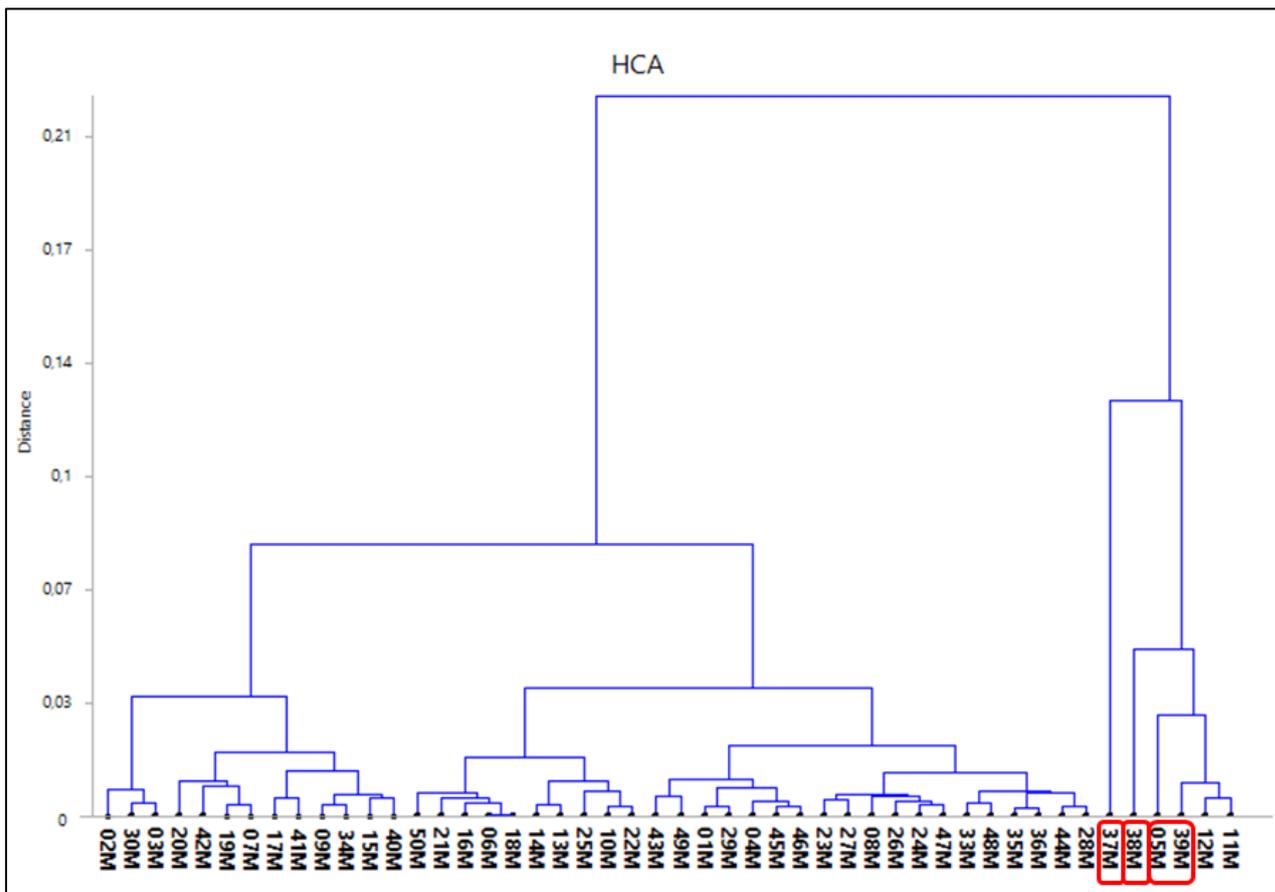


Figura 14: HCA do ácido cumárico.

Fonte: Autoria própria.

Para a determinação dos melhores pré-processamentos, foi utilizado o PCA (Figura 15), onde os valores obtidos pelas PC indicam a relação entre as amostras após o emprego do pré-processamento.

Os valores analisados para cada pré-processamento empregado para cada composto fenólico, está expresso na Tabela 5. Para cada composto, houve a tentativa de tipos de processamento diferentes, e a escolha do melhor pré-processamento a ser empregado, foi escolhido pela somatória entre os valores obtidos de PC1 e PC2.

Tabela 5: Pré-processamentos para os ácidos fenólicos e flavonóide.

Padrão	Pré-Processamento	PC1 (%)	PC2 (%)
Ácido trans-cinâmico	1ª Derivada	83,77	10,63
	1ª Derivada + SNV	70,46	6,27
	2ª Derivada	75,85	6,05

	2ª Derivada + SNV	73,24	4,89
Galangina	1ª Derivada	80,25	4,96
	1ª Derivada + SNV	76,21	5,03
	2ª Derivada	80,69	9,96
	2ª Derivada + SNV	83,78	10,92
	1ª Derivada	84,15	10,45
Ácido cumárico	1ª Derivada + SNV	79,65	10,52
	2ª Derivada	84,20	4,52
	2ª Derivada + SNV	82,56	5,21

Fonte: Autoria própria.

O modelo do ácido trans-cinâmico, empregou o PCA mostrado na Figura 15, no ChemoStat, evidenciando que nesse modelo, o melhor pré processamento foi o de primeira derivada, apresentando a melhor distribuição entre a PC1 (83,77%) e PC2 (10,63%), além da somatória dos valores encontrados na distribuição da PCA. A primeira derivada tem a função basicamente de corrigir o deslocamento da linha base na aquisição dos espectros no NIRS (FERREIRA, 2016).

