

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS  
QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

MATHEUS AUGUSTO CALEGARI

**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

PATO BRANCO

2018

MATHEUS AUGUSTO CALEGARI

**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 apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de “Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos” – Área do conhecimento: Biotecnologia.

Professor Orientador: Profa. Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni

PATO BRANCO

2018

C148e Calegari, Matheus Augusto.  
Espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR) e calibração multivariada: desenvolvimento de modelos PLS para a determinação da atividade antioxidante em amostras de própolis / Matheus Augusto Calegari. -- 2018.  
147 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Pato Branco, PR, 2018.  
Bibliografia: f. 100 - 127.

1. Antioxidantes. 2. Espectroscopia de infravermelho. 3. Quimiometria. 4. Análise espectral. I. Oldoni, Tatiane Luiza Cadorin, orient. II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. III. Título.

CDD (22. ed.) 660.281

Ficha Catalográfica elaborada por  
Suélem Belmudes Cardoso CRB9/1630  
Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Câmpus Pato Branco  
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de  
Processos Químicos e Bioquímicos



---

---

## TERMO DE APROVAÇÃO Nº 63

### Título da Dissertação

**Espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR) e  
calibração multivariada: desenvolvimento de modelos PLS para a  
classificação das amostras de própolis**

### Autor

**Matheus Augusto Calegari**

Esta dissertação foi apresentada às 9h do dia 27 de fevereiro de 2018, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS – Linha de pesquisa em biotecnologia – no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. O autor foi arguido pela Banca Examinadora abaixo assinada, a qual, após deliberação, considerou o trabalho aprovado.

---

Profa. Dra. Tatiane Luiza Cadonin Oldoni  
UTFPR/PB  
Orientadora

---

Profa. Dra. Larissa Macedo dos Santos Tonial  
UTFPR/PB  
Examinadora

---

Prof. Dr. Mario Henrique Montazzolli Killner  
UEL  
Examinador

**O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do PPGTP**

Visto da Coordenação

**Prof. Dra. Cristiane Regina Budziak Parabocz**  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em  
Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – PPGTP

Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas.

Muito conhecimento, que se sintam humildes.

DA VINCI, Leonardo

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus por ter me concedido saúde e força no caminho em que trilhei até a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais Celso Calegari e Izabel Cristina Calegari por todo amor, carinho, educação que tem me dado em todas as etapas de minha vida, por não medirem esforços para me ajudar em qualquer adversidade, por sempre acreditarem em mim e guiar meu caminho. Gostaria de agradecer as minhas queridas irmãs Gabrielle Cristina Calegari e Marcelle Luiza Calegari por sempre estarem ao meu lado, me ajudando e me incentivando ao longo da vida. Às minhas avós Ermelinda Bassani e Juleide Calegari por todas as orações, amor e carinho, e a todos os meus familiares por acreditarem em meu trabalho.

À minha doce namorada Jhennifer Lais Semler por todo o companheirismo, amor, cuidado, carinho... sem você não teria chegado ao final deste trabalho. Obrigado por me ajudar, me apoiar, me acalmar e incentivar e principalmente por acreditar em meus sonhos. À meu sogro Otávio Semler e minha sogra Denilde Arizi Semler por todo o incentivo e cuidado.

Não poderia deixar de agradecer a minha orientadora professora Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni, por ter depositado sua confiança para que eu realizasse este trabalho. Obrigado professora por sua amizade em todos os anos em que passamos juntos, por suas palavras de apoio e carinho, obrigado por sua paciência em me ensinar a trilhar o caminho da ciência.

À professora Dra. Larissa Macedo Tonial por toda sua amizade e incentivo em todos os anos que nos conhecemos, obrigado por todos os seus ensinamentos, vou guarda-los sempre em minha memória. A realização deste trabalho não seria completo sem você. Ao professor Dr. Mario Henrique Montazzolli Killner da UEL por todas suas contribuições e ajuda para com o trabalho. Gostaria de agradecer em especial ao professor Dr. Davi Costa Silva por ter em 2011 me ajudado em meus primeiros passos no laboratório e na pesquisa, por ter acreditado em meu potencial. Obrigado professor. À empresa Breyer & Cia Ltda por ter fornecido todas as amostras de própolis deste trabalho. Gostaria de agradecer também ao professor Dr. Severino Matias de Alencar e todo o grupo de pesquisa em própolis por suas sugestões ao trabalho.

À todos os professores do PPGTP e do curso de Química, por suas amizades e palavras de conforto. Em especial ao professor Dr. Márcio Barreto Rodrigues, professora Dra. Cristiane Regina Budziak Parabocz, a professora Dra. Vidianny Queiroz, à professora Dra. Patrícia Teixeira Marques, professora Dra. Sirlei Dias Teixeira, e a secretária do PPGTP Neide por toda sua ajuda e paciência. Em especial a minhas amigas Mariéli Karling e Nathalie Merlin por todos os anos de amizade, momentos de alegrias, palavras de conforto, incentivo, ensinamentos e principalmente por sempre acreditarem em mim. Que bom que a vida uniu nossos caminhos.

À meus amigos de longa data, companheiros em todos os momentos Aline Savi, Roberto de Moura, Diego Henrique da Silva e Aline Roncatti (e pequena Lorena), obrigado por me ajudarem sempre a trilhar meu caminho. A todos os meus colegas de mestrado, em especial à Lilian Daiana Hauptenthal, Silvia Barbosa Pecin, Maria Fernanda Ribas, Maiara Mitiko Taniguchi, Tiago Favero, Guilherme Holub Camargo, Fatima Soares Bonadimann, Renata Deda Mendonça Ferreira, Anaclara Prasniewski, Thariane Carvalho Bicas, Anna Paulla Simon e Carlise Hannel Ferreira, Michel Da Silva Fonseca e a Andressa Pilonetto por todas suas palavras de apoio, incentivo e amizade. A meus amigos Renan Augusto Weschenfelder Tavares, Renato Vedana de Moura, Bruno Fávero, Roberta Roncatti, Andressa de Rossi, Bruno Ayres, Cleidiane da Silva, Juliane Dorta, Claudio Henrique Dias, Jefferson Gemelli e Henrique Muniz. Obrigado também a todos os amigos que esqueci de mencionar. À meu amigo e professor Dionatan Cieslak por toda sua amizade, palavras de incentivo e apoio. Aos meus grandes amigos Matheus Librelato e Renata Pozza por suas amizades e momentos de alegria.

À Central de Análises da UTFPR – PR sua responsável técnica Cíntia Boeira Batista Lafay, e seus estagiários pelo apoio e ajuda em todos os momentos. Ao laboratório LAQUA e todos seus integrantes. Ao professor Américo Wagner Júnior e ao Juliano Zanela do laboratório de Fisiologia da UTFPR campus Dois Vizinhos, obrigado por terem cedido espaço para que eu pudesse tratar de minhas amostras.

Às responsáveis pela limpeza dos laboratórios tia Jô e Janete, obrigado por manterem os laboratórios sempre limpos e organizados, e obrigado principalmente por todos os momentos de alegrias e conversas que passamos no laboratório e por acreditarem e sempre torcerem por mim.

À CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

## RESUMO

CALEGARI, Matheus Augusto. **Espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR) e calibração multivariada: desenvolvimento de modelos PLS para a determinação da atividade antioxidante em amostras de própolis.** 2018. 147 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2018.

A própolis começou a ganhar popularidade devido ao seu uso na medicina complementar e alternativa e atualmente tem se destacado entre pesquisadores, devido apresentar propriedades biológicas e farmacológicas, tais como os antitumorais, antimicrobiana, antisséptica anti-inflamatória, antioxidante, cicatrizante e anestésica. A composição química da própolis varia de acordo com as características da vegetação e localização onde estão inseridas as colmeias, sendo composta usualmente de resina, bálsamo vegetal, cera, óleos essenciais, pólen e outras substâncias tais como os flavonoides, os ácidos fenólicos, os ésteres e as cetonas. Desta maneira o objetivo deste trabalho foi determinar a atividade antioxidante dos extratos de própolis pelos métodos de captura dos radicais livres ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-ácido sulfônico), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina) e redução do  $Fe^{+3}$  a  $Fe^{+2}$  (FRAP), determinar o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais dos extratos de própolis por meio de análises espectrofotométricas e em paralelo obter os espectros de NIR para desenvolver modelos de calibração multivariada utilizando PLS e pré-tratamentos espectrais que possuam a capacidade de predizer a atividade antioxidante e composição química de amostras de própolis. Como etapa final, foi otimizada uma metodologia analítica por CLAE-DAD para a identificação de ácidos fenólicos e flavonoides nos extratos de própolis. Por meio da técnica de infravermelho próximo (NIR) foi possível desenvolver modelos de calibração multivariada para a própolis bruta, macerada, extrato etanólico de própolis e extrato etanólico de própolis concentrado. Por meio da regressão de PLS associado à pré-tratamentos espectrais, foi possível gerar modelos eficientes em predizer a atividade antioxidante de amostras de própolis, com base nos valores de  $R^2$ , RMSEC, RMSECV, RMSEP, RMSEE, RPD, RER e

número de variáveis latentes. A partir da técnica de CLAE-DAD foi possível otimizar uma metodologia cromatográfica com bons valores para os parâmetros de qualidade avaliados: seletividade, resolução, linearidade, LD, LQ e precisão.

**Palavras-chave:** Perfil químico. Atividade antioxidante. CLAE-DAD. Quimiometria.

## ABSTRACT

CALEGARI, Matheus Augusto. **Near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate calibration: development of PLS models for the determination of antioxidant activity in propolis samples.** 2018. 147 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2018.

Propolis began to gain popularity due to its use in complementary and alternative medicine and has now stood out among researchers due to its biological and pharmacological properties such as antitumor, antimicrobial, anti-inflammatory antiseptic, healing antioxidant and anesthetic. The chemical composition of propolis varies according to the characteristics of the vegetation and the location where the hives are inserted, usually consisting of resin, vegetable balsam, wax, essential oils, pollen and other substances such as flavonoids, phenolic acids, esters and the ketones. The objective of this work was to determine the antioxidant activity of propolis extracts by the free radical capture methods ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolin) -6-sulphonic acid), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine) and a reduction of Fe<sup>+3</sup> to Fe<sup>+2</sup> (FRAP), to determine the total phenolic and flavonoid content of propolis extracts by means of spectrophotometric analyzes and to obtain the NIR spectra for to develop multivariate calibration models using PLS and spectral pre-treatments that have the capacity to predict the antioxidant activity and chemical composition of propolis samples. As a final step, an analytical methodology by HPLC-PDA for the identification of phenolic acids and flavonoids in propolis extracts was optimized. It was possible to develop multivariate calibration models using PLS regression associated with spectral pre-treatments. These models were efficient for predicting the antioxidant activity and chemical composition of propolis samples, based on R<sup>2</sup>, RMSEC, RMSECV, RMSEP, RMSEE, RPD, RER and number of latent variables. From the CLAE-DAD technique it was possible to optimize a chromatographic methodology with good values for the quality parameters. The condition of the developed method was: flow 1 mL min<sup>-1</sup>, column temperature 30 ° C, mobile phase composition: (A) H<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (99,8:0,2 v v<sup>-1</sup>); (B) CH<sub>3</sub>OH (100%) with gradient starting with 30% B, in 15 min 64% B, 11 min 75% B, 2 min 95% B, 1 min

95% B, 3 min 30% of B and finally 10 min in 30% of B, totaling 42 min of analysis, to quantify caffeic acid, ferulic acid, p-coumaric acid, trans cinnamic acid, rutin, quercetin, pinocembrina, chrysin, canferol, mangiferin and galangin. It was possible to verify that the samples that presented higher values for the antioxidant activities were those that presented richer chromatographic profiles with more intense signals.

**Keywords:** Chemical profile. Antioxidant activity. HPLC- PDA. Chemometrics

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos (A) e hidroxicinâmicos (B) .....	32
Figura 2 - Estrutura química dos flavonoides .....	33
Figura 3 - Características estruturais dos flavonoides conferindo máxima atividade antioxidante (fórmula estrutural da quercetina) .....	34
Figura 4 - Reação entre o radical livre DPPH e um antioxidante para a formação do DPPH .....	35
Figura 5 - Oxidação do ABTS com persulfato de potássio para a geração do radical ABTS <sup>•+</sup> .....	36
Figura 6 - Reação do radical ABTS com um antioxidante (AOH).....	36
Figura 7 - Reação do complexo de Fe <sup>3+</sup> -TPTZ para Fe <sup>2+</sup> -TPTZ .....	37
Figura 8 - Reação do ácido gálico com molibdênio VI .....	38
Figura 9 - Reação entre um flavonoide e Al(III) .....	39
Figura 10 - Localização geográfica das cidades de origem das amostras de própolis .....	47
Figura 11 – Imagens digitais das amostras de própolis bruta analisadas .....	49
Figura 12 - Fluxograma do processo de obtenção dos extratos de própolis .....	50
Figura 13 – Espectros de NIRS própolis macerada sem pré-processamento (toda região) .....	64
Figura 14 - Espectros de NIRS própolis macerada sem pré-processamento (região selecionada) .....	64
Figura 15 - Espectros de NIRS própolis macerada com SG + COE (toda região) ....	64
Figura 16 - Espectros de NIRS própolis macerada com SG + COE (região selecionada) .....	64
Figura 17 - <i>Prediction vs True (Validation Cross)</i> R <sup>2</sup> : 0,87 .....	65
Figura 18 - <i>Fit vs True (Calibration)</i> R <sup>2</sup> : 0,95 .....	65
Figura 19 - <i>Prediction vs True (Validation Test Set)</i> R <sup>2</sup> : 0,89 .....	65
Figura 20 - Espectros de NIRS própolis macerada sem pré-processamento (toda região) .....	68
Figura 21 - Espectros de NIRS própolis macerada sem pré-processamento (região selecionada) .....	68

Figura 22 - Espectros de NIRS própolis macerada com SG + 1D + MSC (toda região)	68
Figura 23 - Espectros de NIRS própolis macerada com SG + 1D + MSC (região selecionada)	68
Figura 24 - <i>Prediction vs True (Validation Cross)</i> R <sup>2</sup> : 0,81	69
Figura 25 - <i>Fit vs True (Calibration)</i> R <sup>2</sup> : 0,92	69
Figura 26 - <i>Prediction vs True (Validation Test Set)</i> R <sup>2</sup> : 0,89	69
Figura 27 - Espectros de NIRS própolis macerada sem pré-processamento (toda região)	72
Figura 28 - Espectros de NIRS própolis macerada sem pré-processamento (região selecionada)	72
Figura 29 - Espectros de NIRS própolis macerada com SG + 1D (toda região)	72
Figura 30 - Espectros de NIRS própolis macerada com SG + 1D (região selecionada)	72
Figura 31 - <i>Prediction vs True (Validation Cross)</i> R <sup>2</sup> : 0,90	72
Figura 32 - <i>Fit vs True (Calibration)</i> R <sup>2</sup> : 0,95	72
Figura 33 - <i>Prediction vs True (Validation Test Set)</i> R <sup>2</sup> : 0,88	72
Figura 34 - Espectros de NIRS própolis bruta sem pré-processamento (toda região)	76
Figura 35 - Espectros de NIRS própolis bruta sem pré-processamento (região selecionada)	76
Figura 36 - Espectros de NIRS própolis bruta com SG + COE (toda região)	76
Figura 37 - Espectros de NIRS própolis bruta com SG + COE (região selecionada)	76
Figura 38 - <i>Prediction vs True (Validation Cross)</i> R <sup>2</sup> : 0,80	76
Figura 39 - <i>Fit vs True (Calibration)</i> R <sup>2</sup> : 0,96	76
Figura 40 - <i>Prediction vs True (Validation Test Set)</i> R <sup>2</sup> : 0,93	76
Figura 41 - Espectros de NIRS para EEP sem pré-processamento (toda região)	80
Figura 42 - Espectros de NIRS para EEP sem pré-processamento (região selecionada)	80
Figura 43 - Espectros de NIRS para EEP com 2D (toda região)	80
Figura 44 - Espectros de NIRS para EEP com 2D (região selecionada)	80
Figura 45 - <i>Prediction vs True (Validation Cross)</i> R <sup>2</sup> : 0,88	80
Figura 46 - <i>Fit vs True (Calibration)</i> R <sup>2</sup> : 0,92	80
Figura 47 - <i>Prediction vs True (Validation Test Set)</i> R <sup>2</sup> : 0,86	80

Figura 48 – Gráfico de (a) <i>scores</i> (b) <i>loadings</i> da ACP para todas as análises de bancada.....	81
Figura 50 - Gráfico de ACP para espectros de própolis bruta.....	82
Figura 51 - Gráfico de ACP para espectros de própolis macerada .....	83
Figura 52 - Gráfico de ACP para espectros de EEP e EEPC.....	84
Figura 53 – Cromatograma da mistura de padrões.....	89
Figura 54 - Absorbância dos padrões utilizados na mistura de padrões.....	90
Figura 55 - Perfil cromatográfico da amostra 2 - CLP .....	95
Figura 56 - Perfil cromatográfico da amostra 2 - ARP.....	96
Figura 57 - Perfil cromatográfico da amostra 1 - CNS.....	97
Figura 58 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para FRAP de própolis bruta .....	128
Figura 59 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para FRAP de própolis macerada .....	129
Figura 60 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para FRAP de EEP.....	130
Figura 61 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para FRAP de EEPC .....	131
Figura 62 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para ABTS de própolis bruta .....	132
Figura 63 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para ABTS de própolis macerada.....	133
Figura 64 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para ABTS de EEP.....	134
Figura 65 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para ABTS de EEPC .....	135
Figura 66 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para fenólicos de própolis bruta.....	136
Figura 67 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para fenólicos de própolis macerada.....	137
Figura 68 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para fenólicos de EEP .....	138
Figura 69 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para fenólicos de EEPC .....	139

Figura 70 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para DPPH de própolis bruta.....	140
Figura 71 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para DPPH de própolis macerada.....	141
Figura 72 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para DPPH de EEP .....	142
Figura 73 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para DPPH de EEPC.....	143
Figura 74 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para flavonoides de própolis bruta.....	144
Figura 75 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para flavonoides de própolis macerada.....	145
Figura 76 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para flavonoides de EEP .....	146
Figura 77 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para flavonoides de EEPC.....	147

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos compostos fenólicos .....	31
Tabela 2 - Radicais R1 e R2 e suas respectivas moléculas para os ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos. ....	32
Tabela 3 - Radicais e suas respectivas moléculas derivadas dos flavonoides.....	33
Tabela 4 - Parâmetros de qualidade dos modelos de NIRS.....	46
Tabela 5 - Amostras de própolis, cidades e códigos .....	48
Tabela 6 - Dados das análises de referencia .....	56
Tabela 7 - Dados da literatura para TFT e TCFT .....	57
Tabela 8 - Dados da literatura para DPPH e ABTS.....	58
Tabela 9 - Dados da literatura para FRAP .....	58
Tabela 10 - Comparação de modelos PLS para a análise de FRAP.....	61
Tabela 11 - Resultados de calibração e validação para o modelo de FRAP .....	63
Tabela 12 - Comparação de modelos PLS para a análise de ABTS.....	66
Tabela 13 - Resultados de calibração e validação para o modelo de ABTS .....	68
Tabela 14 - Comparação de modelos PLS para a análise de fenólicos .....	70
Tabela 15 - Resultados de calibração e validação para o modelo fenólicos .....	71
Tabela 16 - Comparação de modelos PLS para a análise de captura do radical DPPH .....	74
Tabela 17 - Resultados de calibração e validação para o modelo de DPPH .....	75
Tabela 18 - Comparação de modelos PLS para a análise de Flavonoides .....	78
Tabela 19 - Resultados de calibração e validação para o modelo de flavonoides ....	79
Tabela 20 - Métodos de CLAE- DAD desenvolvidos.....	85
Tabela 21 - Tempos de retenção e seletividade dos métodos .....	87
Tabela 22 - Valores de resolução (Rs) para o método 8 .....	88
Tabela 23 - Absorção da mistura de padrões.....	90
Tabela 24 - R <sup>2</sup> e r <sup>2</sup> dos padrões .....	91
Tabela 25 - LD e LQ dos padrões .....	92
Tabela 26 - Coeficientes de variação dos padrões .....	93
Tabela 27 - Quantificação dos padrões presentes nas 33 amostras de própolis .....	94

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D	Pré-processamento primeira derivada
2D	Pré-processamento segunda derivada
Abs	Absorbância
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ACP	Análise de Componentes Principais
Al	Alumínio
AOH	Antioxidante
CH <sub>3</sub> OH	Metanol
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos
COE	Pré-processamento Constant Offset Elimination (Eliminação de Compensação Constante)
CV	Coefficiente de variação
d.p.	Desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EEP	Extrato etanólico de própolis
EEPC	Extrato etanólico de própolis concentrada ou extrato concentrado de própolis
Fe	Ferro
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power (poder antioxidante de redução do ferro)
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido fosfórico
HAT	Hydrogen Atom Transfer (Transferência de átomos de hidrogênio)
HCA	Hierarchical cluster analysis (análise hierárquica de Cluster)
k	10 <sup>3</sup> = 1000
K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	Persulfato de potássio
KNN	k-nearest neighbor classification (K-vizinhos Mais Próximos)
L ou VL	Número de variáveis latentes
mg EAG g <sup>-1</sup>	miligrama equivalente a ácido gálico por grama de própolis bruta
mg EQ g <sup>-1</sup>	Miligrama Equivalente a quercetina por grama de própolis bruta
MID	Mid-infrared (infravermelho médio)
MLR	Multiple Linear Regression (Regressão Linear Múltipla)
MSC	Pré-processamento Multiplicative Scatter Correction (Correção do Espalhamento Multiplicativo)
NIR	Near InfraRed (infravermelho próximo)
NIRS	Near InfraRed Spectroscopy (espectroscopia no infravermelho próximo)
nm	nanômetro
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Principal component regression (Regressão de Componentes Principais)
PLS	Partial Least Squares (Regressão por Mínimos Quadrados Parciais)

R <sup>2</sup>	Coeficiente de determinação
r <sup>2</sup>	Coeficiente de correlação
RAW	Modelo sem pré-processamento
RER	Range error ratio (taxa de alcance de erro)
RMSEC	Root mean square error of calibration (erro médio quadrático de calibração)
RMSECV	Root mean square error of cross validation (erro quadrático médio da validação cruzada)
RMSEE	Root mean square error of estimation (raiz do erro quadrático médio da estimativa)
RMSEP	Root mean square error of prediction (erro médio quadrático de previsão)
RPD	Residual prediction deviation (desvio de predição residual)
Rs	resolução
SEC	Standard error of calibration (erro padrão de calibração)
SEP	Standard error of performance (erro padrão de desempenho)
SET	Single Electron Transfer (Transferência simples de elétron)
SG	Pré-processamento Savitzky–Golay
SNV	Pré-processamento Standard Normal Variate (Variável Normal Padrão)
TCFT	Teor de compostos fenólicos totais
TFT	Teor de flavonoides totais
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
Vs	Versus (contra)
α	Seletividade
λ	Comprimento de onda

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>24</b>
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1 Abelhas</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2 Apicultura no Brasil</b> .....	<b>27</b>
<b>3.3 Própolis</b> .....	<b>28</b>
<b>3.4 Atividade antioxidante</b> .....	<b>30</b>
3.4.1 Compostos Fenólicos .....	30
3.4.2 Flavonoides .....	32
3.4.3 Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> .....	34
<b>3.5 Técnicas instrumentais de análise</b> .....	<b>39</b>
3.5.1 NIRS.....	40
<b>3.6 Quimiometria e a análise multivariada</b> .....	<b>42</b>
3.6.1 Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) .....	42
3.6.2 Pré-tratamento Espectral.....	44
3.6.3 Validação.....	45
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>47</b>
<b>4.1 Coleta e preparo das amostras</b> .....	<b>47</b>
<b>4.2 Preparo do Extrato Etanólico de Própolis (EEP) e Extrato Etanólico de Própolis Concentrado (EEPC)</b> .....	<b>49</b>
<b>4.3 Atividade antioxidante utilizando o método de sequestro do radical ABTS</b> 50	
<b>4.4 Atividade antioxidante utilizando o método de sequestro do radical DPPH</b> 51	
<b>4.5 Atividade antioxidante utilizando o método de redução do ferro (FRAP) ....</b> 51	
<b>4.6 Teor de compostos fenólicos totais (TCFT)</b> .....	<b>51</b>
<b>4.7 Teor de flavonoides totais (TFT)</b> .....	<b>52</b>
<b>4.8 Análise de componentes principais (ACP)</b> .....	<b>52</b>
<b>4.9 NIRS</b> .....	<b>53</b>
<b>4.10 Análise por CLAE-DAD</b> .....	<b>53</b>
<b>4.11 Validação de métodos analíticos e cromatográficos</b> .....	<b>54</b>

4.11.1 Linearidade.....	54
4.11.2 LD e LQ .....	54
4.11.3 Precisão .....	55
4.11.4 Seletividade.....	55
4.11.5 Resolução (Rs).....	55
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>5.1 Teor de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante .....</b>	<b>56</b>
<b>5.2 Espectros NIRS.....</b>	<b>58</b>
<b>5.3 Desenvolvimento dos modelos de calibração e validação.....</b>	<b>59</b>
5.3.1 Modelos gerados para o método de redução do Ferro (FRAP).....	60
5.3.2 Modelos para ABTS .....	65
5.3.3 Modelos para Fenólicos .....	69
5.3.4 Modelos para DPPH.....	73
5.3.5 Modelos para Flavonoides .....	77
<b>5.4 Resultados ACP.....</b>	<b>80</b>
<b>5.5 Otimização e validação da metodologia analítica por CLAE-DAD .....</b>	<b>84</b>
5.5.1 Seletividade do método desenvolvido .....	85
5.5.2 Resolução do método desenvolvido.....	88
5.5.3 Linearidade do método desenvolvido.....	90
5.5.4 LD e LQ do método desenvolvido .....	91
5.5.5 Precisão do método desenvolvido.....	92
<b>5.6 Identificação e quantificação de ácidos fenólicos e flavonoides nas amostras de própolis .....</b>	<b>93</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>99</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>100</b>
<b>APENDICE 1 .....</b>	<b>128</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As abelhas convivem com os seres humanos desde os primeiros homínídeos e os maiores benefícios que apresentam é prover a polinização da vegetação natural (MICHENER, 2000). Diversas culturas dependem da polinização das abelhas (VAN'T LEVEN et al., 2005), o que garante a biodiversidade dos ecossistemas e a produção agrícola mundial por esses pequenos insetos (MICHENER, 2000; WINFREE et al., 2011). Além da polinização, as abelhas produzem diversos produtos, como o mel, a própolis, a geleia real, a cera e a apitoxina (veneno de abelha) (COULIBALY et al., 2016; MADRAS-MAJEWSKA; MAJEWSKI, 2016).

A criação de abelhas é conhecida como apicultura e diversas famílias de agricultores têm nessa prática a sua principal fonte de renda (JOLLIVET, 1994; PEREIRA et al., 2016; LOPES et al., 2016). Por apresentar um amplo espaço territorial, o Brasil possui grande diversidade em sua flora e clima, permitindo que os produtores obtenham os derivados apícolas durante todo o ano. Além da elevada produtividade, os produtos brasileiros apresentam reconhecido potencial biológico, o que torna o país um dos maiores exportadores de mel e própolis do mundo (MARCHINI, 2004; LOPES et al., 2016; ABEMEL, 2016).

Até a década de 80 a própolis era vista pelos apicultores como um produto indesejado, pois, não apresentava valor comercial. Começou a ganhar popularidade devido ao seu uso na medicina complementar e alternativa (SALATINO et al., 2005) por ser um produto apícola com potencial biológico muito alto. A composição química da própolis varia de acordo com as características da vegetação e localização onde estão inseridas as colmeias (BANKOVA; DE CASTRO; MARCUCCI, 2000; KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004) e normalmente contém resina, bálsamo vegetal, cera, óleos essenciais, pólen e outras substâncias (BARTH, 2004; SALATINO et al., 2005; JUNIOR et al., 2006) tais como os flavonoides (CABRAL et al., 2009), os ácidos fenólicos, os ésteres (PARK et al., 2002) e as cetonas (CASTALDO; CAPASSO, 2002).

Atualmente, a própolis tem se destacado entre pesquisadores, por apresentar propriedades biológicas e farmacológicas, tais como antitumorais, antimicrobiana, antisséptica (SALATINO et al., 2005), anti-inflamatória, antioxidante (BANKOVA; DE

CASTRO; MARCUCCI, 2000; SFORCIN, 2007; OLDONI et al., 2011; OLDONI et al., 2015), cicatrizante e anestésica (PARK et al., 2002; JUNIOR et al., 2006).

Os antioxidantes apresentam capacidade de impedir que biomoléculas como proteínas, lipídios e açúcares sofram danos oxidativos causados pelos radicais livres, o que pode ocasionar diversas doenças como aterosclerose, doenças coronárias, câncer e envelhecimento celular (RICE-EVANS; BURDON, 1994; VISIOLI; BELLOMO; GALLI, 1998; LEOPOLDINI et al., 2004). Dentre os principais compostos com atividade antioxidante destacam-se os compostos fenólicos, que podem atuar inibindo as reações ocasionadas por radicais livres, nas etapas de iniciação e propagação, ou como quelantes de metais, responsáveis por catalisar reações de oxidação (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992).

Diversos ensaios *in vitro* são empregados com o objetivo de determinar a composição química e atividade antioxidante de diferentes matrizes (KOLEVA et al., 2002; KUMAR, 2015). Técnicas instrumentais de análise como as cromatográficas, as eletroquímicas e espectroscópicas, aliadas a quimiometria, apresentam elevada sensibilidade, confiabilidade e precisão, e vêm sendo desenvolvidas para auxiliar pesquisadores e indústrias em suas rotinas laboratoriais (SETTLE, 1997; SKOOG et al., 2014; KUMAR, 2015).

As análises de referência utilizadas atualmente para a determinação da atividade antioxidante em amostras de própolis apresentam custo elevado, necessidade de reagentes específicos, pessoal técnico treinado e geração de elevada quantidade de resíduos químicos que precisam ser corretamente descartados. A espectroscopia de infravermelho na região do próximo (NIRS, do inglês, *Near InfraRed Spectroscopy*) acoplada as ferramentas quimiométricas surge como um método alternativo, com vantagens como simplicidade, baixo custo, rapidez e geração de menor quantidade de resíduos. Devido a isto, muitos trabalhos na literatura vêm utilizando esta técnica associada à quimiometria: MCLACHLAN, et al. (2017); ORBEGOZO et al. (2017); YU et al. (2018); CLAUSEN et al. (2017); POLAK et al. (2017); GALASSO et al. (2017); SIESLER et al. (2008); CHARNIER et al. (2017); DIAGO et al. (2018); GONZÁLEZ-MARTIN et al. (2017); SOARES et al. (2018); GENISHEVA et al. (2018); STOCKL; LICHTI (2018); GUO et al. (2018); GONZÁLEZ-MARTIN et al. (2017); REVILLA et al. (2017); BETANCES-SALCEDO et al. (2017); TEIXEIRA et al. (2018); EYLENBOSCH et al. (2018); MUNERA et al. (2018).

Dentro desse contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver modelos de calibração multivariada para determinação, por NIRS, da atividade antioxidante e composição fenólica de amostras de própolis oriundas do estado do Paraná e Santa Catarina. Além deste, com base nos valores obtidos em laboratório, desenvolver e validar uma metodologia por CLAE-DAD (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos) para a identificação e quantificação dos principais ácidos fenólicos e flavonoides encontrados em própolis.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolver modelos de calibração multivariada robustos e com capacidade de prever a atividade antioxidante de amostras de própolis brutas, maceradas, EEP (extrato etanólico de própolis) e EEPC (extrato etanólico de própolis concentrada) oriundas dos estados do Paraná e Santa Catarina.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar a atividade antioxidante dos extratos de própolis pelos métodos de captura dos radicais livres ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-ácido sulfônico), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina) e redução do  $Fe^{+3}$  a  $Fe^{+2}$  (FRAP).
- Determinar o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais dos extratos de própolis por meio de espectroscopia UV/visível.
- Otimizar uma metodologia para CLAE-DAD para identificar e quantificar por CLAE-DAD os principais ácidos fenólicos e flavonoides encontrados nas amostras de própolis.
- Determinar se a NIR (*Near InfraRed*) associada à quimiometria pode ser empregada na caracterização de amostras de própolis.
- Desenvolver modelos de calibração multivariada utilizando NIR e PLS (*Partial Least Squares*) e pré-tratamentos espectrais que possuam a capacidade de prever atividade antioxidante de amostras *in natura*, trituradas, EEP (Extrato etanólico de própolis) e EEPC (Extrato etanólico de própolis concentrada ou extrato concentrado de própolis).
- Avaliar os modelos levando em consideração os parâmetros  $R^2$  (Coeficiente de Determinação), RMSEC (*Root mean square error of calibration*), RMSECV

(*Root mean square error of cross validation*), RMSEP (*Root mean square error of prediction*), RMSEE (*Root mean square error of estimation*), RPD (*Residual prediction deviation*), RER (*Range error ratio*), RMSEP/RMSECV.

- Avaliar se o tipo da própolis influencia nas características espectroscópicas e se gera modelos distintos.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Abelhas

O grupo monofilético *Aculeata* é um dos principais grupos da ordem *Hymenoptera*, nesta ordem estão presentes os insetos cujas fêmeas têm modificações em seus ovopositores para ferrões. O grupo *Aculeata* inclui as formigas, vespas e abelhas (VIEIRA, 1986; MUXFELDT, 1987; MICHENER, 2000). As abelhas, como a maioria dos outros animais, necessitam ingerir alimentos que supram a necessidade de seu organismo como água, vitaminas, sais minerais, gorduras, proteínas e carboidratos. Uma colmeia de abelhas consome por ano para sustento próprio uma média de 30 Kg de pólen e 90 Kg de mel (MUXFELDT, 1987).

Desde quando as abelhas e os primeiros humanos começaram a coexistir, o maior benefício que elas apresentam é a polinização da vegetação natural às abelhas e outros insetos polinizadores atuam diretamente na reprodução da maioria das espécies vegetais (MICHENER, 2000), sendo as fêmeas as principais polinizadoras, pois utilizam o pólen que recolhem como sua principal fonte de proteína e também o utilizam para alimentar suas larvas (VAN'T LEVEN et al., 2005). A biodiversidade nos ecossistemas depende diretamente da polinização que as abelhas realizam, atuando como “prestadores de serviço”, ou seja, a produção mundial da agricultura é mantida principalmente por estes insetos. (MICHENER, 2000; GARÓFALO, 2004; GREENLEAF, KREMEN, 2006; WINFREE et al., 2011).

Apesar de essencial, a atividade das abelhas está sendo atualmente ameaçada pelo uso indiscriminado de inseticidas, e a degradação dos ecossistemas, a fragmentação de habitats, o esgotamento de espécies de plantas e o aquecimento global são fatores que podem levar a extinção das abelhas. (MICHENER, 2000; COULIBALY et al., 2016; MADRAS-MAJEWSKA; MAJEWSKI, 2016). Em casos de extinção a humanidade pode esperar o declínio de plantas e animais, suscitando em mudanças nas funções dos ecossistemas e, portanto, em suas paisagens. A apicultura surge neste cenário como uma forma de prevenir estes problemas (KEVAN; VIANA, 2003; LIMA; ROCHA, 2012).

### 3.2 Apicultura no Brasil

O primeiro registro da apicultura em nosso país ocorreu em 1839 e está vinculado ao padre Antônio Carneiro, que trouxe um pequeno número de colônias de abelhas *Apis mellifera* da região do Porto em Portugal para o Rio de Janeiro. A partir desta data, por meio dos imigrantes europeus, novas espécies de abelhas foram introduzidas principalmente nas regiões Sul e Sudeste (NOGUEIRA-NETO, 1972; EMBRAPA, 2015). A apicultura brasileira foi modificada a partir de 1956, de forma acidental as abelhas africanas (*Apis mellifera scutellata*) escaparam de um apiário e passaram a acasalar com as abelhas da raça europeia, dando origem às abelhas africanizadas que conhecemos hoje.

Após a disseminação desta nova espécie de abelhas verificou-se que as mesmas eram muito agressivas, o que causou um grande problema para os apicultores, ocasionando inclusive mortes de dezenas de pessoas e animais. Por isso, muitos apicultores resolveram exterminar estas abelhas e abandonar a atividade apícola (EMBRAPA, 2015).

Ainda segundo VIEIRA (1986), alguns técnicos, apicultores e outras pessoas não atentavam às abelhas africanas como uma ameaça e sim como uma grande possibilidade de serem empregadas em apiários graças aos estudos do Dr. Warwick Kerr. O Dr. Kerr comprovou que a produção de mel pelas abelhas africanas era muito superior a das europeias e com o passar do tempo, novas técnicas de manejo foram sendo desenvolvidas, possibilitando aos apicultores maior controle sobre estas abelhas e a partir da década de 70 passaram a dominar a apicultura nacional (PARANI, 1993).

O Brasil é um país muito vasto e apresenta por esta razão regiões geográficas distintas e uma flora e clima muito variado. Estes fatores proporcionam ao nosso país elevado potencial apícola, pois permite aos produtores colherem mel durante o ano todo (MARCHINI, 2004; LOPES et al., 2016). Em 2009, o Brasil ocupava o 9º lugar mundial na produção de mel, produzindo cerca de 38.764 t. Neste mesmo ano a China liderou com 367.219 t de mel produzidas, seguida da Turquia e Argentina, 82.003 e 81.000 t, respectivamente (SEBRAE, 2011). O cenário brasileiro na apicultura é muito promissor e a tendência do setor é o crescimento, o que por sua vez motiva os apicultores a expandirem a produção aumentando assim

seus lucros (MARTINEZ et al., 2012). Dentre os produtos que as abelhas fornecem destacam-se o mel, cera, geleia real e a própolis (YILMAZ, 2016; BARGAŃSKA; ŚLEBIODA; NAMIEŚNIK, 2016).

### 3.3 Própolis

Própolis é uma palavra de origem grega que possui como significado “*pro*” que representa “em defesa de”, e “*polis*” que quer dizer “cidade”. Ou seja, é entendida como “defesa da cidade” ou “defesa da colmeia”, quando utilizada pelas abelhas (SALATINO et al., 2005).

A própolis pode ser utilizada em uma colmeia para diversos fins, como preencher fendas (BARTH, 2004; SALATINO et al., 2005; JUNIOR et al., 2006), manter a temperatura da colônia em torno de 35°C (SALATINO et al., 2005), embalsamar predadores (BARTH, 2004; JUNIOR et al., 2006) de modo que isso evite a sua decomposição, bem como função antisséptica, que protege a colônia de possíveis doenças (SALATINO et al., 2005; SAHINLER; KAFTANOGLU, 2005; JUNIOR et al., 2006).

A própolis, atualmente, vem sendo fortemente comercializada pela indústria farmacêutica assim como por lojas de produtos naturais (BANSKOTA; TEZUKA; KADOTA, 2001) para diversos usos farmacológicos. Contudo, o cenário não era este, uma vez que a mesma era vista como um subproduto indesejado, uma vez que não apresentava valor no mercado e sua produção demandava o tempo utilizado pelas abelhas em que poderiam estar produzindo o mel. Em meados dos anos 80, quando a popularidade da própolis começou a aumentar devido ao seu uso na medicina complementar e alternativa, está se tornou também uma nova opção aos produtores. Atualmente muitos produtores têm nesse produto sua principal fonte de renda (SALATINO et al., 2005).

Em sua composição química apresenta resina vegetal, cera de abelha e secreções das glândulas de cabeças de operárias (BARTH, 2004; SALATINO et al., 2005; JUNIOR et al., 2006), além de diversos compostos químicos já identificados (BANKOVA; DE CASTRO; MARCUCCI, 2000; DE CASTRO, 2001) como os flavonoides (pinobanksina, kanferol, apigenina, pinocembrina, pinobanksina-3-

acetato, crisina (PARK et al., 2002), daidzeína, quercitina, formononetina (CABRAL et al., 2009) naringenin, genisteína, kaempferol, apigenina, pinocebrina, galangina, acacetina (VOLPI; BERGONZINI, 2006) ácidos fenólicos como ácido cumárico, ácido ferrúlico (PARK et al., 2002), ácido cafeico, ácido 3,4-dimetoxicinâmico, ácido cinamilidenoacético (KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004), cetonas, assim como óleos voláteis, ácidos aromáticos, ceras, resinas, bálsamo e polén (CASTALDO; CAPASSO, 2002, PIETTA; GARDANA; PIETTA, 2002; JUNIOR et al., 2006).

Conforme Bankova; de Castro; Marcucci (2000) e Kumazawa; Hamasaka; Nakayama (2004), a composição química da própolis pode variar, pois é determinada principalmente, pelas características da vegetação existente ao redor da localização da colmeia, do clima e de sua localização geográfica (onde estão inseridas as colmeias).

A própolis tem despertado o interesse dos pesquisadores nas últimas décadas devido as suas propriedades biológicas e farmacológicas, como imunomoduladores, antitumoral, antimicrobiana, antisséptica (SALATINO et al., 2005), anti-inflamatória, antioxidantes, (BANKOVA; DE CASTRO; MARCUCCI, 2000; PARK; IKEGAKI; ALENCAR, 2000; ALENCAR et al., 2007; SFORCIN, 2007; OLDONI et al., 2015) hipotensiva, cicatrizante e anestésica (PARK et al., 2002; JUNIOR et al., 2006).

A classificação da própolis pode ser feita por meio de suas características físico-químicas e propriedades biológicas, tais como a cor (PARK; IKEGAKI; ALENCAR, 2000) e a textura, que variam de friável e dura até elástica e gomosa (SALATINO et al., 2005).

Simões; Araújo; Araújo (2008) avaliaram extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos e obtiveram como resposta a mesma ação farmacológica em comparação aos antissépticos industrializados testados. Segundo Corrêa et al. (2017), o extrato de própolis vermelha brasileira apresenta um efeito positivo no processo de cicatrização de feridas em ratos.

Cavalcante et al. (2011) encontraram, efeitos protetivos da própolis verde sobre a carcinogênese lingual de ratos. Park et al. (2000) utilizando extratos de própolis coletadas em diferentes regiões do Brasil estudaram a citotoxicidade e atividade anti-HIV de 12 grupos distintos de própolis, sendo que dois desses grupos

apresentaram alta capacidade de destruir células por meio de substâncias nocivas e outros dois demonstraram atividade anti-HIV.

### **3.4 Atividade antioxidante**

Antioxidantes são compostos que combatem o dano oxidativo, ou seja, eliminam as reações que ocorrem devido à ação dos radicais livres (KUMAR, 2015). Ou ainda, é qualquer substância que quando em menor concentração comparado a um substrato oxidável, retarda ou inibi a oxidação desse substrato (HALLIWEL; GUTTERRIDGE, 1990). Os radicais livres são por definição moléculas orgânicas e inorgânicas que contêm um ou mais elétrons não pareados, o que os torna moléculas altamente instáveis, muito reativas e com meia vida curta (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BIANCHI; ANTUNES, 1999). Ocorrem de maneira natural nos organismos vivos, sendo produzidos durante o metabolismo celular aeróbio.

Os antioxidantes podem ser classificados como primários ou secundários, sendo os primários aqueles que neutralizam os radicais livres pela doação de um átomo de hidrogênio ou por um mecanismo de transferência eletrônica. São exemplos destes, os antioxidantes sintéticos como o BHA (mistura de 2-terc-butil-4-hidroxianisol e 3-terc-butil-4-hidroxianisol), BHT (hidroxitolueno) e TBHQ (terc butil hidroquinona), amplamente utilizados em indústrias alimentícias, com a finalidade de retardar a oxidação nos alimentos (SHAHIDI, 2015).

A atividade antioxidante vem sendo relatada por muitos pesquisadores em diversas matrizes como frutas, plantas e diversos alimentos (YAO et al., 2016; KUMARI; MADHUJITH; CHANDRASEKARA, 2016; CARABAJAL; ISLA; ZAMPINI, 2016; MAMILLA; MISHRA, 2017; WU; HUANG, 2017; LI et al., 2017) e pode ser associada a uma classe de compostos químicos que possuem uma grande capacidade de sequestrar radicais livres, denominados compostos fenólicos.