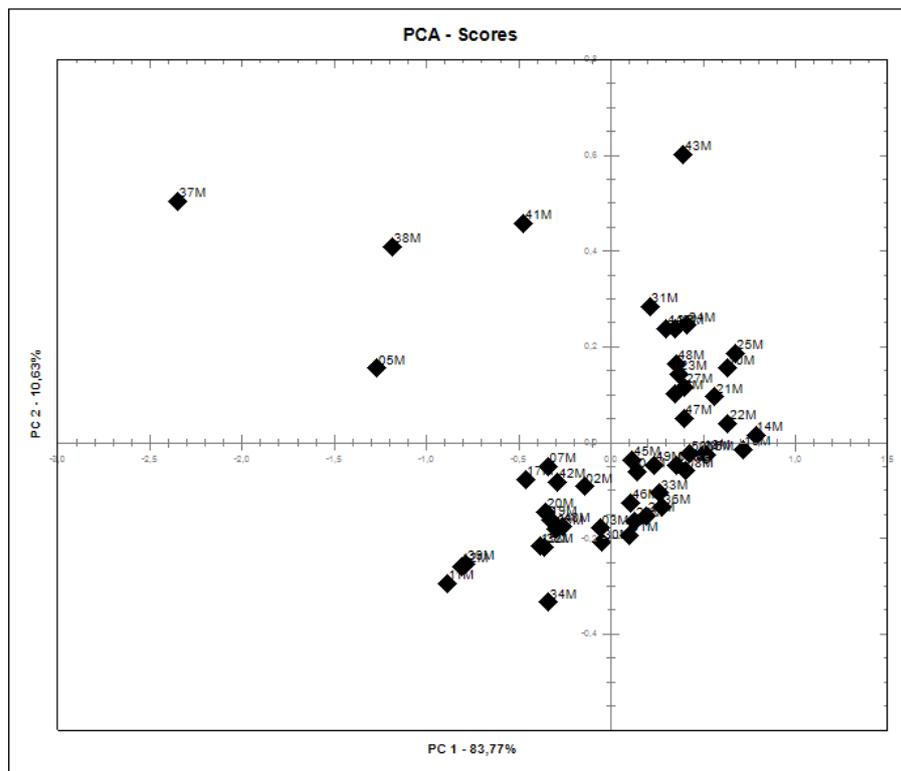


Figura 15: PCA do ácido trans-cinâmico.

Fonte: Autoria própria.

O PCA relacionado à galangina, observado na Figura 16 é capaz de definir que o pré-tratamento de segunda derivada é necessário, pela relação entre as componentes principais, PC1 (83,78%) e PC2 (10,92%), o que se difere quando comparada a tentativa de aplicação de outros pré-tratamentos. A segunda derivada é empregada quando há inclinação na linha base dos espectros, e essa variação sistemática é capaz de ser corrigida, permitindo que a linha se torne linear, sem nenhuma interferência. No *software* MatLab foi possível agregar o pré-processamento de SNV, o qual é capaz de remover interferências no espalhamento e de tamanho de partículas, melhorando os valores das figuras de mérito.

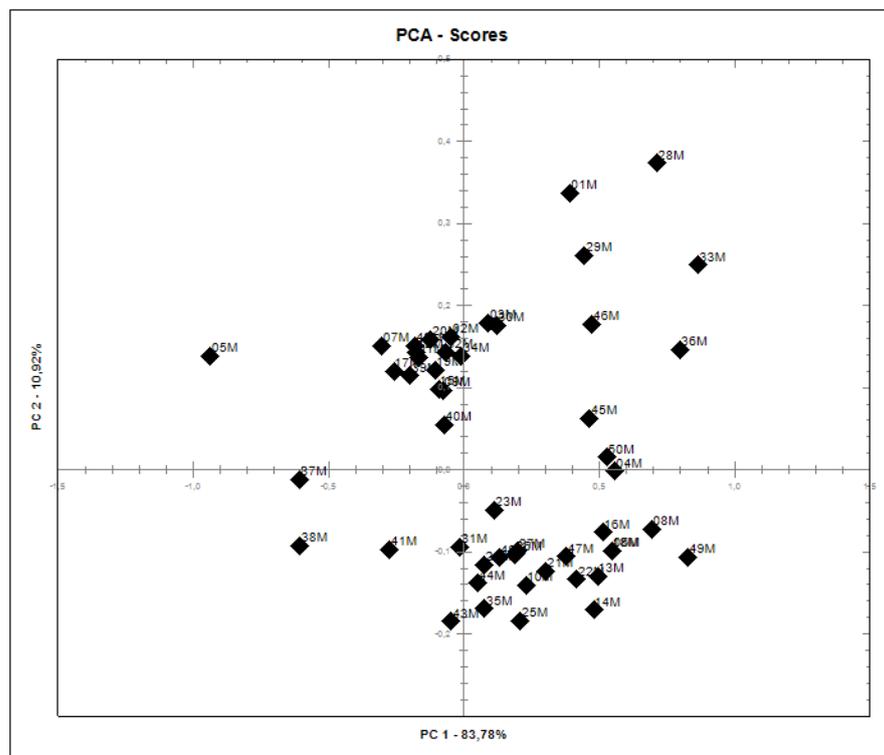


Figura 16: PCA da galangina.

Fonte: Autoria própria.

A interpretação do PCA para o ácido cumárico, apresentado na Figura 17, resultou nos valores de PC1 (84,15%) e PC2 (10,45%), onde foi possível estabelecer que o pré tratamento a ser utilizado fosse de primeira derivada, pois possibilita a correção da linha base dos espectros sem afetar os dados contidos.

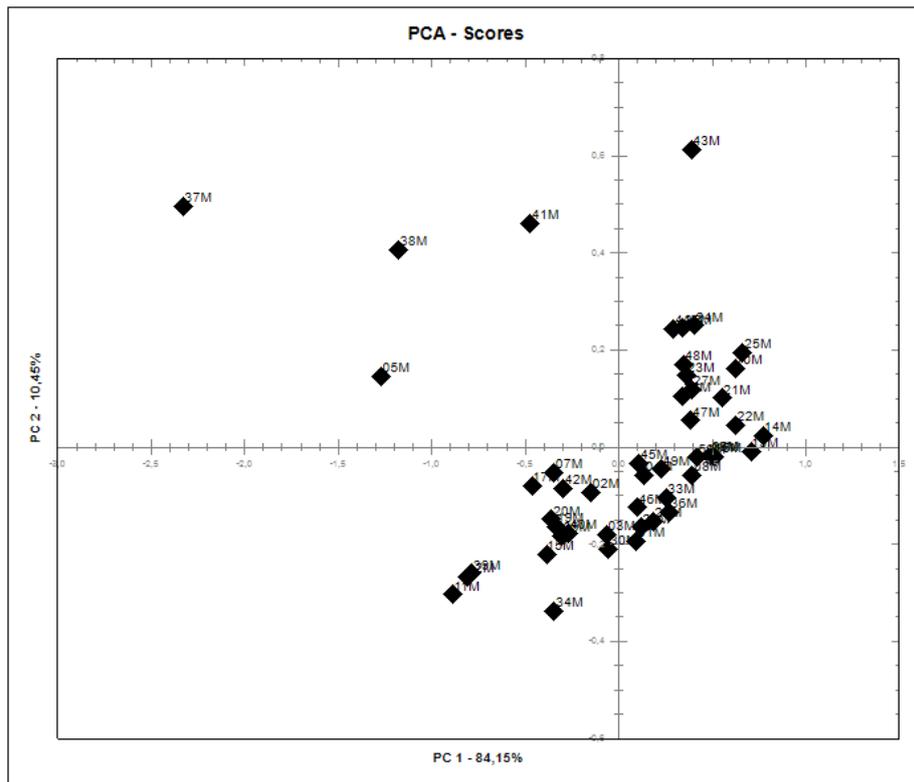


Figura 17: PCA do ácido cumárico.

Fonte: Autoria própria.

Os 3 compostos fenólicos - ácido trans-cinâmico, galangina e ácido cumárico - apresentaram modelos com valores similares das componentes principais, podendo ser explicado pelo fato de apresentar uma variabilidade similar nos respectivos espectros.

Após a eliminação dos outliers e o pré-processamento escolhido, é possível migrar para outro software, o MatLab, para fazer o uso da ferramenta quimiométrica PLS. O PLS foi escolhido pelo fato de sua alta empregabilidade, assim como ser de fácil aplicação aos dados, na elaboração do modelo. Após o MatLab processar o PLS, ainda é possível retirar outros outliers que ainda estejam afetando o modelo, assim como, aplicar pré tratamentos, além de visualizar o comportamento das amostras no contexto geral do modelo.

A Figura 18 exemplifica a correlação entre as concentrações obtidas pela quantificação dos ácidos fenólicos individuais em relação aos valores preditos pelos espectros do NIRS. Na Figura 18A, é possível observar que as amostras do ácido trans-cinâmico, apresentaram uma distribuição notável das amostras do grupo da

validação e da calibração, sendo importante o fato de que as amostras do grupo da validação (∇) englobem todas as amostras do grupo da calibração (\bullet).

Assim como a relação entre as amostras dos grupos de validação e calibração (Figura 18B), para a galangina, é de extrema importância para a qualidade do modelo, as duas retas (verde e vermelha) devem apresentar o mesmo comportamento, pois, afinal, o grupo de validação engloba amostras significativas do modelo geral, além de relacionar as concentrações encontradas através do CLAE com os espectros NIRS.

O modelo do ácido cumárico demonstrou através da Figura 18C, uma boa relação entre as amostras do grupo de validação e do grupo de calibração, assim como os outros modelos construídos, sendo possível assim, prever que as figuras de mérito apresentariam bons resultados.