#### **3.4.1 Compostos Fenólicos**

Os compostos fenólicos possuem sua estrutura química hidroxilas e anéis aromáticos, isso confere a estes o potencial antioxidante (ANGELO; JORGE, 2007). São objetos de estudo para muitos pesquisadores na área da medicina como mecanismo para tratar doenças (SOARES, 2002).

Os compostos fenólicos como antioxidantes param as reações ocasionadas por radicais livres, e às vezes atuam também como quelantes de metais, os derivados dos ácidos fenólicos também são muito eficazes para inibirem processos de auto oxidação (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992). Atuam na etapa de iniciação e nas etapas posteriores de propagação dos processos oxidativos (SOARES, 2002), podem ser classificados através da sua estrutura (Tabela 1).

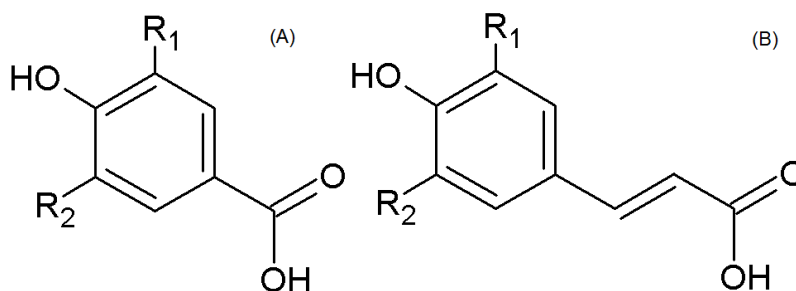
Tabela 1 - Classificação dos compostos fenólicos

Estrutura	Classe
C <sub>6</sub>	Fenólicos simples
C <sub>6</sub> – C <sub>1</sub>	Ácidos fenólicos e compostos relacionados
C <sub>6</sub> – C <sub>2</sub>	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C <sub>6</sub> – C <sub>3</sub>	Ácidos cinâmicos, aldeídos de cinamilo, álcoois cinâmicos, cumarinas, isocromarinas e cromonas
C <sub>15</sub>	Chalconas, auronas, dihidrochalconas, flavans, flavonas, flavanonas, flavanoides, antocianidinas e antocianinas
C <sub>30</sub>	Biflavanilos
C <sub>6</sub> – C <sub>1</sub> – C <sub>6</sub> , C <sub>6</sub> – C <sub>2</sub> – C <sub>6</sub>	Benzofenonas, xantonas e estilbenos
C <sub>6</sub> , C <sub>10</sub> , C <sub>14</sub>	Quinonas
C <sub>18</sub>	Betacianidinas
Lignanas, neolignanas	Dímeros ou oligômeros
Ligninas	Polímeros
Taninos	Oligômeros ou polímeros
Flobafenos	Polímeros

Fonte: VERMERRIS; NICHOLSON (2008).

Segundo Gülçin (2012), os ácidos fenólicos são derivados hidroxilados de ácidos carboxílicos aromáticos de dois grupos principais: ácido hidroxibenzoico e do ácido hidroxicinâmico, ácidos presentes em todo o reino vegetal (SARIKAYA; GÜLÇİN; SUPURAN, 2010). Os ácidos hidroxibenzóicos (Figura 1 - A) têm em sua estrutura um núcleo comum de C<sub>6</sub> – C<sub>1</sub>, já os ácidos hidroxicinâmicos (Figura 1 - B) são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral de C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (BRAVO, 1998; ANGELO; JORGE, 2007).

Figura 1 - Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos (A) e hidroxicinâmicos (B)



Fonte: Autoria própria.

Por meio do radical substituinte e posição destes radicais é possível caracterizar diferentes ácidos fenólicos derivados dos ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos (Tabela 2):

Tabela 2 - Radicais R1 e R2 e suas respectivas moléculas para os ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos.

Hidroxibenzóicos		
Radical		Molécula
R1	R2	
H	H	ácido p-hidroxibenzóico
OH	H	ácido protocatecuico
OCH <sub>3</sub>	H	ácido vanílico
OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	ácido siríngico
Hidroxicinâmicos		
H	H	ácido p-cumárico
OH	H	ácido cafeico
OCH <sub>3</sub>	H	ácido ferúlico

Fonte: ANGELO; JORGE (2007).

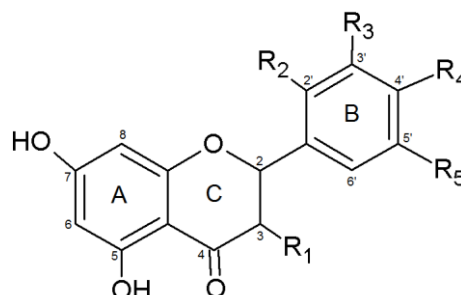
Segundo Gülçin (2012), a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e de seus derivados depende da posição, do número dos grupos hidroxila ligados ao anel aromático, do local da ligação e do tipo de substituinte. Estes últimos modulam a propriedade antioxidante, no que diz respeito à capacidade que os substituintes têm de doar hidrogênio.

### 3.4.2 Flavonoides

Os flavonoides pertencem à classe dos polifenóis, e possuem em sua estrutura um núcleo básico de C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, no grupo dos flavonoides encontram-se as antocianidinas, flavonas, flavanóis, auronas, chalconas, isoflavonas (SOARES, 2002), flavanonas, flavanonóis, leucoantocianidinas, desoxiantocianidinas e antocianinas (VERMERRIS; NICHOLSON, 2008).

A estrutura química dos flavonoides consiste em três anéis, o anel A e B são anéis aromáticos, estes são unidos pelo anel C heterocíclico (Figura 2). O anel A é derivado do ciclo do acetato ou malonato, já o anel B é derivado da fenilalanina. Quando os anéis A e B são substituídos por oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação ou sulfatação, diferentes compostos dentro da classe flavonoides são formados (Tabela 3). Quando o anel C é substituído surgem os flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, isoflavonas e antocianidinas (HOLLMAN; KATAN, 1999; ANGELO; JORGE; 2007).

Figura 2 - Estrutura química dos flavonoides



Fonte: Autoria própria.

Tabela 3 - Radicais e suas respectivas moléculas derivadas dos flavonoides

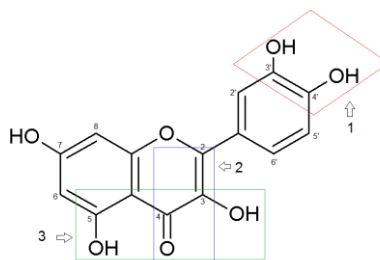
Radical					Molécula
R1	R2	R3	R4	R5	
H	H	H	OH	H	Apigenina
H	H	H	H	H	Crisina
OH	H	OH	OH	H	Quercetina
OH	H	OH	OH	OH	Miricetina
OH	H	H	OH	H	Kaempferol

Fonte: GÜLÇİN (2012).

A atividade antioxidante e biológica dos flavonoides está relacionada à sua estrutura química e dependem desta, principalmente devido a três características principais (Figura 3): 1<sup>a</sup>) presença de catecol no anel B; 2<sup>a</sup>) a ligação dupla 2,3 conjugada com a função 4-oxo de um grupo carbonil do anel C e 3<sup>a</sup>) presença de

hidroxilas nas posições 3 e 5. A quercetina possui todas essas características e por isso possui um grande potencial antioxidante. Vale destacar também que o potencial antioxidante aumenta de maneira expressiva quando existe um grupo OH na posição 5' do anel B (GÜLÇİN, 2012).

Figura 3 - Características estruturais dos flavonoides conferindo máxima atividade antioxidante (fórmula estrutural da quercetina)



Fonte: Autoria própria.

### 3.4.3 Determinação da atividade antioxidante *in vitro*

Os métodos empregados na determinação da capacidade antioxidante diferem em suas reações, mecanismo alvo, substância alvo e condições de análise. São duas as abordagens para a verificação da atividade antioxidante: 1) ensaios de inibição em que a eliminação pelo hidrogênio ou a doação de elétrons de um radical livre pré-formado é o marcador da atividade antioxidante e 2) ensaios envolvendo a presença de sistemas antioxidantes durante a geração de radicais. Diversos ensaios *in vitro* são empregados para se avaliar a capacidade antioxidante, dentre estes destacam-se os métodos de captura dos radicais ABTS e DPPH, poder redutor do ferro (FRAP) e capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC) são utilizados para determinar a atividade antioxidante em diversas matrizes (KUMAR, 2015).

Os métodos para a determinação da atividade antioxidante podem ser divididos em mecanismo de reação em HAT (*Hydrogen Atom Transfer*) e SET (*Single Electron Transfer*) (HUANG; OU; PRIOR, 2005; GÜLÇİN, 2012).

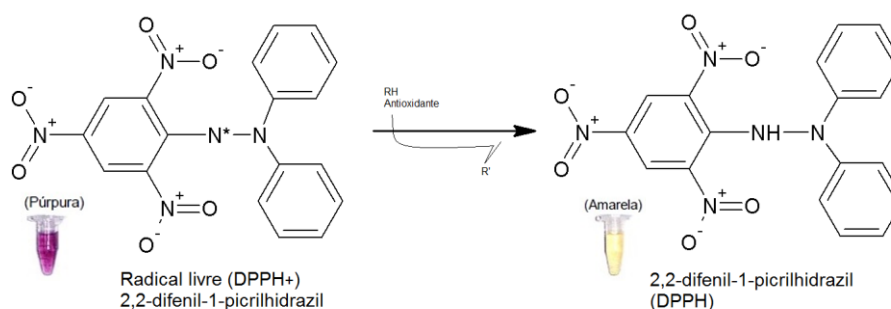
Para a correta mensuração da atividade antioxidante de certa matriz, é necessário verificar se os ensaios selecionados são adequados para a matriz em estudo, pois a atividade antioxidante depende da hidro ou lipofilicidade do

antioxidante, concentração da matriz, solvente utilizado e forma de preparação. Algumas matrizes complexas podem apresentar interações sinérgicas entre seus componentes (KOLEVA et al., 2002; KUMAR, 2015).

### 3.4.3.1 Captura do radical DPPH

O método do radical orgânico DPPH é amplamente utilizado na determinação da atividade antioxidante de diversos compostos. Este ensaio utiliza um radical orgânico DPPH dissolvido em solventes orgânicos, principalmente etanol e metanol, e é baseado na descoloração da solução. O grau da descoloração indica o potencial antioxidante da amostra (KUMAR, 2015) e o mecanismo de reação envolvido é a transferência de átomos de hidrogênio ou elétrons para este radical a fim de estabilizá-lo (HUANG; OU; PRIOR, 2005). O radical DPPH possui uma absorção característica em 515 nm, e quanto menor esta absorção maior a capacidade que a amostra tem em capturar o DPPH. A Figura 4 ilustra o que ocorre com este radical na presença de um antioxidante (KUMAR, 2015).

Figura 4 - Reação entre o radical livre DPPH e um antioxidante para a formação do DPPH



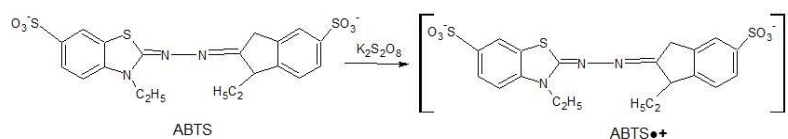
Fonte: Adaptado de KUMAR (2015).

### 3.4.3.2 Captura do radical ABTS

A metodologia de captura do radical ABTS também é muito utilizada para se quantificar a atividade antioxidante. Neste ensaio, o ABTS é oxidado por agentes oxidantes para o seu cátion radicalar  $ABTS^{\bullet+}$ , o radical é colorido e a capacidade antioxidante é medida como a capacidade dos compostos da matriz em diminuir a cor em uma reação direta como o radical ABTS. O radical ABTS se aplica tanto para compostos lipofílicos quanto hidrofílicos, e são mais reativos do que os radicais DPPH.

As reações com ABTS envolvem tanto HAT quanto SET. O radical ABTS é gerado normalmente pela reação com  $K_2S_2O_8$  (Persulfato de Potássio) (Figura 5) e a determinação do radical é feita em 734 nm, pois neste comprimento de onda as interferências de outros componentes absorventes e da turbidez da amostra é minimizado. A absorbância da amostra na quantificação é proporcional ao radical  $ABTS^{\bullet+}$  restante (GÜLÇİN, 2012).

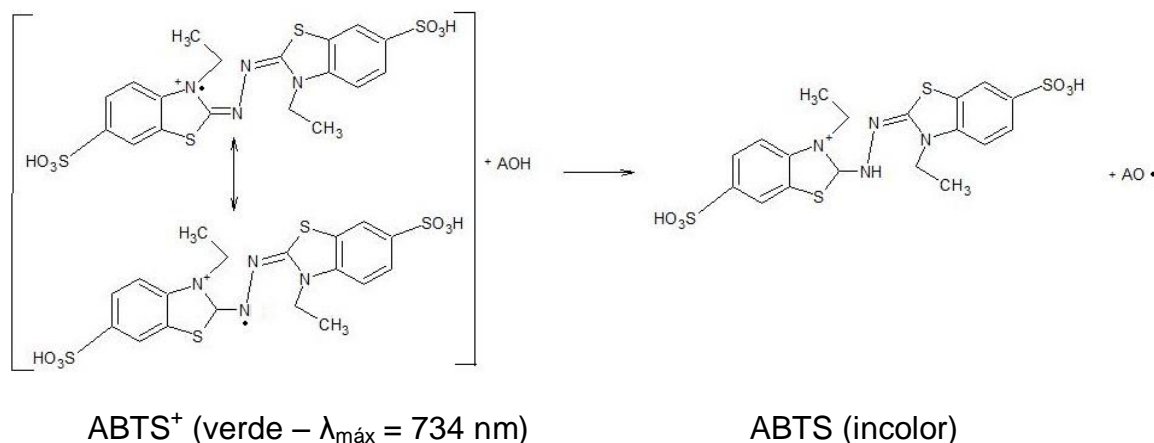
Figura 5 - Oxidação do ABTS com persulfato de potássio para a geração do radical  $ABTS^{\bullet+}$



Fonte: Adaptado de GÜLÇİN (2012).

A Figura 6 mostra a reação do radical ABTS com um antioxidante (AOH), após a reação o ABTS torna-se então incolor.

Figura 6 - Reação do radical ABTS com um antioxidante (AOH)

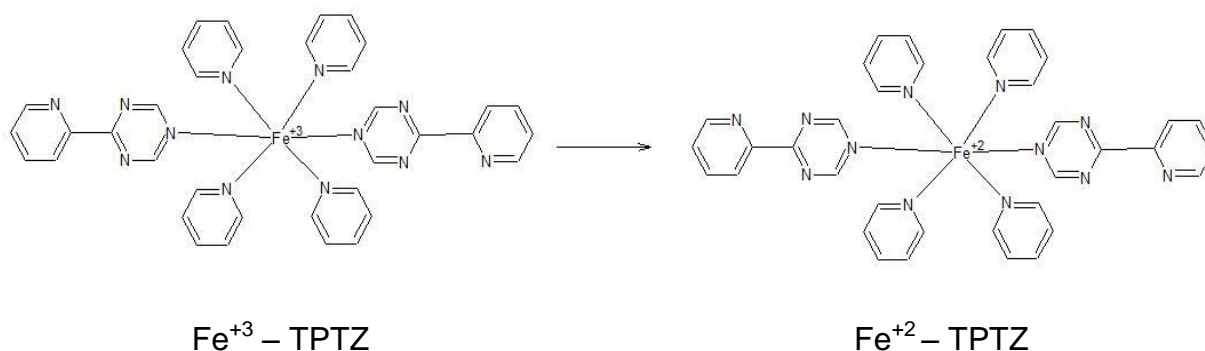


Fonte: Adaptado de Oliveira (2011).

### 3.4.3.3 Poder de redução do ferro – FRAP

A atividade antioxidante também é quantificada utilizando o método de FRAP, nesta metodologia não estão envolvidos radicais livres, mas a redução do ferro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) para ferro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Íons ferrosos são encontrados em alimentos e são conhecidos como pró-oxidantes eficazes devido a sua alta reatividade. A metodologia de FRAP é realizada para determinar a capacidade de uma substância em se ligar ao íon ferroso da oxidação. O método FRAP baseia-se na redução de  $\text{Fe}^{3+}$  no complexo de TPTZ a  $\text{Fe}^{2+}$  no complexo de TPTZ (intensamente azul) por antioxidantes (Figura 7). O complexo  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ tem uma absorção em 562 nm (KUMAR, 2015).

Figura 7 - Reação do complexo de  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ para  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ



Fonte: Adaptado de GÜLÇİN (2012).

### 3.4.3.4 Compostos fenólicos totais

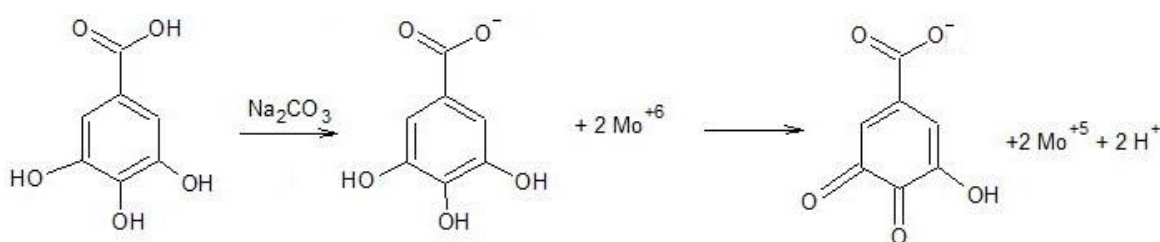
Os compostos fenólicos também são quantificados por análises *in vitro*, o ensaio mais utilizado na literatura é baseado na capacidade de redução do reagente de Folin-Ciocalteu. Singleton et al. (1999) foram os precursores deste método que consiste na transferência de elétrons de compostos fenólicos para o reagente Folin-Ciocalteu em meio alcalino (GÜLÇİN, 2012).

O reagente de Folin-Ciocalteu constitui na mistura de ácidos de molibdênio (estado de oxidação VI) e tungstênio, conferindo a cor amarela no complexo de

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . A reação dos compostos fenólicos pode ser mensurada pela mudança da cor, quantificado espectrofotometricamente, pois na presença de agentes redutores que são os compostos fenólicos, forma-se complexos de molibdênio-tungstênio azuis  $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^4]$  (OLIVEIRA, 2011).

A Figura 8 mostra a reação do ácido gálico que é um ácido fenólico com o molibdênio VI, o que leva a formação de molibdênio V que pode ser mensurado por espectrofotômetro.

Figura 8 - Reação do ácido gálico com molibdênio VI

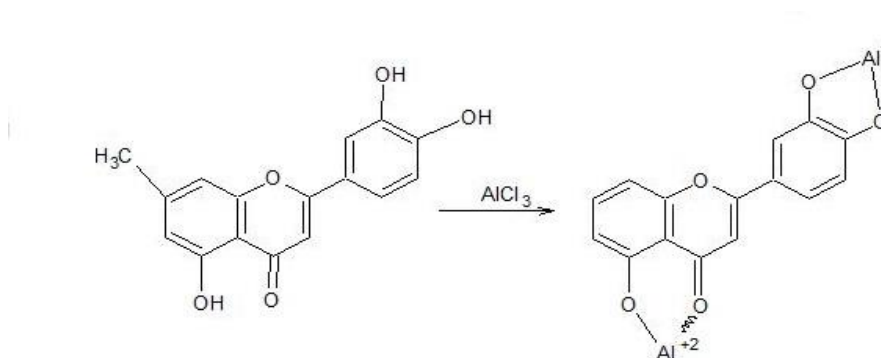


Fonte: Adaptado de Oliveira (2011).

#### 3.4.3.5 Teor de Flavonoides

Os flavonoides também são quantificados em análises *in vitro*, a espectroscopia de absorção de luz na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) é a principal técnica empregada. A complexação destes com metais principalmente com íon  $\text{Al}^{3+}$  é muito utilizada (Figura 9) (POZZI, 2007). É relatado ainda que os ensaios *in vitro* mostram que a atividade antioxidante dos flavonoides é superior à das vitaminas E e C (RICE-EVANS et al., 1996; NEVES; ALENCAR; CARPES, 2009).

Figura 9 - Reação entre um flavonoide e Al(III)



Fonte: Adaptado de ASSIMOS (2014).

### 3.5 Técnicas instrumentais de análise

Muitas técnicas instrumentais, cromatográficas, eletroquímicas e espectroscópicas, de análise têm sido desenvolvidas e apresentaram grandes vantagens sobre as técnicas convencionais (WILLARD et al., 1988; SHARMA, 2000). As técnicas cromatográficas são utilizadas para separar, identificar e quantificar múltiplos compostos em amostras complexas, as técnicas espectroscópicas são em sua maioria não destrutivas, rápidas e confiáveis, e capazes de medir a quantidade de radiação produzida ou absorvida pelas espécies moleculares, por meio das vibrações das ligações químicas. (SETTLE, 1997; SKOOG et al., 2014; KUMAR, 2015). Técnicas eletroquímicas fornecem informações a respeito da transferência de elétrons através de potenciais químicos, reações eletroquímicas como eletrólise, cinética de reações, etc. (SETTLE, 1997; SKOOG et al., 2014).

Estas técnicas coletam uma grande faixa de informação de dados com muita facilidade e rapidez (FERREIRA et al., 1999; CHRISTIAN; DASGUPTA; SCHUG, 2014). Os dados obtidos muitas vezes são complexos, possuem inúmeras variáveis isso significa, portanto que são dados multivariados e podem ser tratados por ferramentas estatísticas aplicadas à área de química (quimiometria) (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009; MILLER; MILLER, 2010).

Análises utilizando CLAE permitiu a Kumazawa et al. (2003) determinar a origem vegetal da própolis brasileira através de extratos das folhas de *Baccharis dracunculifolia* e da própolis encontrada nas colmeias.

### 3.5.1 NIRS

As ondas eletromagnéticas podem interagir com moléculas (por ressonância) presentes nos mais diversos meios (HEALD; MARION, 2012; KERKER, 2013), e a partir disso muitos tipos de informações podem ser geradas, tudo isso através da técnica denominada espectroscopia (PENNER, 2010). A espectroscopia é o estudo da interação de ondas com a matéria, ou seja, corresponde ao conjunto de técnicas que analisam as substâncias com base na interpretação de espectros de emissão e absorção de radiações eletromagnéticas produzidas, com base nas diferentes frequências do espectro eletromagnético (SIESLER et al., 2008; SUN, 2009).