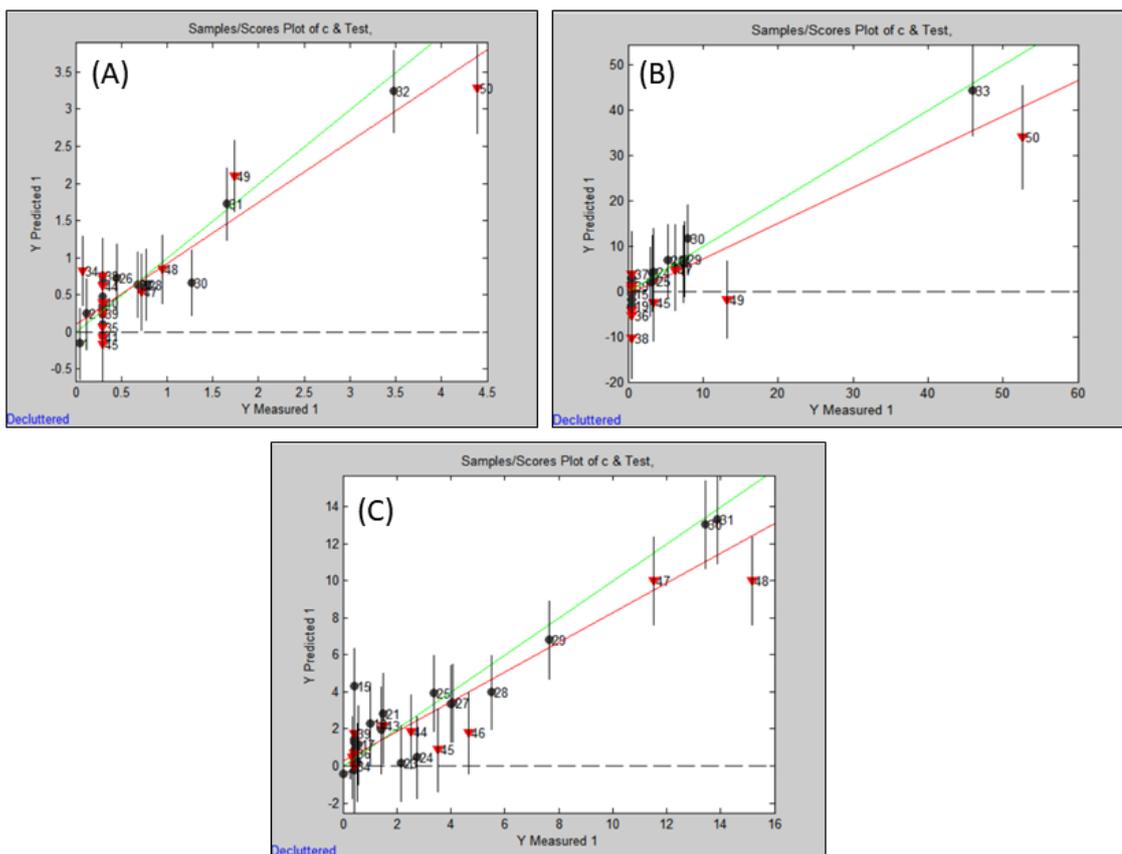


Figura 18: Y Predito (∇) x Y Medido (\bullet) dos ácidos fenólicos. (A) ácido trans-cinâmico; (B) galangina; (C) ácido cumárico.

Fonte: Autoria própria.

Através da Figura 18 é possível perceber que não houve uma distribuição uniforme nas quantificações cromatográficas dos compostos fenólicos individuais nas amostras de própolis, esse fator poderia ser amenizado, através da inserção de novas amostras com concentrações conhecidas, para amenizar e resolver esse problema analítico.

É de extrema importância ressaltar, que em todos os modelos, os dados dos grupos de validação e calibração foram centrados na média, realizado no MatLab, esse pré processamento é basicamente uma translação de eixos para o valor médio de cada um deles, a estrutura e características dos valores não sofrem nenhum tipo de alteração (FERREIRA, 2016).

Ao final da construção dos modelos para os ácidos fenólicos apresentados, foi possível obter as figuras de mérito relacionadas ao mesmo, é de extrema importância, para que o modelo seja considerado bom e reproduzível, que os valores resultantes das figuras de mérito fiquem na faixa correspondente aos valores encontrados na literatura. As figuras de mérito para os 3 modelos construídos, são observadas na Tabela 6, as mesmas apresentaram valores bons, evidenciando assim sua robustez e aplicabilidade.

Tabela 6: Figuras de mérito para os modelos dos ácidos fenólicos.

Composto Fenólico	Ácido trans-cinâmico	Galangina	Ácido Cumárico
RMSEC (mg g⁻¹)	0,224	1,71	1,15
RMSECV (mg g⁻¹)	0,437	5,43	1,99
RMSEP (mg g⁻¹)	0,476	4,89	2,15
RER	10,13	10,67	10,58
R² Calibração	0,91	0,96	0,90
R² Cross Validation	0,67	0,74	0,72
R² Predição	0,89	0,84	0,90
Variável Latente	6	7	6

Fonte: Autoria própria.

Dentre as figuras de mérito, o RER indica a utilidade prática do modelo desenvolvido, e o valor esperado deve ser superior a 10 (WILLIAMS & SOBERING, 1993), o modelo construído para a galangina apresentou maior valor de RER, quando

comparado ao modelo do ácido trans-cinâmico, com valor de RER de 10,13 e ao modelo do ácido cumárico, com valor de RER de 10,58.

O número de variável latente variou entre os modelos construídos, sendo escolhidas as quais apresentassem maior sensibilidade e a alta seletividade (PEREIRA et al., 2008). Houve variação no valor das variáveis latentes para os modelos construídos. Para o ácido trans-cinâmico e ácido cumárico, empregou 6 variáveis latentes e já para a galangina, empregou 7 variáveis latentes. As quais apresentaram menor erro de validação (RMSECV) sem superestimar a calibração (RMSEC).

É esperado que os valores obtidos para RMSECV (KUMAR, 2015) e RMSEP (CONZEN, 2006), que representam os erros envolvidos na predição do modelo sejam os mais baixos possíveis, porém para a galangina, os valores de RMSECV e RMSEP foram de $5,43 \text{ mg g}^{-1}$ e $4,89 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente, podendo ser explicado, pelo fato da faixa de concentração da galangina ser maior do que dos outros dois modelos construídos, apesar disso, os valores para os coeficientes de determinação obtidos, apresentaram valores como: R^2 calibração, de 0,96 e R^2 predição, de 0,84, sendo considerado um modelo robusto.

O ácido cumárico apresentou os valores de $1,99 \text{ mg g}^{-1}$ e $2,15 \text{ mg g}^{-1}$, para as figuras de mérito de RMSECV e RMSEP, respectivamente. Esses valores foram mais baixos e conseqüentemente melhores comparando com os valores obtidos para o modelo da galangina. Para os coeficientes de determinação, o ácido cumárico apresentou o valor de 0,90 para o R^2 de calibração e para o R^2 de predição, sendo o mais próximo de 1, proporcionando assim um modelo com alta qualidade (ELFADL et al., 2010).

Dentre os modelos construídos, o modelo que obteve melhores figuras de mérito contexto geral, foi o modelo do ácido trans-cinâmico. Apresentando os valores para RMSEC (OLIVEIRA et al., 2015), RMSECV e RMSEP, de $0,224 \text{ mg g}^{-1}$, de $0,437 \text{ mg g}^{-1}$ e $0,476 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente. Esses valores foram os mais baixos dentre os três modelos, representando assim, baixo erro na calibração e validação. Foram obtidos para os valores dos coeficientes de R^2 calibração de 0,91, e R^2 de predição de 0,89, sendo esses valores próximos a 1, favorecendo a robustez e qualidade do modelo construído.

6. AUXÍLIO AO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

O presente Trabalho de Conclusão de Curso recebeu auxílio do EDITAL 1/2019 - PROREC/PROGRAD, com um valor de 1000 reais, os quais foram gastos na compra de itens para o grupo de pesquisa: 1 micropipeta PeguePet de 1mL a 5mL, ponteiras para a micropipeta e luvas para uso no laboratório.

Assim como possibilitou a participação no evento IV Escola de Inverno de Quimiometria, do dia 20 a 23 de agosto de 2019. A apresentação do trabalho intitulado “Calibração Multivariada: Identificação de Compostos Fenólicos em Própolis” e que resultou em um aceite para publicação na edição especial da revista Journal of Chemometrics. O artigo “Multivariate calibration: Identification of phenolic compounds in PROPOLIS using FT-NIR” foi aceito em 6 de agosto de 2020 e publicado em 02 de setembro de 2020.

A empresa Breyer poderá usar os resultados obtidos para a certificação dos ácidos fenólicos presentes na própolis produzida comprovando a qualidade de seu produto comercializado no mercado nacional e internacional. Além do fato, de que a elaboração de modelos de predição robustos é de grande interesse para a indústria, pois o custo e tempo dedicado às análises tradicionais são reduzidos, facilitando a logística da empresa entre a certificação da qualidade e sua comercialização.

7. CONCLUSÕES

Foi possível comparar o teor de fenólicos individuais quantificados pela CLAE, presentes nas amostras de EEP, com os espectros obtidos através da técnica de NIRS. Além do desenvolvimento dos modelos de calibração multivariada dos ácidos fenólicos – ácido trans-cinâmico, galangina e ácido cumárico – baseando-se nas quantificações cromatográficas.

Os modelos construídos apresentaram figuras de mérito, as quais determinaram a qualidade, a robustez, a reprodutibilidade e a alta utilidade prática. O modelo que apresentou melhores figuras de mérito foi o modelo do ácido trans-cinâmico com erros de: RMSEC de $0,224 \text{ mg g}^{-1}$, RMSECV de $0,437 \text{ mg g}^{-1}$ e RMSEP de $0,476 \text{ mg g}^{-1}$; valor de RER de 10,13; e os valores obtidos para os coeficientes foram coerentes com os encontrados na literatura, R^2 calibração de 0,91, R^2 validação cruzada de 0,67 e R^2 predição de 0,84.

Baseado nos resultados e discussões, foi possível afirmar que a técnica de NIRS associada a quimiometria pode ser empregada na predição de compostos fenólicos individuais – ácido trans-cinâmico, galangina e ácido cumárico – em amostras de própolis, dos espectros obtidos através da NIRS, utilizando pré-processamentos, exclusão de *outliers*, resultando em modelos robustos e alta utilidade prática.

REFERÊNCIAS

- ASSIS, C.; PEREIRA, H. V.; AMADOR, V. S.; AUGUSTI, R.; DE OLIVEIRA, L. S.; DE SENA, M. M. Combining mid infrared spectroscopy and paper spray mass spectrometry in a data fusion model to predict the composition of coffee blends. **Food Chemistry**, v. 281, p. 71-77, 2018.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz (Impr.)**, São Paulo, v. 66, n. 1, 2007. Disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-9852007000100001&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 26 jan. 2021.
- BARCLAY, L.R.C.; VINQVIST, M.R.; MUKAI, K.; ITOH, S.; MORIMOTO, H. Chain-breaking phenolic antioxidants: steric and electronic effects in polyalkylchromanols, tocopherol analogs, hydroquinones, and superior antioxidants of the polyalkylbenzochromanol and naphthofuran class. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 58, n. 26, p. 7416–7420, 1993.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, New York, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.
- BRASIL, Ministério da Agricultura. Instrução Normativa n.3, de 19 de janeiro de 2001. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade da própolis e extrato de própolis.** Disponível em: >
<https://www.apacame.org.br/mensagemdoce/60/normas.htm><. Acesso em: 30 de maio de 2019.
- CALEGARI, M. A. Espectroscopia Na Região Do Infravermelho Próximo (NIR) E Calibração Multivariada: Desenvolvimento De Modelos PLS Para A Determinação Da Atividade Antioxidante Em Amostras De Própolis. Dissertação de Mestrado – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco, Pato Branco, 2018.

CALEGARI, M. A.; AYRES, B. B.; TONIAL, L. M. S.; ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C. Fourier transform near infrared spectroscopy as a tool for predicting antioxidant activity of propolis, **Journal of King Saud University – Science**, v. 32, n. 1, p. 787-790, 2020. DOI: 10.1016/j.jksus.2019.02.006.