A espectroscopia infravermelha (IV) esta dividida em três regiões: o infravermelho próximo, o qual compreende a faixa de número de onda de 13330 – 4000  $\text{cm}^{-1}$ , o infravermelho médio (MIR) o qual varia de 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$  e por fim o infravermelho distante, o qual abrange a região de 400 – 10  $\text{cm}^{-1}$  (STUART, 2005; SIESLER et al., 2008; SUN, 2009).

O IV emite energia suficiente para excitar transições vibratórias e rotacionais, e as maneiras que uma molécula pode vibrar está diretamente relacionado ao número de ligações e átomos que contem, e cada molécula possuiu uma absorção única, as moléculas só conseguem absorver radiação infravermelha (IV) se esta sofrer uma mudança no momento dipolo, se a frequência da radiação emitida corresponder à frequência vibracional das moléculas então a radiação será absorvida (CHRISTIAN; DASGUPTA; SCHUG, 2014).

Na espectroscopia de IV com transformada de Fourier (FTIV) os dados do IV são guiados através de um interferômetro, que realiza a transformada de Fourier, o interferômetro consegue gerar padrões de interferência de forma equilibrada, o sinal é então medido através do interferograma. Os espectrofotômetros FTIV são muito mais baratos e sensíveis que os convencionais porque o interferômetro é um componente barato (SUN, 2009).

Na região do NIRS ocorre à absorção de *overtones* ou combinações de vibrações fundamentais de estiramento das moléculas, e os espectros dependem da composição química e características físicas destas. As ligações mais comuns são de C-H, N-H, O-H e S-H (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009; KUMAR; 2015).

Os *overtones* no NIRS são formados por bandas de combinação, que são excitações dos elétrons aos níveis de energia maiores. O espectro do NIRS contém até 4 *overtones* (SIESLER et al., 2008; SUN, 2009; AGELET; HURBURGH, 2010). Em termos do número quântico vibracional ( $v$ ) os *overtones* assumem as transições de  $v = 0$  para  $v = 2$  (primeiro *overtone*),  $v = 0$  para  $v = 3$  (segundo *overtone*) e  $v = 0$  para  $v = 4$  (terceiro *overtone*), o quarto *overtone* é ignorado por ser muito fraco (CHRISTIAN; DASGUPTA; SCHUG, 2014).

O equipamento de NIRS é amplamente utilizado em várias indústrias, desde agrícolas a petroquímicas, por ser simples, versátil, rápido e acima de tudo não destrutivo. Um equipamento de NIRS consegue verificar  $n$  constituintes e de maneira mais eficaz quantificar estes constituintes de uma matriz de forma simultânea, e as matrizes na maioria dos casos não querem uma preparação (SUN, 2009; HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009; CHRISTIAN; DASGUPTA; SCHUG, 2014). Muitos trabalhos na literatura também mostram o NIRS como uma poderosa ferramenta analítica (HOGENDOORN; SOMMEIJER; VREDENBREGT, 2013; GONZÁLEZ-MARTIN et al., 2015; VENEGAS et al., 2016; YE et al., 2016).

Cai et al. (2012), utilizou NIRS para identificação da origem geográfica e determinação do conteúdo de flavonoides de própolis de origem chinesa. Venegas et al. (2016) estudou um novo método utilizando NIRS para determinação de éster fenético de ácido cafeico (CAPE) e atividade antioxidante de amostras de própolis. O NIR também foi utilizado por Hogendoorn; Sommeijer; Vredembregt (2013) como um método alternativo para medir o teor de cera de abelha presentes na própolis dos Países baixos, chegando à conclusão de que este método pode também servir para a desparafinação de própolis bruto antes do isolamento de compostos biologicamente ativos a serem utilizados em medicamentos.

A espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FTNIR) e a quimiometria andam lado a lado, pois os espectros gerados possuem muita informação e são muito complexos na maioria dos casos, tornando a análises destes muito complicada. A aplicação de técnicas matemáticas e estatísticas associada à computação sobre estes dados (quimiometria), conseguem absorver as

informações essenciais contidos nos espectros (SOUZA et al., 2013). Através de técnicas de análises multivariadas de calibração como regressão por PLS, modelos podem ser construídos para os mais diversos fins, pois estes métodos são essenciais para o NIRS (BALABIN; SAFIEVA; LOMAKINA, 2007).

### 3.6 Quimiometria e a análise multivariada

A quimiometria se ocupa em utilizar ferramentas estatísticas, matemáticas e outras, para o tratamento de dados de origem química ou não, na grande maioria dos casos dados multivariados, através da interpretação do que realmente é significativo e importante (TRYGG; HOLMES; LUNDSTEDT, 2007; REINHOLDS et al., 2015). Com o avanço da tecnologia, cada vez mais *softwares* matemáticos e estatísticos surgem como poderosas ferramentas, estas ferramentas são capazes de otimizar experimentos, reconhecer padrões, desenvolver modelos de classificação, realizar calibração multivariada e até mesmo processar imagens (VALDERRAMA et al., 2016).

Técnicas matemáticas de regressão ajudam no tratamento dos dados obtidos, pois, o maior problema dos dados multivariados é o seu peso, como se sabe isso pode tornar difícil a interpretação dos resultados. Desta forma os métodos a que se aplica a análise multivariada servem para reduzir o número de variáveis e até mesmo dos próprios dados (VARMUZA; FILMOSER, 2016). Como exemplo ACP (Análise de Componentes Principais), HCA (Análise Hierárquica de Cluster), KNN (K-vizinhos Mais Próximos), MLR (Regressão Linear Múltipla), PCR (Regressão de Componentes Principais), PLS entre outros (MILLER; MILLER, 2010).

#### 3.6.1 Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)

A PLS é uma poderosa ferramenta, que visa utilizar combinações lineares das variáveis que predizem a análise, em vez de usar as variáveis originais (VARMUZA; FILMOSER, 2016). Na PLS as variáveis que apresentam maior correlação com as

variáveis de resposta são atribuídas maior peso, pois segundo o modelo elas serão mais eficazes na previsão. A PCR, diferentemente escolhe os componentes principais com base nos que descrevem a maior variação possível, independente da força e relação que os preditores têm com as variáveis respostas. Nestas combinações lineares são escolhidas variáveis preditores altamente correlacionadas com as variáveis respostas (MILLER; MILLER, 2010). Como o objetivo da análise multivariada é redução de dados e variáveis, espera-se através da PLS reduzir estes parâmetros, ou seja, espera-se que apenas algumas combinações lineares das variáveis predictoras sejam capazes de descrever a maior parte da variação dos modelos (SOUZA et al., 2013).

A PLS descreve uma relação entre duas tabelas de dados através de matrizes, onde X são as variáveis independentes (normalmente X representa dados espectrais ou cromatográficos), e Y representa as variáveis dependentes (valores quantitativos das mais diversas análises). Como sabemos os dados obtidos são expressos através de uma matriz, e o método PLS faz a decomposição desta matriz de dados (X), isso é possível graças à soma das variáveis matrizes (M), a matriz de dados é adicionada a matriz de resíduos (E), estas relações são dadas através da equação 1 (KONZEN, et al., 2003; TRYGG; HOLMES; LUNDSTEDT, 2007; SOUZA et al., 2013):

$$X = M_1 + M_2 + M_3 + \dots + M_n + E \quad (\text{equação 1})$$

Onde n significa o número de variáveis latentes (VL) que são as componentes principais, as VL servem para retirar a igualdade, e E é a matriz dos resíduos que também está diretamente relacionada às VL (FERREIRA et al., 1999; KONZEN, et al., 2003)

Segundo KONZEN et al. (2003), todas as matrizes  $M_n$  (componentes principais ou VL), são formadas pelos produtos dos vetores T e P (scores e os pesos):

$$X = TP^T + E \quad (\text{equação 2})$$

$$Y = UQ^T + F \quad (\text{equação 3})$$

Nas equações 2 e 3, T e U são os scores de X e Y, e P e Q são os pesos respectivamente, E e F são as matrizes dos resíduos (WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001; SOUZA et al., 2013). O T sobreescrito: “T” significa a transposição de uma matriz, ou seja, matriz transposta (ANTON; RORRES, 2001; MEYER, 2000).

A equação 4 descreve uma relação linear entre as matrizes de dados X e Y, através da correlação entre os scores de cada bloco. Na equação 4 U é a matriz que contém as variáveis dependentes de todos os dados amostrais, “b” e “e” são vetores, o primeiro contém os parâmetros do modelo, já o segundo representa o ruído do espectro e os erros associados a este, e T é a matriz de resposta (KONZEN, et al., 2003).

$$U = bT + e \quad \text{(equação 4)}$$

Os modelos de calibração multivariados após determinados podem prever novas propriedades analíticas de um novo conjunto amostral, no caso do NIR com base em seus sinais espectrais (SOUZA et al., 2013). Os modelos de calibração devem ser avaliados para que realmente apresentem certa confiabilidade e validade, isto se dá através da verificação de alguns parâmetros como coeficiente de correlação  $R^2$ , erros padrões de calibração, validação, predição externa e interna cruzada (FERREIRA et al., 1999; KONZEN, et al., 2003).

### 3.6.2 Pré-tratamento Espectral

Devido aos espectros gerarem um grande número de informações, muitas delas às vezes não são relevantes para a construção dos modelos de calibração, e não estão relacionadas às informações que realmente representam a amostras. Deste modo, faz-se necessário um polimento (pré-processamento) dos dados espectroscópicos para a construção dos modelos (RINNAN; VAN DEN BERG; ENGELSEN, 2009; SOUZA; POPPI, 2012; SOUZA et al., 2013).

Um exemplo de pré-processamento é centrado na média (equação 5). Centrar os dados na média (CM) significa aplicar a seguinte equação:

$$x_{ij}(\text{centrado na média}) = x_{ij}(\text{original}) - x_{ij}(\text{média}) \quad (\text{equação 5})$$

Ou seja, calcula-se a média das intensidades para cada comprimento de onda e faz a subtração de cada intensidade original pela média. Isso faz com que cada variável tenha média zero, desta maneira é possível perceber as diferenças nas intensidades relativas das variáveis (SOUZA; POPPI, 2012).

### 3.6.3 Validação

Após o desenvolvimento dos modelos de calibração multivariada, é necessário verificar a validação destes, pois os modelos podem não ser verdadeiros no que se diz respeito a sua capacidade de previsão, podendo ainda ser superajustados. Portanto alguns parâmetros podem ser verificados para atestar a qualidade dos modelos desenvolvidos.

Os principais parâmetros para verificar a qualidade dos modelos são RPD, SEP (erro padrão de desempenho), RMSECV a eliminação de *outliers* (dados que apresentam uma grande diferença entre seus valores e os valores do conjunto amostral) é um fator que pode melhorar a precisão das curvas (WILLIAMS; NORRIS, 2001; KUMAR, 2015). A Tabela 4 mostra os principais parâmetros de controle de qualidade dos modelos bem como seus valores.

O  $R^2$  é capaz de mostrar a variância nos dados de referência, ou seja, expressa a capacidade de previsão do modelo, o que se explica através da variância nos dados previstos (KUMAR, 2015). Entretanto deve-se avaliar um modelo num todo, levando em consideração não somente um, mas vários parâmetros de validação e calibração.

O RMSECV consegue nos informar um erro de previsão do modelo de calibração, e este deve ser selecionado visando sempre à redução do valor de RMSECV, isso quando a validação cruzada for empregada (SINELLI et al., 2008). O RMSECV expressa o desvio padrão entre os valores do conjunto amostral da validação cruzada e os dados espectrais obtidos (KUMAR, 2015).

Tabela 4 - Parâmetros de qualidade dos modelos de NIRS

Parâmetro	Valores	Qualidade dos modelos	Referencia
R <sup>2</sup>	> 0,83	Boa robustez da predição	ELFADL; REINBRECHT; CLAUPEIN, 2010
RPD	1,5 a 2	Modelo discrimina dos menores aos maiores valores das variáveis respostas	WILLIAMS; NORRIS, 2001; KUMAR, 2015
	2,5 a 3	Boa precisão de predição	
	> 3	Excelente precisão de predição	
RER	>10	Boa estimativa de previsão	PÁSCOA; MAGALHÃES; LOPES, 2013
RMSEP/RMSECV	≈ 1	Robustez	LI et al., 2011
	< 1,2	Robustez	LU et al., 2014; WANG et al. 2017; ALVES et al. 2012
RMSEP	Quanto mais baixo melhor	Erro de análise de validação	CONZEN, 2006
RMSEC	Quanto mais baixo melhor	Erro de análise da calibração	OLIVEIRA; BRAGA; COSTA, 2015
RMSECV	Quanto mais baixo melhor	Erro de previsão	KUMAR, 2015
RMSEE	Quanto mais baixo melhor	Erro de análise da calibração	CONZEN, 2006

Fonte: Dados da literatura.

Através dos parâmetros de validação e pré-tratamentos espectrais pode-se melhorar consideravelmente um modelo de calibração. Porém outros fatores podem interferir na precisão dos modelos, como os valores, número de espectros que representam o modelo, o equipamento, fatores externos, usuário, número de amostras representativas, etc. (WANG et al., 1991; PEIRS et al., 2002). Alguns fatores são os que mais influenciam no modelo: quando por algum motivo é necessário trabalhar com os modelos de calibração em dois equipamentos diferentes, equipamentos diferentes possuem respostas diferentes; a temperatura, estabilidade do detector, mudanças de comprimento de onda, interferências eletrônicas implicam diretamente nas respostas e quando as amostras provem de lotes diferentes (KUMAR, 2015), e se tratando da própolis (objeto de pesquisa deste estudo) as condições climáticas e variabilidades sazonais são parâmetros que também podem interferir na qualidade dos modelos.

Para as análises no NIRS apresentarem ainda mais validade é importante atestar alguns pontos: 1) Antes do NIRS, métodos como cromatografia (CG ou CLAE) devem ser usados, pois geram resultados de referência; 2) As amostras normalmente são divididas em dois grupos, 66% das amostras devem constituir o conjunto de calibração e 34% devem constituir o conjunto de validação; 3) Uma grande variação da concentração dos analitos garante uma melhor calibração dos modelos (KUMAR, 2015); 4) Valores de SEC (*standard error of calibration*) baixos e

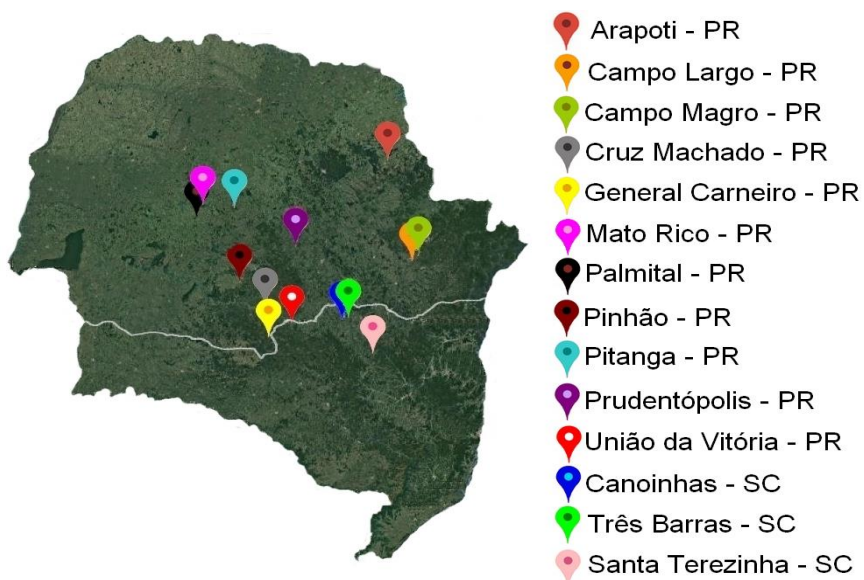
R<sup>2</sup> altos garantem também modelos muito mais precisos para a calibração (FONT et al., 2005).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta e preparo das amostras

As amostras de própolis foram fornecidas pela empresa Breyer & Cia Ltda, localizada na cidade de União da Vitória, Estado do Paraná. Esta empresa comercializa produtos apícolas e recebe amostras de diversos estados do país. Foram analisadas 33 amostras de própolis, oriundas dos estados do Paraná e Santa Catarina (Tabela – 5 e Figura 10). Todas foram recebidas, limpas, maceradas com nitrogênio líquido e mantidas sob-refrigeração a -6°C até o momento das análises.

Figura 10 - Localização geográfica das cidades de origem das amostras de própolis



Fonte: Autoria própria.

Tabela 5 - Amostras de própolis, cidades e códigos

Amostras	Cidades	Código
1	Campo Largo - PR	1 - CLP
2	Campo Largo - PR	2 - CLP
3	Campo Largo - PR	3 - CLP
4	Campo Largo - PR	4 - CLP
5	Campo Largo - PR	5 - CLP
6	Canoinhas - SC	1 - CNS
7	Canoinhas - SC	2 - CNS
8	Canoinhas - SC	3 - CNS
9	Palmital - PR	1 - PMP
10	Palmital - PR	2 - PMP
11	Arapoti - PR	1 - ARP
12	Arapoti - PR	2 - ARP
13	General Carneiro - PR	1 - GCP
14	General Carneiro - PR	2 - GCP
15	General Carneiro - PR	3 - GCP
16	General Carneiro - PR	4 - GCP
17	Prudentópolis - PR	1 - PRP
18	Prudentópolis - PR	2 - PRP
19	Prudentópolis - PR	3 - PRP
20	Mato Rico - PR	1 - MRP
21	Cruz Machado - PR	1 - COP
22	Pitanga - PR	1 - PTP
23	Pitanga - PR	2 - PTP
24	Pinhão - PR	1 - PNP
25	Pinhão - PR	2 - PNP
26	União da Vitória - PR	1 - UVP
27	União da Vitória - PR	2 - UVP
28	Três Barras - SC	1 - TBS
29	Três Barras - SC	2 - TBS
30	Campo Magro - PR	1 - CMP
31	Campo Magro - PR	2 - CMP
32	Santa Terezinha - SC	1 - STS
33	Santa Terezinha - SC	2 - STS

Fonte: Autoria própria.

O código empregado na caracterização das amostras significa: primeiro número representa a amostra, se uma cidade possui três amostras, cada amostra recebe um número em ordem crescente, as duas primeiras letras, representam a cidade de origem, e a última letra representa a inicial do estado de origem da amostra, P para Paraná e S para Santa Catarina.

Após a identificação, as amostras foram limpas e fotografadas (Figura 11). As variações na coloração variando entre tons de marrom e amarelo, e características físicas entre amostras quebradiças e mais resinosas foram verificadas.

Figura 11 – Imagens digitais das amostras de própolis bruta analisadas



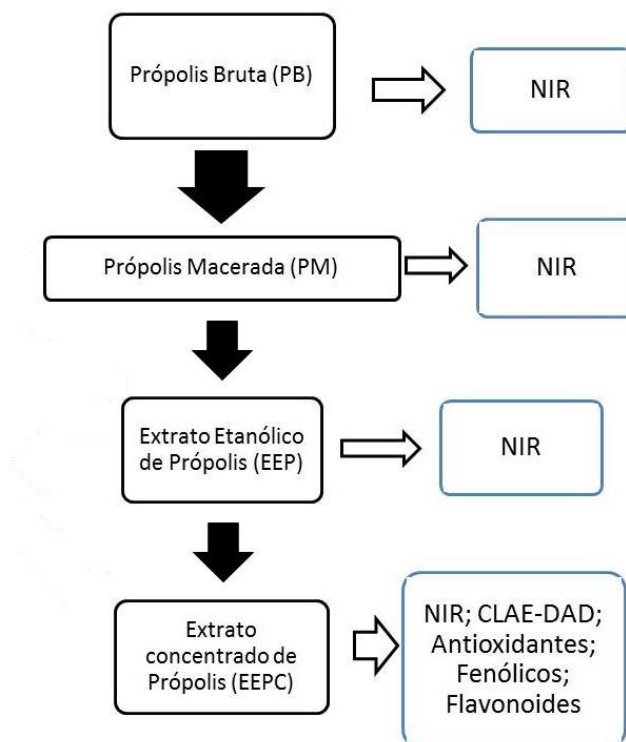
Fonte: Autoria própria.

#### 4.2 Preparo do Extrato Etanólico de Própolis (EEP) e Extrato Etanólico de Própolis Concentrado (EEPC)

A produção do Extrato Etanólico de Própolis (EEP) seguiu a metodologia descrita por Oldoni et al. (2015). Foram pesados 4 g de própolis macerada e acrescentados 50 mL de etanol:água (80:20 v v<sup>-1</sup>) e a mistura foi levada ao banho térmico a 45°C por 45 min. Os EEP foram concentrados em evaporador rotativo nas condições de 120 mbar a 40°C e na sequência, a água residual foi eliminada em liofilizador. Após concentração, foram preparados extratos padronizados (1000 mg L<sup>-1</sup>) de EEPC. Todos os extratos foram preparados em triplicata.

As amostras de própolis bruta, macerada, extratos etanólicos e extratos concentrados foram avaliados em NIRS para a aquisição dos espectros (Figura 12). Todos os extratos etanólicos de própolis foram preparados em triplicata.

Figura 12 - Fluxograma do processo de obtenção dos extratos de própolis



Fonte: Autoria própria.

#### 4.3 Atividade antioxidante utilizando o método de sequestro do radical ABTS

A atividade antioxidante pelo método de ABTS segue a metodologia descrita por Re et al. (1999) e Rufino et al. (2007). O método consiste na formação do radical ABTS através da reação de  $7 \text{ mmol L}^{-1}$  de ABTS com persulfato de potássio a  $140 \text{ mmol L}^{-1}$ , a mistura permanece no escuro durante um período de 16 horas. O radical formado foi diluído com etanol P.A. até obter uma absorbância de  $0,700 \pm 0,010$ . A reação consiste em  $30 \mu\text{L}$  do EEPC ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) com  $3,0 \text{ mL}$  do radical. A absorbância foi lida a  $734 \text{ nm}$  em espectrofotômetro (modelo UV-VIS Lambda 25, Perkin Elmer) após 6 min de reação. Utilizou-se etanol como branco e os resultados da atividade antioxidante foram expressos como base na curva analítica de Trolox em  $\mu\text{mol}$  de Trolox por grama de própolis bruta ( $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ ).