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

COÛTEAUX, M.M.; SARMIENTO, L.; HERVÉ, D.; ACEVEDO, D. Determination of water-soluble and total extractable polyphenolics in biomass, necromass and decomposing plant material using near-infrared spectroscopy (NIRS). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 795-799, 2005.

CUI, Y.; WANG, Y. Z.; OUYANG, X.Y.; HAN, Y. B.; ZHU, H. B.; Chen, Q. M. Fingerprint profile of active components for *Andrographis paniculata* Nees by HPLC-DAD, **Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety**, v. 3, n. 3, p. 165–175, 2009.

DA SILVA, C.; PRASNIEWSKI, A.; CALEGARI, M. A.; DE LIMA, V. A.; OLDONI, T. L. C. Determination of total phenolic compounds and antioxidant activity of ethanolic extracts of propolis using ATR–FT-IR spectroscopy and chemometrics. **Food Analytical Methods**, p. 1-9, 2018.

DELWICHE, S.; CHEN, Y. R.; HRUSCHKA, W. Differentiation of hard red wheat by near-infrared analysis of bulk samples. **Cereal Chemistry**, v. 72, n. 3, p. 243-247, 1994.

EDFADL, E.; REINBRECHT, C.; CLAUPEIN, W. Development of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) calibration model for estimation of oil content in a worldwide safflower germplasm collection. **International Journal of Plant Protection**, v. 4, n. 4, 2010.

- FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria: Conceitos, Aplicações e Métodos**. Editora UNICAMP, São Paulo, 2015.
- GOTTFRIES, J.; BLENNOW, K.; WALLIN, A.; GOTTFRIES, C. G. Diagnosis of Dementias Using Partial Least Squares Discriminant Analysis. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v. 6, n. 2, p. 83–88, 1995.
- GRANATO, D.; SANTOS, Jâ. S.; ESCHER, G. B.; FERREIRA, B. L.; MAGGIO, Rubé. M. Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. **Trends in Food Science & Technology**, v. 72, p. 83-90, 2018.
- GÜLCIN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 3, p. 345-391, 2012.
- HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 16, p. 33–50, 1997.
- HARBORNE, J. B.; BAXTER, H.; MOSS, G. P. **Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants**, Second Edi., Taylor and Francis, London, 1999.
- HELPER, G. A.; BOCK, F.; MARDER, L.; FURTADO, J. C.; DA COSTA, A. B.; FERRÃO, M. F. ChemoStat, um software gratuito para análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 38, n. 4, p. 575-579, 2015.
- KENNARD, R.W.; STONE, L.A.; Computer aided design of experiments, **Technometrics**, v. 11, p. 137–148, 1969.

KONZEN, P. H. D. 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.

KUMAR, S. **Analytical Techniques for Natural Product Research**. CABI, 2015

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329-339, 2004.

MATEI, L. A.; CALEGARI, M. A.; LAFAY, C. B. B.; OLDONI, T. L. C. **Desenvolvimento de modelos PLS para a determinação da atividade antioxidante de própolis utilizando NIR**. (Seminário de Inovação e Iniciação Científica) Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2019.

MATEI, L. A.; LAFAY, C. B. B.; CALEGARI, M. A.; OLDONI, T. L. C. Multivariate calibration: Identification of phenolic compounds in PROPOLIS using FT-NIR. **Journal of Chemometrics**, e3296, 2020. <https://doi.org/10.1002/cem.3296>

MUSIALIK, M.; KUZMICZ, R.; PAWŁOWSKI, T. S.; LITWINIENKO, G. Acidity of hydroxyl groups: an overlooked influence on antiradical properties of flavonoids. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 7, p. 2699-2709, 2009.

MBA, O.; ADEWALE, P.; DUMONT, M. J.; NGADI, M. Application of near-infrared spectroscopy to characterize binary blends of palm and canola oils. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p. 472-478, 2014.

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

OLDONI, T. L. C.; OLIVEIRA, S. C.; ANDOLFATTO, S.; KARLING, M.; CALEGARI, M. A.; SADO, R. Y.; MAIA, F. M. C.; ALENCAR, S. M.; LIMA, V. A. Chemical Characterization and Optimization of the Extraction Process of Bioactive

Compounds from Propolis Produced by Selected Bees. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 10, p. 2054–2062, 2015.

OLIVEIRA, S. D. Determinação da capacidade antirradicalar de produtos naturais utilizando-se a quimiluminescência do luminol e ensaios fotométricos com radicais estáveis. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

OLIVEIRA, P. S., CELI, R., MÜLLER, S., FERNANDES, G., NAHUM, C. Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* (Apidae, Meliponini) E *Apis mellifera* (Apidae, Apini) da Amazônia. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1728–1732, 2012.

ORUÇ, H. H.; SORUCU, A.; ÜNAL, H. H.; LAYDIN, L. Effects of season and altitude on biological active certain phenolic compounds levels and partial standardization of propolis. **Ankara Üniversitesi Akademik Arşiv Sistemi**, v. 64, p. 13-20, 2017.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: A mature analytical technique with new perspectives – A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1026, p. 8-36, 2018.

PAULINO, N.; DANTAS, A. P.; BANKOVA, V.; LONGHI, D. T.; SCREMIN, A.; DE CASTRO, S. L. Bulgarian propolis induces analgesic and anti-inflammatory effects in mice and inhibits in vitro contraction of airway smooth muscle. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 92, n. 3, p. 307-313, 2003.

PELLATI, F.; ORLANDINI, G.; PINETTI, D.; BENVENUTIA, S. HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 5, p. 934-948, 2011.