#### 4.4 Atividade antioxidante utilizando o método de sequestro do radical DPPH

A atividade antioxidante pelo método de captura do radical DPPH foi realizada conforme descrito por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995), a reação consiste na adição de 500  $\mu\text{L}$  do EEPC ( $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), 3 mL de etanol P.A e 300  $\mu\text{L}$  da solução do radical DPPH  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ . A mistura foi mantida no escuro durante 45 min. Posteriormente, a absorbância foi medida utilizando um espectrofotômetro (modelo UV-VIS Lambda 25, Perkin Elmer) a 517 nm. O etanol P.A. foi utilizado como branco. A quantificação foi realizada com base na curva analítica utilizando o Trolox como padrão e os valores foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de Trolox por grama de própolis bruta ( $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ ).

#### 4.5 Atividade antioxidante utilizando o método de redução do ferro (FRAP)

A atividade por FRAP foi inicialmente proposta por Benzie e Strain (1996). A metodologia segue Benzie e Strain (1996) e Rufino et al. (2006). O reagente FRAP foi obtido a partir da mistura de 25 mL de tampão acetato  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ , 2,5 mL de uma solução de TPTZ  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  e 2,5 mL de cloreto de ferro (solução aquosa a  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ ). A reação consiste em 100  $\mu\text{L}$  do EEPC ( $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) com 3 mL do reagente. A mistura foi homogeneizada e mantida em banho termostático a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 min. Na sequência, a absorbância foi medida em 595 nm em um espectrofotômetro (modelo UV-VIS Lambda 25, Perkin Elmer). O reagente FRAP foi utilizado como branco e a quantificação realizada por meio da curva de calibração preparada com sulfato ferroso e os resultados foram expressos como  $\mu\text{mol}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  por grama de própolis bruta ( $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$ ).

#### 4.6 Teor de compostos fenólicos totais (TCFT)

O TCFT foi determinado por meio da metodologia descrita por Singleton et al.

(1999) utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Em tubos de ensaio foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  do EEPC ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (10%) e 2,0 mL de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  4%). Após a mistura ficar 2 horas em ausência de luz, mediu-se a absorvância em um espectrofotômetro (modelo UV-VIS Lambda 25, Perkin Elmer) a 740 nm. O branco foi realizado utilizando 500  $\mu\text{L}$  de água ultra pura com Folin-Ciocalteu e carbonato. Os resultados foram expressos em  $\text{mg EAG g}^{-1}$ , com base na curva de calibração do padrão ácido gálico construída.

#### **4.7 Teor de flavonoides totais (TFT)**

O TFT é determinado através da metodologia proposta por Jurd e Geissman (1956) e Park et al. (1995). O método consiste na mistura de 500  $\mu\text{L}$  do EEPC ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em uma série de tubos identificados com e sem cloreto de alumínio. Nos tubos que recebem cloreto de alumínio foram adicionados 4,3 mL de etanol:água 80:20 ( $\text{v v}^{-1}$ ), nos tubos que não recebem cloreto foram adicionados 4,4 mL de etanol:água 80:20 ( $\text{v v}^{-1}$ ). Em todos os tubos foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de acetato de potássio ( $\text{CH}_3\text{COOK } 1 \text{ mol L}^{-1}$ ). O branco foi preparado com 4,9 mL de etanol 80:20 ( $\text{v v}^{-1}$ ) e 100  $\mu\text{L}$  de acetato de potássio. Após 40 min mediu-se a absorvância em espectrofotômetro (modelo UV-VIS Lambda 25, Perkin Elmer) a 415 nm. O TFT determinado com base na curva de calibração de quercetina como padrão, os resultados foram expressos em  $\text{mg EQ g}^{-1}$ .

#### **4.8 Análise de componentes principais (ACP)**

Todos os resultados obtidos, por meio das análises químicas ABTS, DPPH, FRAP, Fenólicos e Flavonoides e NIRS, foram submetidos à análise multivariada. A ACP foi realizada no *software* Pirouette 4.7 (Infometrix) para examinar a relação entre amostras e análise de referência através dos gráficos de pontuações e carregamentos. O pré-processamento dos dados utilizados neste estudo foi auto escalado (para os espectros de NIR), onde cada variável é centrada na média e

dividida pelo seu desvio padrão, e pré-processamento centrado na média (para as análises químicas), onde a média de cada coluna é subtraída da própria coluna.

#### 4.9 NIRS

Um espectrômetro de NIR com transformada de Fourier da BRUKER MPA foi utilizado para a obtenção dos espectros de todas as amostras. Para se obter a melhor relação entre as amostras e os espectros faz-se necessário o ajuste do equipamento para cada tipo de amostra. Para as amostras sólidas de própolis (bruta e macerada) o equipamento foi configurado com resolução de  $32\text{ cm}^{-1}$  com 64 acumulações, utilizando o suporte para sólidos (copo de quartzo) com rotação. Cada amostra de própolis no estado sólido (bruto e macerada) teve seu espectro adquirido em triplicata no equipamento.

Para os extratos da própolis líquidos (EEP e EEPC) o equipamento foi configurado com resolução de  $8\text{ cm}^{-1}$  com 32 acumulações, utilizando cubeta de quartzo com bomba de sucção como suporte. Para todas as amostras a região estudada será entre  $13330 - 4000\text{ cm}^{-1}$ . Os extratos líquidos (EEP e EEPC) foram produzidos em duplicata os espectros adquiridos em triplicata no equipamento.

A construção dos modelos de calibração multivariada foi realizada utilizando o *software* Opus 7.2 quant 2 de Bruker (Bremen, Alemanha). A validação dos modelos será realizada por validação cruzada *leave-one-out* e grupo de teste por validação interna e externa.

#### 4.10 Análise por CLAE-DAD

A identificação e quantificação dos ácidos fenólicos e flavonoides nas amostras de própolis foi feita utilizando um Cromatógrafo a Líquido VARIAN – 900 LC acoplado a um detector de arranjo de fotodiodo e uma coluna de fase reversa MICROSORB-MV C18 (250 mm x 4,6 mm x 5  $\mu\text{m}$ ). Os padrões utilizados foram: ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido trans cinâmico, rutina,

quercetina, pinocembrina, crisina, canferol, mangiferina e galangina. As condições do equipamento foram: fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>, temperatura da coluna de 30°C, composição da fase móvel: (A) H<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (99,8:0,2 v v<sup>-1</sup>); (B) CH<sub>3</sub>OH (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 µg mL<sup>-1</sup> a 60 µg mL<sup>-1</sup>.

#### 4.11 Validação de métodos analíticos e cromatográficos

##### 4.11.1 Linearidade

A linearidade foi calculada através da curva de calibração dos padrões utilizados. Utilizando como base os valores de coeficiente de determinação e correlação.

##### 4.11.2 LD e LQ

O LD (limite de detecção) foi calculado por meio da curva de calibração com auxílio da equação 6 (ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009):

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{a} \quad (\text{equação 6})$$

Onde s é o desvio padrão da repostas (ou coeficiente linear da equação de reta), e a é o coeficiente angular da curva analítica.

O LQ (limite de quantificação) foi calculado através da equação 7 (ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009):

$$LQ = 10 \times \frac{s}{a} \quad (\text{equação 7})$$

Onde  $s$  é o desvio padrão da repostas (ou coeficiente linear da equação de reta), e  $a$  é o coeficiente angular da curva analítica.

#### 4.11.3 Precisão

A precisão foi calculada a partir da do coeficiente de variação (CV) utilizando a equação 8 (RIBANI et al., 2004; CHRISTIAN; DASGUPTA; SCHUG, 2014).

$$CV \% = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{equação 8})$$

Onde  $s$  é o desvio padrão absoluto dos resultados dos dados ou ainda da recuperação, e  $\bar{x}$  é a média das medições dos dados ou das recuperações.

#### 4.11.4 Seletividade

A  $\alpha$  (equação 9) foi calculada através da razão entre o tempo de retenção (TR) de dois picos, e por definição deve sempre ser maior que 1 (CHRISTIAN; DASGUPTA; SCHUG, 2014):

$$\alpha = \frac{TR_2}{TR_1} \quad (\text{equação 9})$$

#### 4.11.5 Resolução (Rs)

A  $R_s$  foi determinada pela utilização da equação 10 (CHRISTIAN; DASGUPTA; SCHUG, 2014):

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(w_{b1} + w_{b2})} \times \frac{1}{2} \quad (\text{equação 10})$$

Onde  $t_{R1}$  e  $t_{R2}$  são os tempos de retenção dos dois picos e  $w_{b1}$  e  $w_{b2}$  é a largura da linha de bases destes mesmos picos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Teor de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante

Os extratos etanólicos de própolis foram avaliados quanto ao teor de compostos fenólicos e flavonoides totais e atividade antioxidante pelos métodos de sequestro dos radicais DPPH e ABTS e método de redução do Ferro FRAP. A Tabela 6 mostra a faixa utilizada de dados utilizados para a calibração e validação dos modelos.

Tabela 6 - Dados das análises de referencia

Modelo	Calibração (70% das amostras)					Validação (30% das amostras)				
	Min	Max	Média	d.p.	CV (%)	Min	Max	Média	d.p.	CV (%)
Fenólicos (mg EAG g <sup>-1</sup> )	6,35	48,7	20,2	10,1	49,9	5,66	97,6	22,4	16,3	73,0
DPPH (μmol de Trolox g <sup>-1</sup> )	6,35	262	55,0	46,1	83,7	6,11	267	59,6	54,3	91,2
ABTS (μmol de Trolox g <sup>-1</sup> )	44,0	1,04 k	331	233	70,2	39,3	1,13 k	324	252	77,7
FRAP (μmol de Fe <sup>2+</sup> g <sup>-1</sup> )	61,9	1,83 k	534	365	68,3	74,6	1,79 k	586	450	76,7
Flavonoides (mg EQ g <sup>-1</sup> )	0,122	16,51	3,65	3,27	89,7	0,117	38,8	5,70	7,03	123

Fonte: Dados da pesquisa.

É possível observar que os valores obtidos para os parâmetros avaliados apresentaram uma faixa espectral muito ampla em todos os modelos e os coeficientes de variação (CV) calculados foram elevados, confirmando a variação amostral.

Dentre as amostras, a 2-ARP foi a que apresentou o maior valor para o teor de compostos fenólicos e flavonoides, 97,6 mg EAG g<sup>-1</sup> e 38,8 mg EQ g<sup>-1</sup> respectivamente, sendo o valor de fenólicos cerca de 17 vezes superior ao menor

valor encontrado no grupo amostral, e o valor de flavonoides 350 vezes superior ao menor. Esta amostra também apresentou elevada atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH (136  $\mu\text{mol}$  de Trolox  $\text{g}^{-1}$ ), indicativo da influência do clima e flora na composição química e qualidade da própolis. As abelhas coletam material em uma área muito próxima de onde está inserida a colônia, desta forma, a própolis produzida apresenta características do local onde o material é coletado (CALEGARI, et al., 2017).

A Tabela 7 apresenta os valores encontrados na literatura para TCFT e TFT. É possível verificar que a amostra 2-ARP apresenta teores superiores à maioria das amostras avaliadas e descritas na literatura.

Tabela 7 - Dados da literatura para TFT e TCFT

Atividades	Fenólicos (mg EAG $\text{g}^{-1}$ )	Flavonoides (mg EQ $\text{g}^{-1}$ )	Local
Autores			
NARIMANE et al. (2017)	0,81 a 9,97	0,70 a 3,53	Beni Belaid na Algéria
DOS SANTOS <sup>b</sup> et al. (2017)	34,9 a 189,5	0,74 a 0,93	Blumenau-SC
CASTRO et al. (2007)	22,03 a 94,98	2,47 a 47,31	Entre Rios-BA Brumadinho-MG

Fonte: Dados da literatura.

A amostra 2-CMP, apresentou o maior valor para atividade antioxidante avaliada pelo método de sequestro do radical ABTS (1130  $\mu\text{mol}$  de Trolox  $\text{g}^{-1}$ ) sendo este valor cerca de 28 vezes superior ao menor encontrado. Esta amostra também apresentou elevado teor de compostos fenólicos totais e poder redutor do ferro FRAP (42,9 mg EAG  $\text{g}^{-1}$  e 1571  $\mu\text{mol}$  de  $\text{Fe}^{2+}$   $\text{g}^{-1}$  respectivamente). A amostra 2-CLP foi a mais eficiente em sequestrar o radical DPPH (267  $\mu\text{mol}$  de Trolox  $\text{g}^{-1}$ ).

A Tabela 8 mostra os valores encontrados na literatura para as análises de DPPH e ABTS. O valor da amostra 2-CMP para ABTS se apresentou de acordo com a literatura, já amostra 2-CLP encontra-se superior a algumas amostras.

Tabela 8 - Dados da literatura para DPPH e ABTS

Atividades	DPPH ( $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ )	ABTS ( $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ )	Local
Autores			
OLDONI et al. (2015)	31,6 a 87,5	-	Dois Vizinhos-PR
BONVEHÍ; GUTIÉRREZ (2011)	-	420 a 1430	Espanha
MIHAI et al. (2011)	510 a 1240	-	Transilvânia

Fonte: Dados da literatura.

A amostra 1-TBS apresentou o maior potencial redutor de Ferro ( $1830 \mu\text{mol de Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$ ). Este valor apresenta-se superior a alguns estudos descritos na literatura (Tabela 9).

Tabela 9 - Dados da literatura para FRAP

Atividades	FRAP ( $\mu\text{mol de Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$ )	Local
Autores		
COTTICA et al. (2011)	528 a 1365	Maringá-PR
MIHAI et al. (2011)	740 a 2540	Transilvânia
CALEGARI et al. (2017)	89,7 a 286,7	Dois Vizinhos-PR

Fonte: Dados da literatura.

## 5.2 Espectros NIRS

Os espectros das amostras de própolis bruta, própolis macerada, EEP e EEPC foram obtidos conforme descrito no item 4.2. Na sequência, foram testados alguns pré-tratamentos para a escolha dos melhores parâmetros para construção dos modelos.

É possível verificar por meio da Figura 34, que todas as amostras possuem o mesmo perfil espectral, com bandas de absorção nas faixas de  $8000 - 9000$ ,  $6000 - 7000$ ,  $4500 - 6000$  e  $4000 - 4500 \text{ cm}^{-1}$ , diferindo apenas em suas intensidades, sendo estas, respectivamente características de 2ª *overtone*s de C-H, primeiras combinações de *overtone*s de C-H,  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  e também 1ª *overtone*s de N-H (STUART, 2004; BRUKER, 2007; KUMAR, 2015).

Entre  $5556$  e  $6000 \text{ cm}^{-1}$  as bandas podem corresponder a 1ª *overtone*s de C-H. Entre  $5000 \text{ cm}^{-1}$  e  $5300 \text{ cm}^{-1}$  as bandas representam combinações O-H e 2ª

*overtones* de estiramento C=O. A região de 4000 a 4500  $\text{cm}^{-1}$  representa a combinação das moléculas, combinações de N-H, O-H, C-H + C-H e C-H + C-C (STUART, 2004; BRUKER, 2007; KUMAR, 2015).

Os espectros das amostras de própolis maceradas (Figura 13) apresentaram perfil espectral muito semelhante à própolis bruta (Figura 34), com redução de aproximadamente metade da intensidade de absorvância das amostras brutas.

As considerações de combinações moleculares, estiramentos, 1ª e 2ª *overtones* feitas para os espectros para as amostras de própolis brutas podem ser consideradas para as amostras de própolis maceradas.

Os espectros obtidos a partir das amostras do extrato etanólico de própolis apresentam bandas de absorção mais definidas (Figura 41) do que as amostras de própolis sólidas sem processo de extração.

É possível verificar que as combinações moleculares, estiramentos, 1ª e 2ª *overtones* antes relatados, continuam para estes extratos, o que pode ser justificado pelo fato de existir menos interferentes, pois além de passarem por um processo de extração oriundo de um planejamento fatorial que contém as melhores condições para se extrair os compostos com atividade antioxidante. Bandas definidas estão presentes também no extrato de própolis concentrado.

### 5.3 Desenvolvimento dos modelos de calibração e validação

A espectroscopia de NIRS associada a ferramentas quimiométricas apresenta inúmeras vantagens como simplicidade, baixo custo, rapidez e geração de poucos resíduos ou nenhum.

Existem na literatura atual estudos que desenvolvem modelos de calibração por PLS para diversos fins FLYBORG et al. (2017), BANO et al. (2017), LI; PAN; ZHAO, (2017), GONZÁLEZ-MARTÍN et al. (2017), SOARES et al. (2017), COSTA et al. (2017), BORBA et al. (2017), para própolis alguns são relatados PIERINE et al. (2016), REVILLA et al. (2017), BARBEIRA et al. (2013), XU et al. (2013), CALEGARIB et al. (2017), GUZELMERIC et al. (2018).

A construção dos modelos PLS se efetivou com base no item 4.9, onde o *software* correlacionou todos os resultados obtidos com as análises de referência

com os espectros gerados do equipamento. O *software* empregado para a construção dos modelos auxilia na redução de erros, o que implica diretamente em uma melhor qualidade destes, alguns pré-processamentos são sugeridos, bem como, definição do número de variáveis latentes, valor de RMSECV, remoção de *outliers* e região espectral, pois os espectros podem apresentar regiões com baixa informação espectral.

A confiabilidade e validade dos modelos foram verificadas por meio dos parâmetros, coeficiente de correlação  $R^2$ , erros padrões de calibração, validação, predição externa e interna cruzada (FERREIRA et al., 1999; KONZEN, et al., 2003). Os valores de  $R^2$ , RMSECV, RPD e L foram retirados do parâmetro de validação interna (*Cross Validation*).

Para a construção dos modelos foi utilizado o *software* Opus 7.2 quant 2 alimentado com as informações obtidas dos resultados de todas as análises descritas nos itens 4.3 a 4.7. Para cada tipo de própolis avaliada no equipamento (sólida, macerada, EEP e EEPC) um modelo foi gerado para cada análise, totalizando assim 20 modelos. Na construção dos modelos alguns *outliers* foram observados e indicados através do *software*, em geral todos os modelos apresentaram *outliers*, porém nem todos foram descartados, pois em alguns casos os elevados números de descarte geram modelos tendenciosos com pouca validade. Isso foi verificado através dos parâmetros de validação descritos em 3.6.3.

### 5.3.1 Modelos gerados para o método de redução do Ferro (FRAP)

Utilizando o *software* Opus 7.2 quant 2. foi possível comparar diversos pré-processamentos sobre os modelos criados (Tabela 10). Estas comparações foram realizadas conforme descrito no item 4.9. Neste estudo, os melhores modelos foram considerados aqueles que apresentam menor valor de RMSECV, RMSEC, RMSEP, RMSEE, maiores valores de RPD, RER, e  $R^2$ , bem como, a razão RMSEP/RMSECV, pois estas medidas são feitas para verificar de forma quantitativa a precisão média da capacidade preditiva dos modelos quimiométricos (CONZEN, 2006).

Tabela 10 - Comparação de modelos PLS para a análise de FRAP

FRAP	Faixa Espectral cm <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup>	RAW			R <sup>2</sup>	SG + COE			R <sup>2</sup>	SG + 2D			R <sup>2</sup>	SG + MSC			SG			
			RMSECV	RPD	L		RMSECV	RPD	L		RMSECV	RPD	L		RMSECV	RPD	L	RMSECV	RPD	L	
Bruta	7513,9 – 6094 a 5461,9 – 4597,9	-0,06	385	0,977	10	0,51	261	1,49	10	<b>0,78</b>	<b>172</b>	<b>2,26</b>	<b>10</b>	0,52	257	1,56	10	0,46	274	1,44	10
Macerada	9411,7 – 6094,5 a 5461,9 – 4243	0,72	190	1,89	9	<b>0,87</b>	<b>129</b>	<b>2,8</b>	<b>9</b>	0,63	218	1,65	9	0,23	315	1,15	9	0,72	189	1,91	9
EEP	9400 – 5446,4 a 4601,7 – 4424,2	0,55	242	1,51	10	0,57	237	1,54	10	<b>0,85</b>	<b>140</b>	<b>2,6</b>	<b>10</b>	0,69	202	1,8	10	0,77	174	2,1	10
EEPC	6102,1 – 4597,8	0,65	228	1,7	10	0,73	199	1,95	10	0,53	265	1,46	10	<b>0,80</b>	<b>172</b>	<b>2,25</b>	<b>10</b>	0,65	229	1,69	10

Fonte: Dados da pesquisa.

Notas: unidade para RMSECV é dada em  $\mu\text{mol de Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$

A partir da Tabela 10 é possível concluir que o melhor modelo para própolis bruta foi obtido com o pré-processamento SG (*Savitzky–Golay*) + 2D (segunda derivada). Estes métodos de pré-processamento são ideais para se aplicar a sinais analíticos que apresentem picos estreitos entre si (SG), e também são capazes de remover os efeitos de adição dos modelos, ajustar a linha base e eliminar a tendência linear desta (2D) (RINNAN; VAN DEN BERG; ENGELSEN, 2009). A região utilizada para a construção deste modelo foi 7513,9 – 6094 a 5461,9 – 4597,9  $\text{cm}^{-1}$  e este modelo apresentou um elevado valor de  $R^2$ : 0,78 se comparado ao valor do modelo sem pré-processamento (RAW), o qual apresentou  $R^2$ : -0,06. Este modelo, obtido a partir da própolis bruta apresentou valor de RMSECV de 172  $\mu\text{mol de Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$  com valor de RPD de 2,26 e 10 variáveis latentes.

O melhor modelo de própolis macerada para FRAP foi obtido com pré-processamento SG + COE (*Constant Offset Elimination*). O pré-processamento COE desloca de forma linear os espectros, de modo a definir que valores mínimos de Y sejam iguais à zero (TRIPATHI; MISHRA, 2009; KUMAR, 2015). A região espectral deste modelo foi de 9411,7 – 6094,5 a 5461,9 – 4243  $\text{cm}^{-1}$  e o valor encontrado para  $R^2$  foi o maior (0,87) quando comparado aos demais pré-processamentos. O valor do RMSECV foi 129  $\mu\text{mol de Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$  com 9 variáveis latentes e RPD de 2,8.

Para o EEP, o valor mais baixo de RMSECV (140  $\mu\text{mol de Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$ ) foi encontrado quando se utilizou o pré-processamento 2D, foram obtidos valores de  $R^2$ : 0,85, RPD: 2,6 e número de variáveis latentes igual a 10. A região espectral selecionada foi de 9400 – 5446,4 a 4601,7 – 4424,2  $\text{cm}^{-1}$ .

Quando os espectros foram obtidos a partir de EEPC, o pré-processamento SG + MSC foi o que resultou no melhor modelo. A MSC (*Multiplicative Scatter Correction*) é um dos métodos mais aplicados para a correção de dados em NIR (RINNAN; VAN DEN BERG; ENGELSEN, 2009) pois, ajuda a remover flutuações da linha de base, imperfeições, aspectos físicos das amostras (tamanho e forma de partículas) da matriz dos dados, de modo que somente as informações químicas sejam utilizadas (SOUZA; POPPI, 2012; SOUZA et al., 2013). Os valores calculados de  $R^2$ : 0,80, RMSECV: 172  $\mu\text{mol de Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$ , RPD: 2,25 e número de variáveis latentes de 10. Este modelo foi construído com a menor região espectral (6102,1 – 4597,8  $\text{cm}^{-1}$ ) se comparado aos demais, onde ao menos duas regiões foram selecionadas de cada espectro.

De maneira geral pode-se perceber que os pré-processamentos melhoram a qualidade dos modelos, isso se deve ao fato de os mesmos possuírem ferramentas capazes de corrigir, suavizar, ajustar, remover efeitos indesejáveis nos espectros, permitindo que somente informações espectrais de interesse sejam incluídas no modelo.

No Apêndice 1 estão apresentados todos os espectros de NIRS com os pré-processamentos testados e apresentados na Tabela 10 para os modelos de FRAP. As figuras evidenciam as diferenças dos pré-processamentos nas regiões espectrais selecionadas e em todo o espectro.

A 1D (primeira derivada) e 2D conseguem destacar os ombros espectrais além de minimizar o efeito de inclinações provocadas na linha de base dos espectros (BEEBE et al., 1998)

O melhor modelo PLS para própolis para o parâmetro de FRAP foi obtido para própolis macerada, este modelo apresenta os seguintes parâmetros (Tabela 11):

Tabela 11 - Resultados de calibração e validação para o modelo de FRAP

FRAP	Calibração		Validação	
		<i>Cross</i>		<i>Test Set</i>
R <sup>2</sup>	0,95	0,87		0,89
RMSEC ( $\mu\text{mol de Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$ )	73,49	-		-
RMSECV ( $\mu\text{mol de Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$ )	-	129		-
RMSEP ( $\mu\text{mol de Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$ )	-	-		113
RMSEE ( $\mu\text{mol de Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$ )	81,5	-		-
RPD	4,9	2,9		3,1
RER	-	13,62		13,33
RMSEP/RMSECV			0,87	

Fonte: Dados da pesquisa.

Para o modelo de FRAP o valor de R<sup>2</sup> de 0,87 foi obtido, indicando uma boa robustez do modelo. Os valores de RER encontrados (RER: 13,62 e RER: 13,33) se apresentam bons de acordo com a literatura.

O valor de RPD da validação interna (*Cross*) encontrado foi de 2,9 (Tabela 11), sabe-se que valores entre 2,5 e 3 correspondem a uma boa precisão de predição (Tabela 4). Valor de RPD para a validação externa (*Test Set*) RPD: 3,1 e para a calibração RDP: 4,9 estão excelentes para precisão de predição (Tabela 4).

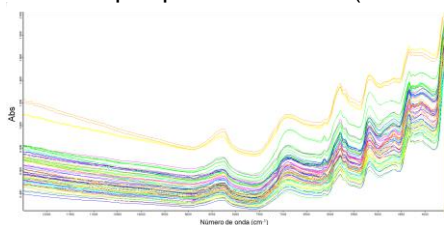
A razão RMSEP/RMSECV de 0,87 indica um modelo robusto (Tabela 4), os erros de RMSEC, RMSECV, RMSEP e RMSEE estão baixos, indicando que o

modelo de FRAP indica a própolis macerada como melhor modelo, com menores erros de calibração e validação possíveis.

As Figuras 13 e 14 mostram o espectro de própolis macerada em toda faixa do espectro de NIR e na região selecionada do modelo respectivamente, já as Figuras 15 e 16 representam o espectro de própolis macerada aplicada o pré-processamento SG + COE em toda região do espectro e na região selecionada do modelo respectivamente.

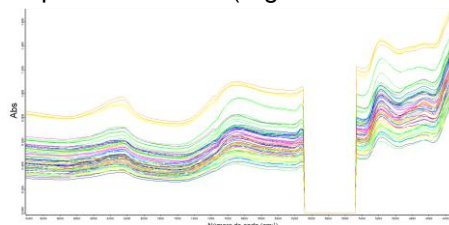
Alguns trabalhos da literatura também utilizaram modelos PLS, com é o caso de MAZUREK et al. (2017), onde desenvolveram um modelo PLS para FRAP para a determinação de atividade antioxidante e conteúdo de polifenóis em chips.

Figura 13 – Espectros de NIRS própolis macerada sem pré-processamento (toda região)



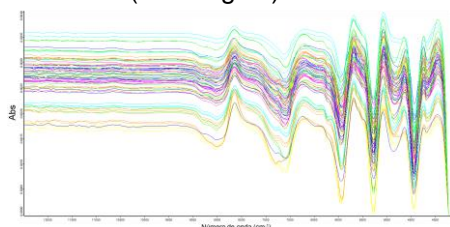
Fonte: Do *software* Opus 7.2 quant 2.

Figura 14 - Espectros de NIRS própolis macerada sem pré-processamento (região selecionada)



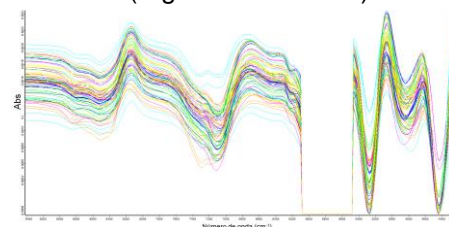
Fonte: Do *software* Opus 7.2 quant 2.

Figura 15 - Espectros de NIRS própolis macerada com SG + COE (toda região)



Fonte: Do *software* Opus 7.2 quant 2.

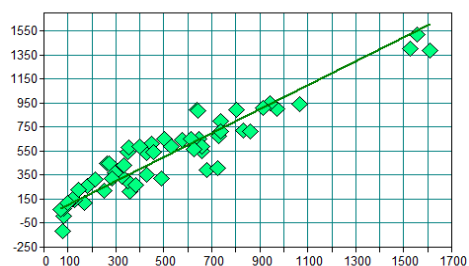
Figura 16 - Espectros de NIRS própolis macerada com SG + COE (região selecionada)



Fonte: Do *software* Opus 7.2 quant 2.

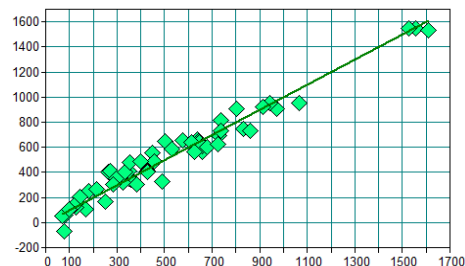
As figuras 17, 18 e 19 mostram as curvas de calibração e validação externa e interna, ambas apresentam ótimos valores para  $R^2$  (Tabela 11).

Figura 17 - *Prediction vs True (Validation Cross)* R<sup>2</sup>: 0,87



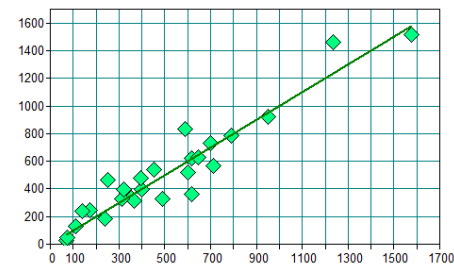
Fonte: Do *software* Opus 7.2 quant 2.

Figura 18 - *Fit vs True (Calibration)* R<sup>2</sup>: 0,95



Fonte: Do *software* Opus 7.2 quant 2.

Figura 19 - *Prediction vs True (Validation Test Set)* R<sup>2</sup>: 0,89



Fonte: Do *software* Opus 7.2 quant 2.

### 5.3.2 Modelos para ABTS

Os resultados obtidos no método de sequestro do radical ABTS foram relacionados com os espectros para geração dos modelos. Para os espectros obtidos a partir da própolis bruta, a região espectral selecionada variou entre 6109,9 – 4597,9  $\text{cm}^{-1}$ , enquanto para a própolis macerada duas regiões foram selecionadas 7513,9 – 6094,5 a 4613,3 – 4243  $\text{cm}^{-1}$ , indicando que para amostras maceradas mais regiões apresentam informações importantes para a construção do modelo. De maneira análoga, o modelo de ABTS gerado a partir do EEP também indicou duas regiões 9400 – 7498,4 a 6102,1 – 5446,4  $\text{cm}^{-1}$ , enquanto para o EEPC a região selecionada foi de 6102,1 – 4597,8  $\text{cm}^{-1}$ .

Tabela 12 - Comparação de modelos PLS para a análise de ABTS

ABTS	Faixa Espectral $\text{cm}^{-1}$	RAW				<i>Min - Max normalization</i>				SG + 1D + MSC				2D				1D + MSC			
		R <sup>2</sup>	RMSECV	RPD	L	R <sup>2</sup>	RMSEC V	RPD	L	R <sup>2</sup>	RMSEC V	RPD	L	R <sup>2</sup>	RMSEC V	RPD	L	R <sup>2</sup>	RMSEC V	RPD	L
Bruta	6109,9 – 4597,9	0,41	138	1,31	3	<b>0,71</b>	<b>96,2</b>	<b>1,88</b>	<b>3</b>	0,41	138	1,31	3	0,35	146	1,25	3	0,44	135	1,35	3
			RAW			<i>SG + Min - Max normalization</i>				<b>SG + 1D + MSC</b>				SG + 2D				SG + MSC			
Macerada	7513,9 – 6094,5 a 4613,3 – 4243	0,38	149	1,29	10	0,40	148	1,29	10	<b>0,81</b>	<b>83</b>	<b>2,3</b>	<b>10</b>	0,73	98,7	1,93	10	0,53	130	1,47	10
			RAW			<i>Min - Max normalization</i>				SG + 1D + MSC				<b>2D</b>				1D + MSC			
EEP	9400 – 7498,4 a 6102,1 – 5446,4	0,65	137	1,7	10	0,65	136	1,7	10	0,73	120	1,94	10	<b>0,82</b>	<b>98,5</b>	<b>2,36</b>	<b>10</b>	0,70	125	1,85	10
			RAW			<i>Min - Max normalization</i>				SG + 1D + MSC				2D				<b>1D + MSC</b>			
EEPC	6102,1 – 4597,8	0,55	155	1,51	10	0,58	151	1,55	10	0,61	144	1,62	10	0,65	136	1,71	10	<b>0,68</b>	<b>130</b>	<b>1,8</b>	<b>10</b>

Fonte: Dados da pesquisa.

Notas: unidade para RMSECV é dada em  $\mu\text{mol de Trolox g}^{-1}$

O pré-processamento *Min-Max normalization*, aplicado nos espectros obtidos em própolis bruta, apresentou os melhores resultados e, como consequência, gerou o melhor modelo para ABTS para este tipo de amostra. O valor de  $R^2$  foi igual 0,71; RMSECV de 96,2  $\mu\text{mol}$  de Trolox  $\text{g}^{-1}$ , baixo valor de RPD (1,88) e 3 variáveis latentes. Este número é baixo se comparado aos modelos anteriormente citados, quanto menor o número de variável latente mais robusto se torna o modelo.

Para a geração do modelo a partir da própolis macerada, a utilização de um maior número de pré-processamentos (SG + 1D + MSC) gerou um modelo com os melhores parâmetros de qualidade, o valor do  $R^2$  obtido foi de 0,81 e o RMSECV de 83  $\mu\text{mol}$  de Trolox  $\text{g}^{-1}$ , o menor valor dentre todos os modelos, indicando um seguro modelo. O valor de RPD encontrado de 2,3 pode ser considerado bom com 10 variáveis latentes.

Para os extratos de própolis (EEP e EEPC) também foram obtidos bons resultados para os parâmetros investigados. Sendo para EEP  $R^2$ : 0,82, RMSECV: 98,5  $\mu\text{mol}$  de Trolox  $\text{g}^{-1}$  e RPD: 2,36 com 10 variáveis latentes. Para o EEPC os valores foram de  $R^2$ : 0,68 (valor baixo), RMSECV: 130  $\mu\text{mol}$  de Trolox  $\text{g}^{-1}$  e RPD: 1,8 com 10 variáveis latentes. Os pré-processamentos também diferiram para EEP e EEPC, sendo 2D e 1D + MSC respectivamente.

No Apêndice 1 do trabalho encontram-se os espectros de NIRS com todos os pré-processamentos utilizados na Tabela 12 para os modelos de FRAP, as figuras evidenciam as diferenças dos pré-processamentos nas regiões espectrais seletivas como também em todo o espectro.

O melhor modelo PLS para captura do radical ABTS dentre todos os tipos de própolis passadas no equipamento foi obtido em própolis macerada, esse modelo foi desenvolvido com o pré-processamento SG + 1D + MSC com a região selecionada variando entre 7513,9 – 6094,5 a 4613,3 – 4243  $\text{cm}^{-1}$ . No trabalho de KREPPER et al. (2018) para a determinação do conteúdo de gordura em hambúrguer de galinha usando NIRS, também utilizou o pré-processamento SG e MSC para gerar seus modelos. O trabalho desenvolvido por PIZZI et al. (2018) para avaliação das características energéticas do bagaço de azeitona também utilizou 1D como pré-processamento. Os valores obtidos para  $R^2$  indica curvas com elevado grau de predição (Tabela 13). Os valores de RPD e RER também estão de acordo com a literatura (WILLIAMS; NORRIS, 2001; KUMAR, 2015; PÁSCOA; MAGALHÃES; LOPES, 2013).

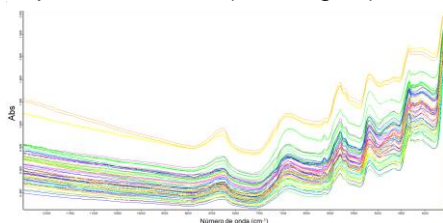
Tabela 13 - Resultados de calibração e validação para o modelo de ABTS

ABTS	Calibração	Validação	
		Cross	Test Set
R <sup>2</sup>	0,92	0,81	0,89
RMSEC ( $\mu\text{mol de Trolox g}^{-1}$ )	52,56	-	-
RMSECV ( $\mu\text{mol de Trolox g}^{-1}$ )	-	83	-
RMSEP ( $\mu\text{mol de Trolox g}^{-1}$ )	-	-	56,6
RMSEE ( $\mu\text{mol de Trolox g}^{-1}$ )	58,1	-	-
RPD	3,63	2,3	3,17
RER	-	12,27	11,60
RMSEP/RMSECV			0,68

Fonte: Dados da pesquisa.

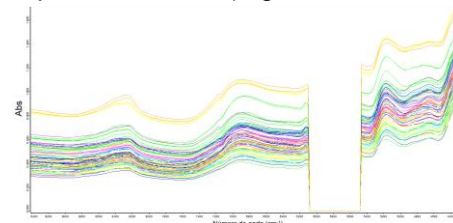
As Figuras 20 e 21 mostram o espectro de própolis macerada em toda faixa do espectro de NIRS e na região selecionada do modelo respectivamente, já as Figuras 22 e 23 representam o espectro de própolis macerada aplicada o pré-processamento SG + 1D + MSC em toda região do espectro e na região selecionada do modelo respectivamente.

Figura 20 - Espectros de NIRS própolis macerada sem pré-processamento (toda região)



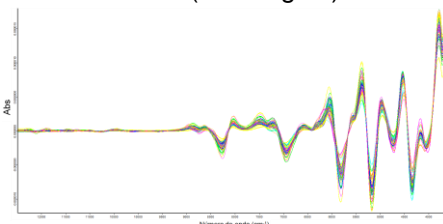
Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

Figura 21 - Espectros de NIRS própolis macerada sem pré-processamento (região selecionada)



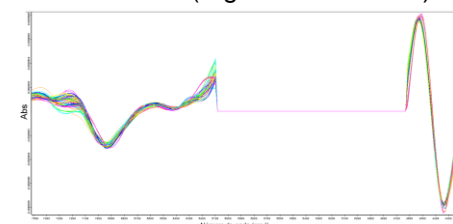
Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

Figura 22 - Espectros de NIRS própolis macerada com SG + 1D + MSC (toda região)



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

Figura 23 - Espectros de NIRS própolis macerada com SG + 1D + MSC (região selecionada)

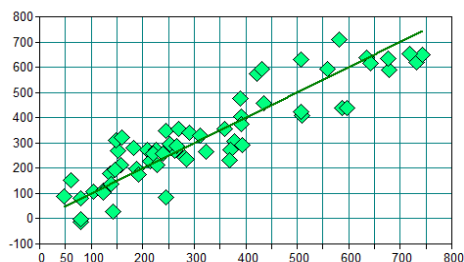


Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

O modelo descrito acima apresenta uma razão de RMSEP/RMSECV indicativa de um modelo pouco robusto de acordo com a Tabela 4. Os valores de R<sup>2</sup> e erros de calibração e validação esta de acordo com a literatura, bem como os valores de RPD (Tabela 4), indicando assim um bom modelo.

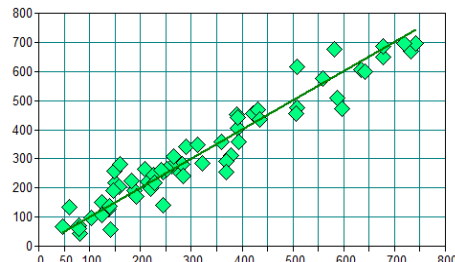
As Figuras 24, 25 e 26 mostram as curvas de calibração e validação externa e interna.

Figura 24 - *Prediction vs True (Validation Cross)*  $R^2$ : 0,81



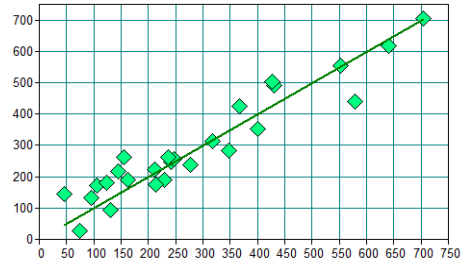
Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

Figura 25 - *Fit vs True (Calibration)*  $R^2$ : 0,92



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

Figura 26 - *Prediction vs True (Validation Test Set)*  $R^2$ : 0,89



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

### 5.3.3 Modelos para Fenólicos

Para o modelo de própolis Bruta é evidente a necessidade de um pré-processamento, pois o valor de  $R^2$  observado foi de -0,51. Com a utilização combinada dos pré-processamentos SG + 1D; 2D e 1D + MSC os resultados para  $R^2$  encontrados foram de: -0,09;  $R^2$ : -0,11 e  $R^2$ : -0,16 respectivamente, ainda considerados muito baixos. A partir do pré-processamento *Min-Max normalization* foi possível obter o melhor ajuste para fenólicos em própolis bruta, com  $R^2$  igual a 0,61. A região selecionada para o melhor modelo de fenólicos para própolis bruta foi de  $9411,7 - 6094,5 \text{ cm}^{-1}$ , este apresentou um RMSECV de  $5,08 \text{ mg EAG g}^{-1}$  e RPD: 1,62 com 9 variáveis latentes.

Tabela 14 - Comparação de modelos PLS para a análise de fenólicos

Fenólicos	Faixa Espectral cm <sup>-1</sup>	RAW				Min - Max normalization				SG + 1D				2D				1D + MSC						
		R <sup>2</sup>	RMSEC V	RPD	L	R <sup>2</sup>	RMSEC V	RPD	L	R <sup>2</sup>	RMSEC V	RPD	L	R <sup>2</sup>	RMSEC V	RPD	L	R <sup>2</sup>	RMSEC V	RPD	L			
Bruta	9411,7 – 6094,5	-0,51	10,1	0,81 3	9	<b>0,61</b>	<b>5,08</b>	<b>1,62</b>	<b>9</b>	-0,09	8,62	0,96	9	-0,11	8,69	0,95 6	9	-0,16	8,87	0,93 1	9			
			RAW			SG + Min - Max normalization					<b>SG + 1D</b>					SG +2D					SG +1D + MSC			
Macerada	9411,7 - 7498,5 a 4613,3 - 4428,1	0,67	5,38	1,75	7	0,45	6,97	1,36	7	<b>0,90</b>	<b>2,95</b>	<b>3,22</b>	<b>7</b>	0,79	4,28	2,22	7	0,72	4,95	1,92	7			
			RAW			Min - Max normalization					SG + 1D					<b>2D</b>					1D + MSC			
EEP	9400 – 7498,4 a 6102,1 – 5446,4	0,75	4,95	2,04	10	0,81	4,3	2,35	10	0,85	3,83	2,64	10	<b>0,87</b>	<b>3,57</b>	<b>2,83</b>	<b>10</b>	0,87	3,62	2,79	10			
			RAW			Min - Max normalization					SG + 1D					2D					<b>1D + MSC</b>			
EEPC	9400 – 7498,4 a 6102,1 – 5446,4	0,71	5,69	1,86	10	0,64	6,29	1,69	10	0,69	5,89	1,8	10	0,60	6,63	1,6	10	<b>0,75</b>	<b>5,29</b>	<b>2</b>	<b>10</b>			

Fonte: Dados da pesquisa.

Notas: unidade para RMSECV é dada em mg EAG g<sup>-1</sup>.

Os modelos PLS de fenólicos para EEP e EEPC possuem em comum a mesma faixa espectral 9400 – 7498,4 a 6102,1 – 5446,4  $\text{cm}^{-1}$ , contudo cada um possui um pré-processamento específico que melhor se adequa a cada tipo de espectro. Para o EEP o pré-processamento foi 2D com  $R^2$ : 0,87; RMSECV: 3,57 mg EAG  $\text{g}^{-1}$  e RPD: 2,83 com 10 variáveis latentes.