PEREIRA, A. F. C.; PONTES, M. J. C.; NETO, F. F. G.; SANTOS, S. R. B.; GALVÃO, R. K. H.; ARAÚJO, M. C. U. NIR spectrometric determination of quality parameters

in vegetable oils using iPLS and variable selection. *Food Research International*, v. 41, n. 4, p. 341-348, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.12.013>

PÉREZ-MARÍN, D.; TORRES, I.; ENTRENAS, J. A.; VEGA, M.; SÁNCHEZ, M. T. Pre-harvest screening on-vine of spinach quality and safety using NIRS technology. ***Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy***, v. 207, p. 242–250, 2019.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE, A. P. B.; ***Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos***. São Paulo. Varela; 2005.

PETER, C. M.; PICOLI, T.; ZANI, J. L.; LATOSINSKI, G. S.; LIMA, M. D.; VARGAS, G. D.; HÜBNER, S. O.; FISCHER, G. Antiviral and virucidal activity of hydroalcoholic extracts of propolis brown, green and jataí bees (*Tetragonisca angustula*) against Bovine Herpesvirus Type-1 (BoHV-1) and Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV). ***Pesquisa Veterinária Brasileira***, v. 37, n. 7, p. 667-675, 2017.

POREP, J. U.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R.; On-line application of near infrared (NIR) spectroscopy in food production. ***Trends in Food Science and Technology***, v. 46, p. 211-230, 2015.

PUERTAS, G.; VÁZQUEZ, M. UV-VIS-NIR spectroscopy and artificial neural networks for the cholesterol quantification in egg yolk. ***Journal of Food Composition and Analysis***, v. 86, 103350, 2020.

RECH, A. M.; WEILER, F. H.; FERRÃO, M. F. Determination of Total Sugar Content in Soy-Based Drinks Using Infrared Spectroscopy and Chemometrics. ***Food Analytical Methods***, 2018.

REVILLA, I.; VIVAR-QUINTANA, A. M.; MARTÍN, I.G.; ESCUREDO, O.; SEIJO, C. The potential of near infrared spectroscopy for determining the phenolic, antioxidant,

- color and bactericide characteristics of raw propolis. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 211-217, 2017.
- RINNAN, A.; VAN DEN BERG, F.; ENGELSEN, S. B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 10, 2009.
- RODIONOVA, O. Y.; TITOVA, A. V.; DEMKIN, N. A.; BALKLOVA, K. S.; POMERANTSEV, A. L. Qualitative and quantitative analysis of counterfeit Fluconazole capsules: A non-invasive approach using NIR spectroscopy and chemometrics. **Talanta**, v. 195, p. 662-667, 2018.
- SALATINO, A.; TEIXEIRA, É. W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005.
- SÁNCHEZ, M.T., ENTRENAS, J.A., TORRES, I., VEGA, M., PÉREZ-MARÍN, D. Monitoring texture and other quality parameters in spinach plants using NIR spectroscopy. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 155, p. 446–452, 2018.
- SCHNITZLER, P.; NEUNER, A.; NOLKEMPER, S.; ZUNDEL, C.; NOWACK, H.; SENSCH, K. H.; REICHLING, J. Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 1, p. 20-28, 2010.
- SILVA, J. C.; RODRIGUES, S.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L. M. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 5, p. 1790–1795, 2012.

- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.
- SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. *Revista de Nutrição*, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.
- SOUSA, R. A.; NETO, W. B.; POPPI, R. J.; BACCAN N.; CADORE. S.; Classificação de água de coco processada e natural por meio de HCA, PCA e teores de íons metálicos determinados por ICP OES. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 654–656, 2006.
- SOUZA, A. M. D.; BREITKREITZ, M. C.; FILGUEIRAS, P. R.; ROHWEDDER, J. J. R.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte II. **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 1057-1065, 2013.
- STANIMIROVA, I.; KUBIK, A.; WALCZAK, B.; EINAX. J.W. Discrimination of biofilm samples using pattern recognition techniques. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, n. 5, p. 1273–1282, 2008.
- STUART, B.H. In: Ltd JW& S, ed. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons Ltd: Chichester; 2004.
- SULAIMAN, G. M.; AL SAMMARRAE, K. W.; AD'HIAH, A. H.; ZUCCHETTI, M.; FRAPOLLI, R.; BELLO, E.; ERBA, E.; D'INCALCI, M.; BAGNATI, R.; Chemical characterization of Iraqi propolis samples and assessing their antioxidant properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 9, p. 2415-2421, 2011.
- SUN, D.W., SUBRAMANIAN, A., RODRIGUEZ-SAONA, L. Infrared spectroscopy for food quality analysis and control. **Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control**, p. 145-178, 2009.

- SUNDBOM, E.; BODLUND, O.; HOJERBACK, T. Object relation and defensive operations in transsexuals and borderline patients as measured by the Defense Mechanism Test. **Journal Nordic Journal of Psychiatry**, v. 49, p. 379-388, 1995.
- TISTAERT, C.; DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y.V. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 690, n. 2, p. 148–161, 2011.
- VALENCIA, D.; ALDAY, E.; ROBLES-ZEPEDA, R.; GARIBAY-ESCOBAR, A.; GALVEZ-RUIZ, J. C.; SALAS-REYES, M.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; VELAZQUEZ-CONTRERAS, E.; HERNÁNDEZ, J.; VELAZQUEZ, C. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. **Food Chemistry**, v. 131, n. 2, p. 645–651, 2012.
- VELAZQUEZ, C.; NAVARRO, M.; ACOSTA, A.; ANGULO, A.; DOMINGUEZ, Z.; ROBLES, R.; ROBLES-ZEPEDA, R.; LUGO, E.; GOYCOLEA, P. M.; VELAZQUEZ, E. F.; ASTIAZARAN, H.; HERNANDEZ, J.; Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonora própolis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p.1747–1756, 2007.
- VIEGAS, T.R.; MATA, A. L. M. L.; DUARTE, M. M. L.; LIMA, K. M. G. Determination of quality attributes in wax jambu fruit using NIRS and PLS. **Food Chemistry**. V. 190, p. 1-4, 2016.
- XAVIER, J. D. A.; VALENTIM, I. B.; CAMATARI, F. O.; DE ALMEIDA, A. M.; GOULART, H. F.; FERRO, J. N. D. S.; BARRETO, E. D. O.; CAVALCANTI, B. C.; BOTTOLI, C. B. G.; GOULART, M. O. F. Polyphenol profile by UHPLC-MS/MS, anti-glycation, antioxidant and cytotoxic activities of several samples of propolis from the northeastern semi-arid region of Brazil. **Pharmaceutical biology**, v. 55, n. 1, p. 1884-1893, 2017.

- XIAOBO, Z.; JIEWEN, Z.; POVEY, M.; HOLMES, M.; HANPIN, M. Variables selection methods in near-infra red spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 667, p.14–32, 2010.
- WANG, Q.; HE, H.; LI, B.; LIN, H.; ZHANG, Y.; ZHANG, J.; WANG, Z. UV–Vis and ATR– FTIR spectroscopic investigations of postmortem interval based on the changes in rabbit plasma. **PLOS One**, v. 12, n.7, 2017.
- WATANABE, M. A. E.; AMARANTE, M. K.; CONTI, B. J.; SFORCIN, J. M. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 11, p. 1378-1386, 2011.
- WIBERG, K.; JACOBSSON, S.P.; Parallel factor analysis of HPLC-DAD data for binary mixtures of lidocaine and prilocaine with different levels of chromatographic separation. **Analytica Chimica Acta**, v. 514, p. 203–209, 2004.
- WILLIAMS, P.; NORRIS, K. **Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries**, Second Edi. 2001.
- WILLIAMS, P. C.; SOBERING, D. C. Comparison of commercial Near Infrared transmittance and reflectance instruments for analysis of whole grains and seeds. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 1, p. 25-33, 1993

APÊNDICE

Padrão		Ácido cumárico	Ácido trans-cinâmico	Galangina
Amostra	Amostras - HCA			
1CLP	04M	2,168	0,454	
2CLP	06M	15,159		7,941
4CLP	19M	2,539	0,165	3,008
5CLP	44M	0,555		
1CNS	08M	1,425		52,663
2CNS	10M	1,037		6,321
2PMP	14M	3,510	0,718	3,263
1ARP	16M	4,007	0,947	
2ARP	18M	11,531		45,951
1GCP	23M	1,281		
2GCP	07M	0,035	0,043	3,373
3GCP	09M	0,524	0,772	
4GCP	31M		0,329	
1PRP	24M	4,666		3,044
2PRP	33M	3,358		7,602
1MRP	25M	0,967		3,402
1COP	12M	0,998	0,120	
1PTP	26M	2,731	1,658	3,489
2PTP	15M	4,087		3,453
1PNP	05M	1,884		
2PNP	28M	0,357		3,155
1UVP	30M	1,511	0,679	5,373
2UVP	29M		0,075	6,327
1TBS	35M		3,482	
2TBS	45M			4,138
1CMP	45M	5,494	1,271	7,981
2CMP	46M	7,654	3,782	13,788
1STS	36M		1,735	
2STS	34M		4,391	
4FMG	11M	0,541		
8FMG	02M	1,537		14,084
9FMG	20M	13,897		8,305
1FMG	21M	22,803		13,181
1CMG	22M	1,498		7,430
5PPR	01M	2,730	1,960	
6CBA	27M		0,843	

Fonte: Adaptado de CALEGARI, 2018.

Nomenclatura amostras: 1CLP: 1-Campo Largo (PR); 2CLP: 2-Campo Largo (PR); 4CLP: 4-Campo Largo (PR); 5CLP: 5-Campo Largo (PR); 1CNS: 1-Canoinhas (SC); 2CNS: 2-Canoinhas (SC); 2PMP: 2-Palmital (PR); 1ARP: 1-Arapoti (PR); 2ARP: 2-Arapoti (PR); 1GNC: 1-General Carneiro (PR); 2GNC: 2-General Carneiro (PR); 3GNC: 3-General Carneiro (PR); 4GNC: 4-General Carneiro (PR); 1PRP: 1-Prudentópolis (PR); 2PRP: 2-Prudentópolis (PR); 1MRP: 1-Mato Rico (PR); 1COP: 1-Cruz Machado (PR); 1PTP: 1-Pitanga (PR); 2PTP: 2-Pitanga (PR); 1PNP: 1-Pinhão (PR); 2PNP: 2-Pinhão (PR); 1UVP: 1-União da Vitória (PR); 2UVP: 2-União da Vitória (PR); 1TBS: 1-Três Barras (SC); 2TBS: 2-Três Barras (SC); 1CMP: 1-Campo Magro (PR); 2CMP: 2-Campo Magro (PR); 1STS: 1-Santa Terezinha (SC); 2STS: 2-Santa Terezinha (SC); 4FMG: 4-Formiga (MG); 8FMG: 8-Formiga (MG); 9FMG: 9-Formiga (MG); 1FMG: 10-Formiga (MG); 1CMG: 11-Coluna (MG); 5PPR: 15-Pitanga (PR); 6CBA: 16-Canavieiras (BA);