Para o modelo PLS de fenólicos com EEPC, o melhor pré-processamento foi 1D + MSC, com 10 variáveis latentes. Este modelo apresentou um  $R^2$  de 0,75; RMSECV: 5,29 mg EAG  $\text{g}^{-1}$  e RPD de 2.

Para facilitar o entendimento sobre o que acontece com cada espectro citado acima, o Apêndice 1 deste trabalho contém a comparação visual dos espectros de cada modelo presente na Tabela 14.

O melhor modelo de TCFT foi construído utilizando a para própolis macerada, este apresentou ótimos valores para todos os parâmetros avaliados (Tabela 15). Este modelo apresentou o maior  $R^2$  e maior RPD comparado aos demais da Tabela – 14, com  $R^2$ : 0,90 e RPD 3,22; apresentou valor de RMSECV de 2,95 mg EAG  $\text{g}^{-1}$  com 7 variáveis latentes, na faixa espectral de 9411,7 - 7498,5 a 4613,3 - 4128,1  $\text{cm}^{-1}$ . O pré-processamento para foi SG + 1D. Os valores de  $R^2$  foram para a calibração de  $R^2$ : 0,95; validação interna (*Cross*)  $R^2$ : 0,90 e validação externa (*Test Set*)  $R^2$ : 0,88; isso indica correlações muito boas entre os valores que foram preditos e os verdadeiros (Tabela 4). Os valores dos erros RMSEC, RMSECV, RMSEP, RMSEE encontram-se muito baixos, indicando assim bons modelos (Tabela 4).

Tabela 15 - Resultados de calibração e validação para o modelo fenólicos

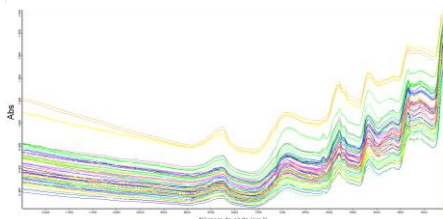
Fenólicos	Calibração	Validação	
		<i>Cross</i>	<i>Test Set</i>
$R^2$	0,95	0,90	0,88
RMSEC (mg EAG $\text{g}^{-1}$ )	2,01	-	-
RMSECV (mg EAG $\text{g}^{-1}$ )	-	2,95	-
RMSEP (mg EAG $\text{g}^{-1}$ )	-	-	2,95
RMSEE (mg EAG $\text{g}^{-1}$ )	2,17	-	-
RPD	4,69	2,3	3,04
RER	-	12,32	12,22
RMSEP/RMSECV			1

Fonte: Dados da pesquisa.

As Figuras 27 e 28 mostram o espectro de própolis macerada em toda faixa do espectro de NIR e na região selecionada do modelo respectivamente, já as Figuras 29 e 30 representam o espectro de própolis macerada aplicada o pré-

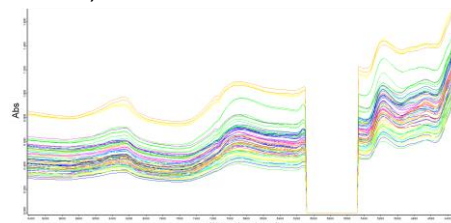
processamento SG + 1D em toda região do espectro e na região selecionada do modelo respectivamente.

Figura 27 - Espectros de NIRS própolis macerada sem pré-processamento (toda região)



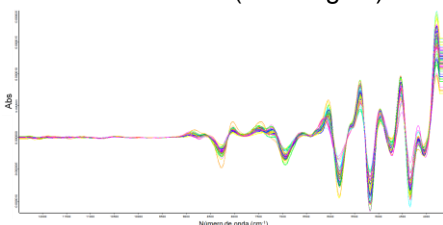
Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

Figura 28 - Espectros de NIRS própolis macerada sem pré-processamento (região selecionada)



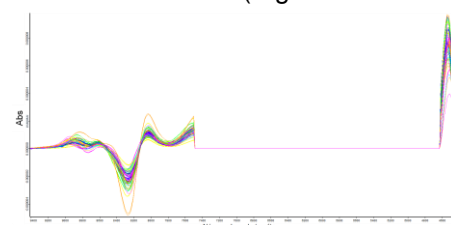
Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

Figura 29 - Espectros de NIRS própolis macerada com SG + 1D (toda região)



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

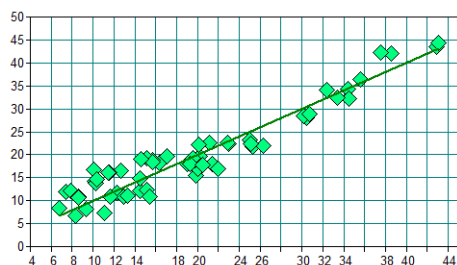
Figura 30 - Espectros de NIRS própolis macerada com SG + 1D (região selecionada)



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

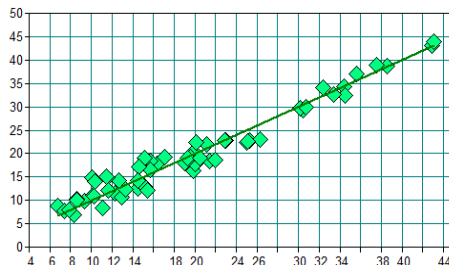
Os valores de RPD e RER estão de acordo com a literatura. A razão RMSEP/RMSECV encontrada indica uma perfeita robustez do modelo (Tabela 4). As figuras 31, 32 e 33 mostram as curvas de calibração e validação externa e interna.

Figura 31 - *Prediction vs True (Validation Cross)* R<sup>2</sup>: 0,90



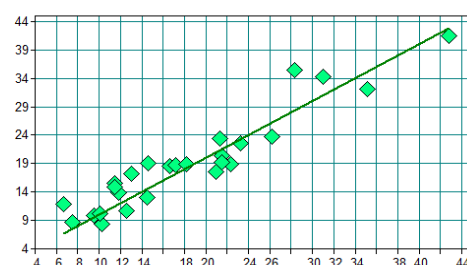
Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

Figura 32 - *Fit vs True (Calibration)* R<sup>2</sup>: 0,95



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

Figura 33 - *Prediction vs True (Validation Test Set)* R<sup>2</sup>: 0,88



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

### 5.3.4 Modelos para DPPH

A atividade antioxidante para captura do radical DPPH foi utilizada também como modelo por DE OLIVEIRA et al. (2018), seu trabalho tem o objetivo de determinar polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante em amostras de *Brassica oleracea*.

A partir dos resultados apresentados na é possível verificar que todos os modelos gerados apresentaram valores de  $R^2$  superiores a 80,0. Para própolis bruta o  $R^2$  foi de 0,80; própolis macerada  $R^2$ : 0,86; EEP  $R^2$ : 0,85; e EEPC  $R^2$ : 0,88. De maneira análoga todos os modelos apresentam valores de RPD superior a 2,2, são eles: para própolis bruta RPD: 2,26, própolis macerada: 2,76, EEP RPD: 2,61 e EEPC RPD: 2,92 (Tabela 16).

O melhor número de variável latente foi encontrado para própolis macerada, com um valor de 7, indicando que este modelo apresenta uma melhor robustez que própolis bruta, EEP e EEPC (ambos com 10 variáveis latentes).

O melhor modelo de captura do radical DPPH para própolis bruta selecionou a região espectral de 9411,7 – 7498,5  $\text{cm}^{-1}$ , o pré-processamento empregado aqui foi SG + COE, com um RMSECV de 21,9  $\mu\text{mol}$  de Trolox  $\text{g}^{-1}$ . Já o melhor modelo para própolis macerada utilizou a região de 9411,7 - 7498,5 a 6109,9 - 5770,5  $\text{cm}^{-1}$ , com o pré-processamento 1D + SNV (*Standard Normal Variate*), este é o único modelo dentre todos os demais que utilizou o SNV, o RMSECV para este foi 17,3  $\mu\text{mol}$  de Trolox  $\text{g}^{-1}$ . Na região entre 9400 – 8447,3 a 6102,1 – 5446,4  $\text{cm}^{-1}$  informações foram retiradas para a construção do melhor modelo PLS de EEP, com o pré-processamento 2D e RMSECV de 17,6  $\mu\text{mol}$  de Trolox  $\text{g}^{-1}$ . E finalmente o melhor modelo para EEPC utilizou o pré-processamento 1D + MSC com RMSECV de 18  $\mu\text{mol}$  de Trolox  $\text{g}^{-1}$  e região espectral de 9400 – 7498,4 a 6102,1 – 5446,4  $\text{cm}^{-1}$  (Tabela 16).

Tabela 16 - Comparação de modelos PLS para a análise de captura do radical DPPH

DPPH	Faixa Espectral cm <sup>-1</sup>	RAW				SG + COE				SG + 1D + SNV				SG + 2D			SG + 1D + MSC				
		R <sup>2</sup>	RMSECV	RPD	L	R <sup>2</sup>	RMSECV	RPD	L	R <sup>2</sup>	RMSECV	RPD	L	R <sup>2</sup>	RMSECV	RPD	L	R <sup>2</sup>	RMSECV	RPD	L
Bruta	9411,7 – 7498,5	-0,01	49,9	1	10	<b>0,80</b>	<b>21,9</b>	<b>2,26</b>	<b>10</b>	-0,11	52,2	0,94 <sub>8</sub>	10	12,11	46,4	1,07	10	-0,15	53,3	0,92 <sub>9</sub>	10
			RAW				SG + COE				<b>1D + SNV</b>				2D					1D + MSC	
Macerada	9411,7 - 7498,5 a 6109,9 - 5770,5	0,52	33	1,45	7	0,84	19,1	2,5	7	<b>0,86</b>	<b>17,3</b>	<b>2,76</b>	<b>7</b>	0,54	32,2	1,49	7	0,76	23,2	2,09	7
			RAW				SG + COE				1D + SNV				<b>2D</b>					1D + MSC	
EEP	9400 – 8447,3 a 6102,1 – 5446,4	0,57	29,9	1,54	10	0,71	24,4	1,89	10	0,72	24,3	1,05	10	<b>0,85</b>	<b>17,6</b>	<b>2,61</b>	<b>10</b>	0,73	23,6	1,95	10
			RAW				SG + COE				1D + SNV				2D					<b>1D + MSC</b>	
EEPC	9400 – 7498,4 a 6102,1 – 5446,4	0,78	24,7	2,14	10	0,81	22,9	2,3	10	0,81	22,5	2,34	10	0,78	24,5	2,15	10	<b>0,88</b>	<b>18</b>	<b>2,92</b>	<b>10</b>

Fonte: Dados da pesquisa.

Notas: unidade para RMSECV é dada em  $\mu\text{mol de Trolox g}^{-1}$ .

O pré-processamento SNV foi o melhor apenas para a própolis macerada, este pré-processamento é o segundo mais utilizado depois de MSC para a correção da dispersão dos dados (RINNAN; VAN DEN BERG; ENGELSEN, 2009; SYVILAY et al., 2015).

Para facilitar o entendimento sobre o que acontece com cada espectro citado acima, o Apêndice 1 deste trabalho contém a comparação visual dos espectros de cada modelo presente na Tabela 16.

Através da Tabela 16 é possível verificar que para o parâmetro DPPH, o melhor modelo foi gerado com própolis bruta, este modelo utilizou o pré-processamento SG + COE, e região espectral de 9411,7 – 7498,5  $\text{cm}^{-1}$ . Verifica-se que os valores de  $R^2$  estão acima de 0,80; para a calibração o valor de  $R^2$  foi de 0,96, para validação interna (*Cross*)  $R^2$ : 0,80; e de  $R^2$ : 0,93 para validação externa (*Test Set*), esses valores para o coeficiente de determinação indicam juntamente com os valores de RMSEC, RMSECV, RMSEE e RMSEP um correlação satisfatória entre os valores que preditos e os valores reais (experimentais).

Tabela 17 - Resultados de calibração e validação para o modelo de DPPH

DPPH	Calibração	Validação	
		<i>Cross</i>	<i>Test Set</i>
$R^2$	0,96	0,80	0,93
RMSEC ( $\mu\text{mol de Trolox g}^{-1}$ )	9,53	-	-
RMSECV ( $\mu\text{mol de Trolox g}^{-1}$ )	-	21,9	-
RMSEP ( $\mu\text{mol de Trolox g}^{-1}$ )	-	-	13,4
RMSEE ( $\mu\text{mol de Trolox g}^{-1}$ )	10,8	-	-
RPD	5,19	2,26	4,24
RER	-	19,37	18,29
RMSEP/RMSECV			0,61

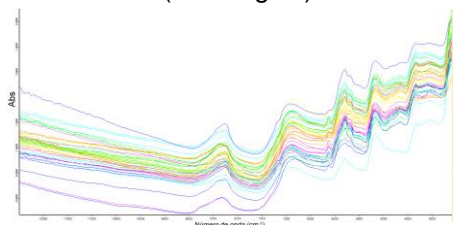
Fonte: Dados da pesquisa.

Dois ótimos valores para RPD foram obtidos para os parâmetros de calibração e validação externa (*Test Set*), RPD: 5,19 e RPD: 4,24 respectivamente (Tabela 17), valores de RPD acima de 3 geram modelos com uma excelente precisão de predição. Outros valores obtidos muito superiores ao indicado (Tabela 4) são RER: 19,37 e RER: 18,29 para a validação interna e externa respectivamente.

As Figuras 34 e 35 mostram o espectro de própolis bruta em toda faixa do espectro de NIR e na região selecionada do modelo respectivamente, já as Figuras 36 e 37 representam o espectro de própolis macerada aplicada o pré-

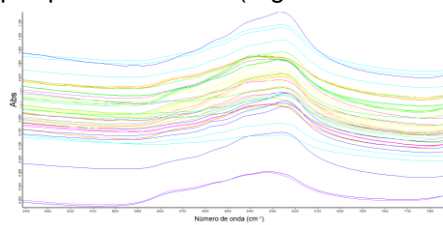
processamento SG + COE em toda região do espectro e na região selecionada do modelo respectivamente.

Figura 34 - Espectros de NIRS própolis bruta sem pré-processamento (toda região)



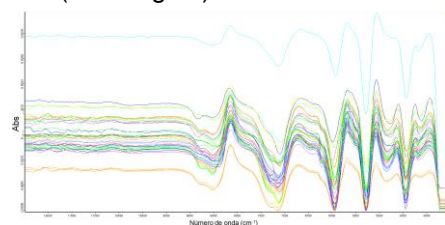
Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

Figura 35 - Espectros de NIRS própolis bruta sem pré-processamento (região selecionada)



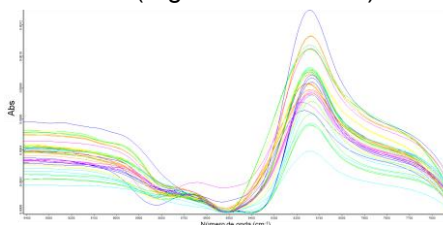
Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

Figura 36 - Espectros de NIRS própolis bruta com SG + COE (toda região)



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

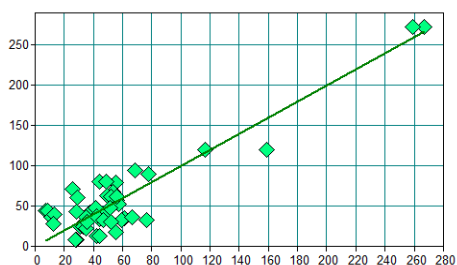
Figura 37 - Espectros de NIRS própolis bruta com SG + COE (região selecionada)



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

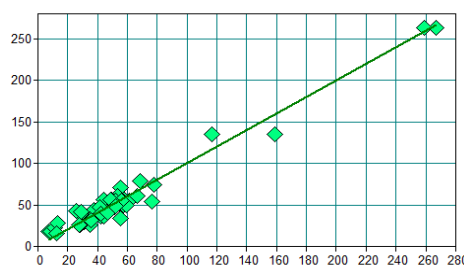
As Figuras 38, 39 e 40 mostram as curvas de calibração e validação externa e interna.

Figura 38 - *Prediction vs True (Validation Cross)* R<sup>2</sup>: 0,80



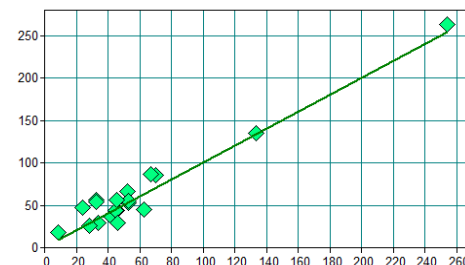
Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

Figura 39 - *Fit vs True (Calibration)* R<sup>2</sup>: 0,96



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

Figura 40 - *Prediction vs True (Validation Test Set)* R<sup>2</sup>: 0,93



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

### 5.3.5 Modelos para Flavonoides

Os modelos PLS de flavonoides construídos apresentaram duas particularidades, a primeira é que para as amostras no estado sólido, bruta e macerada, os melhores modelos se moldaram com o mesmo pré-processamento e número de variáveis latentes, SG + 1D + MSC e 8 variáveis.

O modelo PLS para própolis bruta apresentou  $R^2$ : 0,65, RMSECV: 3,29 mg EQ g<sup>-1</sup> e RPD: 1,71, para este modelo a região espectral selecionada foi entre 9411,7 - 7498,5 a 6109,9 - 5446,4 cm<sup>-1</sup>. Já o modelo de própolis macerada apresentou  $R^2$ : 0,69, RMSECV: 2,08 mg EQ g<sup>-1</sup> e RPD: 1,8 na região espectral de 6109,9 – 4597,9 cm<sup>-1</sup> (Tabela 18).

Tabela 18 - Comparação de modelos PLS para a análise de Flavonoides

Flavonoides	Faixa Espectral cm <sup>-1</sup>	RAW				SG + 1D + MSC				SG + 2D				SG + COE				SG + SNV			
		R <sup>2</sup>	RMSECV	RPD	L	R <sup>2</sup>	RMSECV	RPD	L	R <sup>2</sup>	RMSECV	RPD	L	R <sup>2</sup>	RMSECV	RPD	L	R <sup>2</sup>	RMSECV	RPD	L
Bruta	9411,7 - 7498,5 a 6109,9 - 5446,4	0,21	4,99	1,13	8	<b>0,65</b>	<b>3,29</b>	<b>1,71</b>	<b>8</b>	0,32	4,63	1,23	8	0,33	4,61	1,23	8	0,44	4,19	1,36	8
Macerada	6109,9 – 4597,9	0,49	2,67	1,41	8	<b>0,69</b>	<b>2,08</b>	<b>1,8</b>	<b>8</b>	0,55	2,5	1,5	8	0,48	2,71	1,39	8	0,42	2,85	1,32	8
EEP	6102,1 – 5446,4	0,77	1,56	2,09	9	0,81	1,35	2,35	9	<b>0,88</b>	<b>1,12</b>	<b>2,91</b>	<b>9</b>	0,82	1,36	2,41	9	0,81	1,39	2,35	9
EEPC	9400 – 6098,3 a 5450,3 a 5022,1	-0,06	3,68	0,96	9	0,53	2,43	1,47	9	<b>0,70</b>	<b>1,93</b>	<b>1,85</b>	<b>9</b>	0,10	3,37	1,06	9	0,08	3,41	1,05	9

Fonte: Dados da pesquisa.

Notas: unidade para RMSECV é dada em mg EQ g<sup>-1</sup>.

A segunda particularidade para os modelos PLS de flavonoides, é que as amostras no estado líquido (EEP e EEPC) apresentaram o mesmo pré-processamento 2D e o mesmo número de variáveis latentes 9. O modelo de EEP apresentou valor de  $R^2$ : 0,88; RMSECV: 1,12 mg EQ g<sup>-1</sup> e RPD: 2,91. O modelo de EEPC apresentou  $R^2$  de 0,70; RMSECV: 1,93 mg EQ g<sup>-1</sup> e RPD de 1,85. A região espectral para EEP foi 6102,1 – 5446,4 cm<sup>-1</sup> e para EEPC 9400 – 6098,3 a 5450,3 a 5022,1 cm<sup>-1</sup>.

Para facilitar o entendimento sobre o que acontece com cada espectro citado acima, o Apêndice 1 deste trabalho contém a comparação visual dos espectros de cada modelo presente na Tabela 18.

Através da Tabela 18 é possível averiguar que o melhor modelo para TFT foi construído utilizando EEP, neste modelo os valores de  $R^2$  ficaram muito bons, principalmente o  $R^2$  da calibração do modelo com  $R^2$ : 0,92 (Tabela 19). De maneira análoga o melhor valor de RPD também foi para a calibração (3,13). Os demais valores de RPD também indicam ótimos modelos com boa capacidade de predição (Tabela 4).

Tabela 19 - Resultados de calibração e validação para o modelo de flavonoides

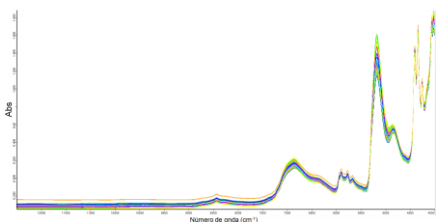
Flavonoides	Calibração	Validação	
		Cross	Test Set
$R^2$	0,92	0,88	0,86
RMSEC (mg EQ g <sup>-1</sup> )	0,89	-	-
RMSECV (mg EQ g <sup>-1</sup> )	-	1,12	-
RMSEP (mg EQ g <sup>-1</sup> )	-	-	1,1
RMSEE (mg EQ g <sup>-1</sup> )	0,93	-	-
RPD	3,65	2,91	2,77
RER	-	14,9	15,60
RMSEP/RMSECV			0,98

Fonte: Dados da pesquisa.

A partir da robustez, é possível sugerir que o modelo de flavonoides para EEP é ideal, indicando uma perfeita robustez do modelo. Os valores de RER encontrados para *cross* e *test set* indicam modelos com alto grau de predição (Tabela 4).

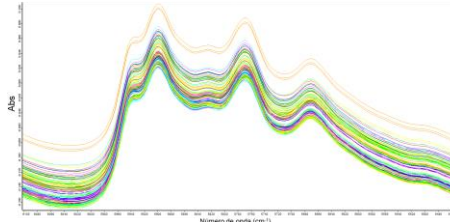
As Figuras 41 e 42 mostram o espectro de EEP em toda faixa do espectro de NIR e na região selecionada do modelo respectivamente, já as Figuras 43 e 44 representam o espectro de própolis macerada aplicada o pré-processamento 2D em toda região do espectro e na região selecionada do modelo respectivamente.

Figura 41 - Espectros de NIRS para EEP sem pré-processamento (toda região)



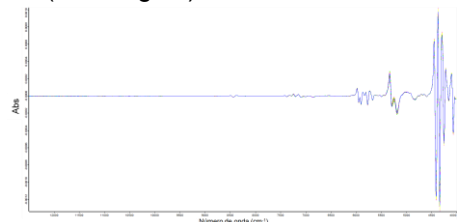
Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

Figura 42 - Espectros de NIRS para EEP sem pré-processamento (região selecionada)



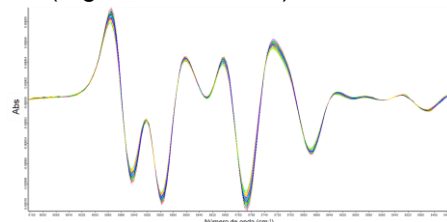
Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

Figura 43 - Espectros de NIRS para EEP com 2D (toda região)



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

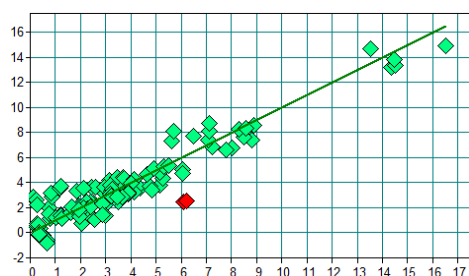
Figura 44 - Espectros de NIRS para EEP com 2D (região selecionada)



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

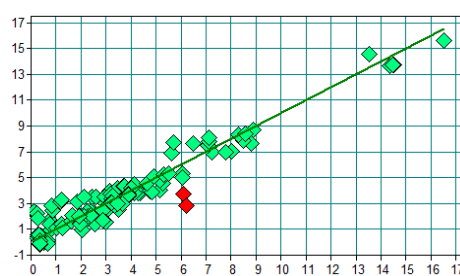
As Figuras 45, 46 e 47 representam as curvas de calibração e validação interna e externa.

Figura 45 - *Prediction vs True (Validation Cross)*  $R^2$ : 0,88



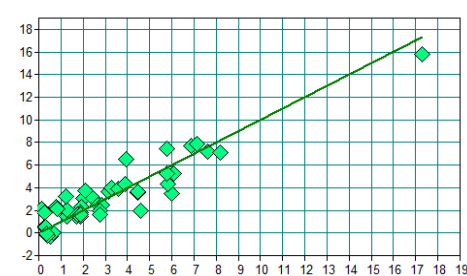
Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

Figura 46 - *Fit vs True (Calibration)*  $R^2$ : 0,92



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

Figura 47 - *Prediction vs True (Validation Test Set)*  $R^2$ : 0,86



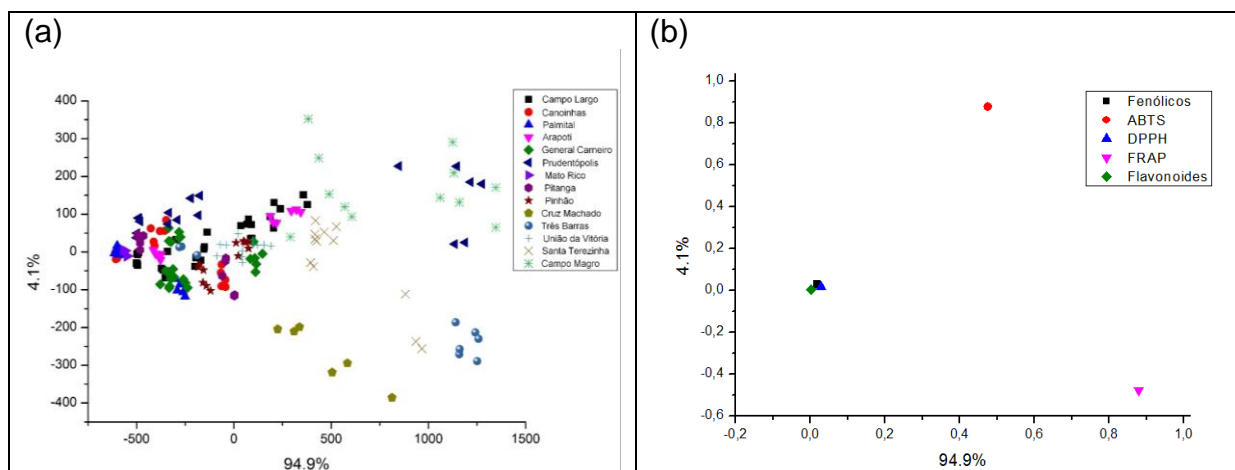
Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

## 5.4 Resultados ACP

Após os resultados obtidos por meio das análises químicas (ABTS, DPPH, FRAP, Fenólicos e Flavonoides) descritas no item 4 deste trabalho, e após gerados os espectros de NIRS (item 4.9), todos foram submetidos a ACP (item 4.8), com o

objetivo de verificar através dos gráficos de pontuações (*scores*) (Figura 48a) e carregamentos (*loadings*) (Figura 48b) se existe algum agrupamento entre as amostras.

Figura 48 – Gráfico de (a) *scores* (b) *loadings* da ACP para todas as análises de bancada.



Fonte: Autoria própria.

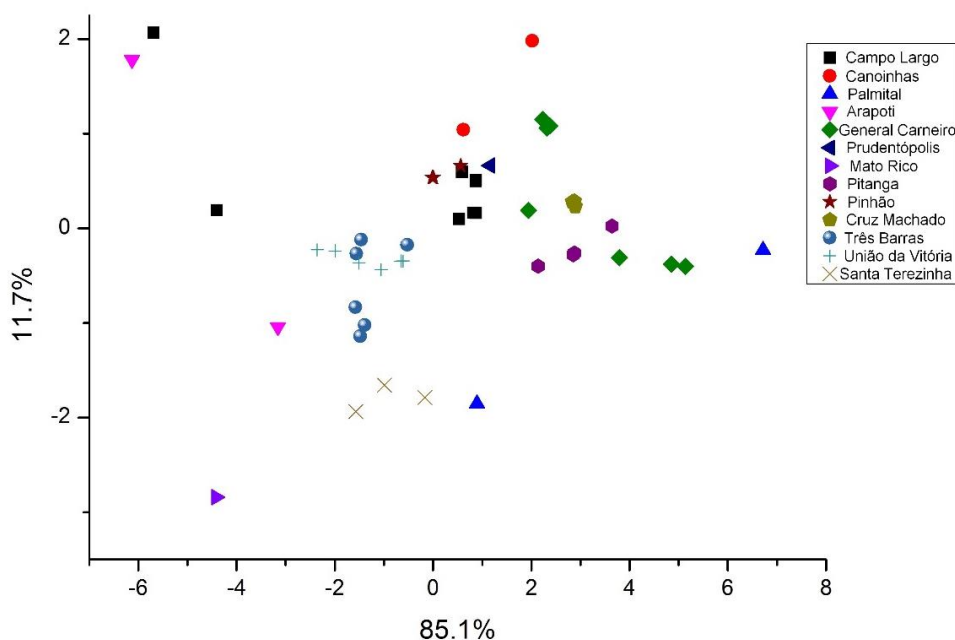
A Figura 48 representa todos os resultados das análises de ABTS, DPPH, FRAP, fenólicos e flavonoides, para própolis bruta, classificados de acordo com a cidade de origem de todas as própolis. A componente principal no eixo x (CP1) consegue explicar 94,9% de toda a variação (distribuição) dos dados e a componente do eixo y (CP2) representa apenas 4,1% (Figura 48), contudo observa-se que em geral não há grupamentos individuais de cada cidade, isso significa que mesmo amostras de uma mesma cidade apresentam características distintas uma das outras.

Deste modo, pode-se inferir que além da localização outras características têm influenciado na própolis. Contudo observam-se grupamentos tendenciosos das amostras de Cruz Machado – PR, Três Barras – SC, Santa Terezinha – SC, Prudentópolis - PR e Campo Magro – PR. Através do gráfico de *loadings* (Figura 49) que as amostras da cidade de Campo Magro – PR e Prudentópolis – PR apresentam uma correlação positiva com a análise de ABTS, já as amostras da cidade de Cruz Machado – PR e Três Barras – SC apresentam uma correlação positiva com a análise de FRAP, as demais cidades apresentam uma correlação positiva com os parâmetros de TCFT, DPPH e TFT.

O trabalho de CALEGARI et al. (2017) desenvolvido com abelhas da cidade de Dois Vizinhos – PR, mostrou que a sazonalidade influencia diretamente na composição química de própolis, esse estudo mostrou também que a suplementação alimentar é outro fator que influencia na qualidade deste material.

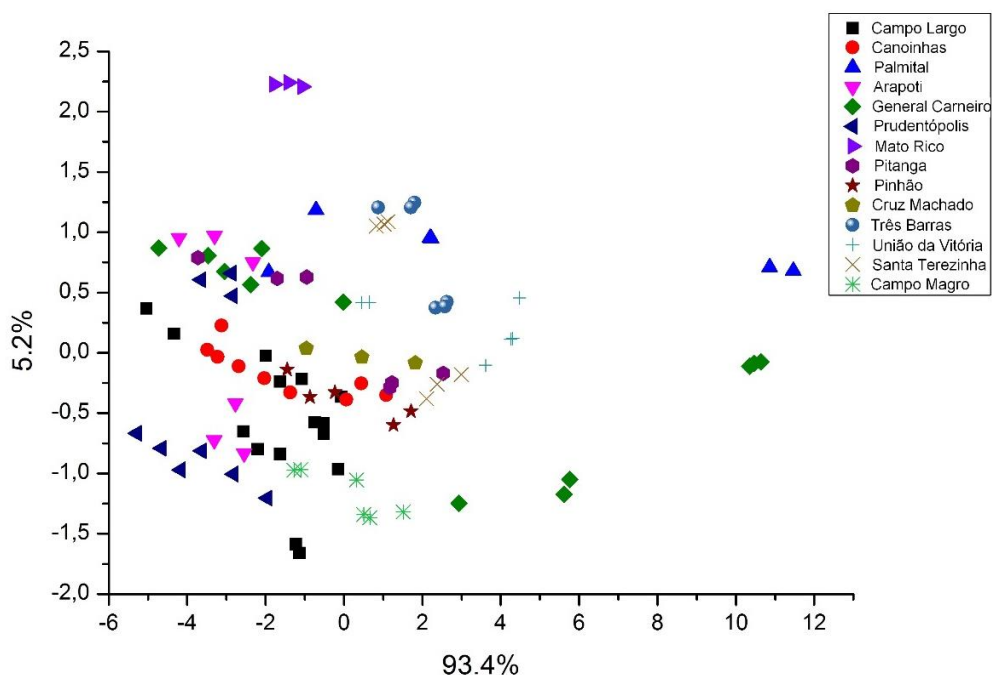
Como descrito em 4.9 às amostras de própolis foram analisadas no equipamento de NIR na forma bruta, macerada, e líquida de duas maneiras (EEP e EEPC). Os dados coletados de absorvância de cada espectro e número de onda foram utilizados para gerar a ACP. As Figuras 50 e 51 representam a ACP para as própolis em estado sólido.

Figura 49 - Gráfico de ACP para espectros de própolis bruta



Fonte: Autoria própria.

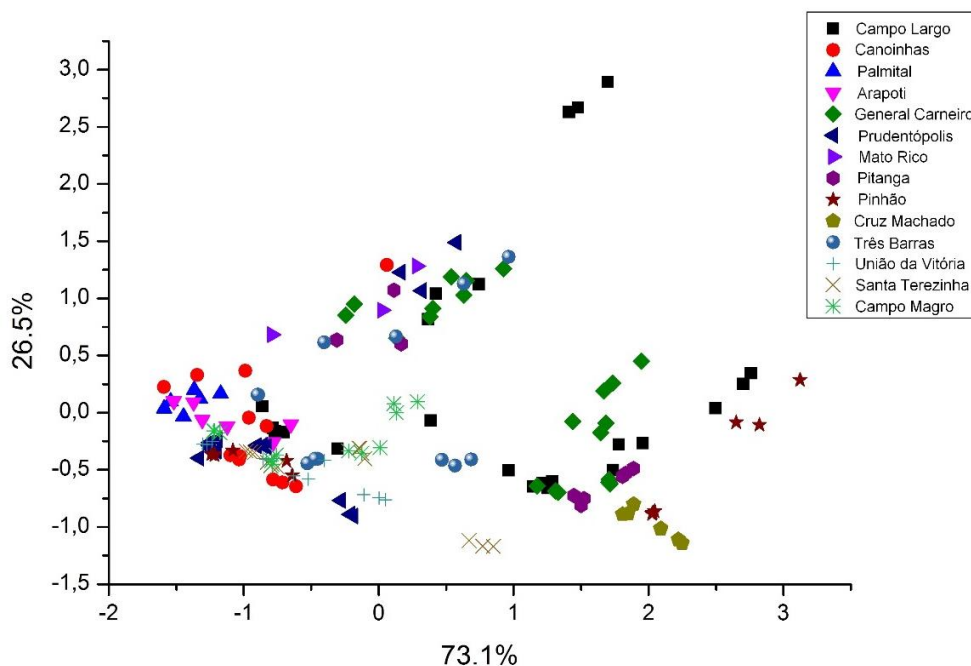
Figura 50 - Gráfico de ACP para espectros de própolis macerada



Fonte: Autoria própria.

É possível verificar através das duas figuras acima que não há agrupamento das amostras em relação às cidades de origem das própolis. A componente principal da própolis macerada (PC1) modela 93,4% dos dados e a PC2: 5,2%. Na figura 50 notamos que as amostras da cidade de Três Barras – SC estão juntas com as amostras de União da Vitória – PR, da mesma forma pode-se verificar que as amostras de Pitanga, Cruz Machado e General Carneiro estão muito próximas umas das outras, indicando perfis químicos muito próximos (Figura 50).

Figura 51 - Gráfico de ACP para espectros de EEP e EEPC



Fonte: Autoria própria.

A Figura 52 acima retrata a ACP para as própolis em estado líquido (EEP e EEPC) que foram iguais, isso significa que a análise de componentes principais não diferem as características entre as amostras de EEP e EEPC para os espectros de NIR. Ambos os componentes principais modelam a mesma porcentagem das matrizes dos dados, PC1: 73,1% e PC2: 26,5%. É possível verificar através da Figura 52 que há algumas tendências de agrupamentos nas amostras de General Carneiro – PR, Cruz Machado – PR, Campo Magro – PR, Canoinhas – SC e Santa Terezinha - SC

## 5.5 Otimização e validação da metodologia analítica por CLAE-DAD

Para que um método cromatográfico apresente validade, o mesmo deve atender a alguns parâmetros como: seletividade, linearidade, sensibilidade, exatidão, precisão, resolução, resolução, LD, LQ, etc. Várias condições foram testadas como composição da fase móvel e gradiente (Tabela 20) antes de definir a melhor condição para separar os ácidos fenólicos e flavonoides de interesse, (item 4.10).

Na literatura foram encontrados trabalhos que utilizam o método cromatográfico para identificar e quantificar uma série de compostos químicos em amostras de própolis (KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004; FALCÃO et al., 2013; AHN et al., 2007; ZHANG et al., 2014; GÜLÇİN et al., 2010; AL-ANI et al., 2018; PRATAMI et al., 2018; ZHANG et al., 2017; BALATA et al., 2018; BUENO-SILVA et al., 2017; UTISPAN; CHITKUL; KOONTONGKAEW, 2017). Mesmo com tantos métodos para CLAE desenvolvidos, faz-se a necessidade da criação de um modelo próprio, pois a própolis brasileira é muito complexa, apresentando uma variabilidade química muito grande entre as amostras, um novo método a ser desenvolvido deve ser ajustável para determinadas amostras e mistura de padrões para conseguir elevada eficiência, resolução e seletividade em um pequeno espaço de tempo.

#### 5.5.1 Seletividade do método desenvolvido

Foram realizados 8 testes, descritos na Tabela 20. Os parâmetros escolhidos para selecionar o melhor método dentre os avaliados foi a seletividade em função do tempo (item 4.11.4), já que um método cromatográfico deve ser rápido devido ao gasto com reagentes, tempo de máquina, energia, técnicos, etc. Uma boa seletividade auxilia na obtenção de boa resolução (4.11.5), garantindo a qualidade do método cromatográfico.

Tabela 20 - Métodos de CLAE- DAD desenvolvidos

(continua)			
Método	Composição da fase móvel (FM) ( $v v^{-1}$ )	Fluxo (FM) e temperatura da coluna	Gradiente em % de B Tempo (min)
1	A – H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH (99,9:0,1) B – CH <sub>3</sub> CN:CH <sub>3</sub> COOH (99,1:01)	1 mL min <sup>-1</sup> 30°C	0 _ 5% 2 _ 20% 15 _ 25% 25 _ 85% 30 _ 85% 33 _ 20% 36 _ 5% 45 _ 5%

Tabela 20 - Métodos de CLAE- DAD desenvolvidos

(conclusão)			
Método	Composição da fase móvel (FM) ( $v v^{-1}$ )	Fluxo (FM) e temperatura da coluna	Gradiente em % de B Tempo (min)
2	A – H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH (98:2) B – H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> CN:CH <sub>3</sub> COOH (58:2:40)	1 mL min <sup>-1</sup> 30°C	0 _ 5%
			2 _ 20%
			15 _ 25%
			25 _ 85%
			30 _ 85%
			33 _ 20%
36 _ 5%			
45 _ 5%			
3	A – H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH (98:2) B - H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> CN:CH <sub>3</sub> COOH (58:2:40)	1 mL min <sup>-1</sup> 30°C	0 _ 10%
			5 _ 20%
			15 _ 25%
			25 _ 30%
			35 _ 85%
			40 _ 95%
45 _ 95%			
50 _ 10%			
4	A – H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH (99,9:0,1) B - CH <sub>3</sub> CN:CH <sub>3</sub> COOH (99,9:0,1)	1 mL min <sup>-1</sup> 30°C	0 _ 35%
			60 _ 50%
			65 _ 35%
			70 _ 35%
5	A - H <sub>2</sub> O:H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (99,8:0,2) B – CH <sub>3</sub> OH	1 mL min <sup>-1</sup> 30°C	0 _ 10%
			25 _ 64%
			33 _ 75%
			38 _ 10%
			43 _ 10%
6	A - H <sub>2</sub> O:H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (99,8:0,2) B – CH <sub>3</sub> OH	1 mL min <sup>-1</sup> 30°C	0 _ 20%
			21 _ 64%
			29 _ 75%
			49 _ 85%
			54 _ 20%
			59 _ 20%
7	A - H <sub>2</sub> O:H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (99,8:0,2) B – CH <sub>3</sub> OH	1 mL min <sup>-1</sup> 30°C	0 _ 20%
			21 _ 64%
			32 _ 75%
			37 _ 95%
			38 _ 95%
			41 _ 20%
			51 _ 20%
			50 _ 5%
			55 _ 5%
8	A - H <sub>2</sub> O:H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (99,8:0,2) B – CH <sub>3</sub> OH	1 mL min <sup>-1</sup> 30°C	0 _ 30%
			15 _ 64%
			26 _ 75%
			28 _ 95%
			29 _ 95%
			32 _ 30%
			42 _ 30%

Fonte: Dados da pesquisa.

Notas: H<sub>2</sub>O: água; CH<sub>3</sub>COOH: ácido acético; CH<sub>3</sub>CN: acetonitrila; H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: ácido fosfórico; CH<sub>3</sub>OH: metanol.

Uma mistura de padrões foi injetada em cada um dos métodos descritos na Tabela 20 para verificar o perfil químico e capacidade de separação de cada método. A Tabela 21 apresenta os valores do tempo de retenção e seletividade:

Tabela 21 - Tempos de retenção e seletividade dos métodos

Método	Sinal	TR (min)	$\alpha$	Método	TR (min)	$\alpha$
1	Ácido cafeico	7,41	1,03	2	6,49	2,61
	Mangiferina	7,69	1,05		16,99	1,34
	Ácido cumárico	8,11	1,14		22,92	1,01
	Ácido ferúlico	9,29	1,03		23,35	1,06
	Rutina	9,57	1,05		24,89	1,04
	Ácido trans cinâmico	10,05	1,95		25,89	1,03
	Quercetina	19,63	1,17		26,8	1,01
	Canferol	23,03	1,06		27,11	1,12
	Pinocembrina	24,53	1,11		30,39	-
	Crisina	27,43	-		-	-
	Galangina	-	-		-	-
3	Ácido cafeico	16,03	1,48	4	4,48	1,04
	Mangiferina	23,81	1,04		4,68	1,10
	Ácido cumárico	24,89	1,05		5,16	1,14
	Ácido ferúlico	26,3	1,10		5,89	1,03
	Rutina	29,07	1,17		6,07	1,41
	Ácido trans cinâmico	34,24	1,12		8,56	1,22
	Quercetina	38,61	1,02		10,49	1,14
	Canferol	39,53	1,07		12,04	1,53
	Pinocembrina	42,43	1,15		18,51	1,27
	Crisina	49,2	-		23,6	1,11
	Galangina	-	-		26,3	-
5	Ácido cafeico	15,72	1,18	6	9,64	1,24
	Mangiferina	18,60	1,04		12,04	1,05
	Ácido cumárico	19,39	1,05		12,73	1,07
	Ácido ferúlico	20,44	1,17		13,67	1,25
	Rutina	24,04	1,13		17,15	1,16
	Ácido trans cinâmico	27,25	1,04		20,00	1,07
	Quercetina	28,36	1,08		21,52	1,20
	Canferol	30,65	1,07		23,93	1,08
	Pinocembrina	32,81	-		26,01	1,07
	Crisina	-	-		27,89	1,01
	Galangina	-	-		28,39	-
7	Ácido cafeico	9,51	1,24	8	7,56	1,13
	Mangiferina	11,81	1,05		8,61	1,15
	Ácido cumárico	12,41	1,07		9,96	1,05
	Ácido ferúlico	13,39	1,26		10,52	1,24
	Rutina	16,96	1,16		13,11	1,23
	Ácido trans cinâmico	19,75	1,07		16,21	1,06
	Quercetina	21,32	1,11		17,23	1,13
	Canferol	23,83	1,08		19,57	1,10
	Pinocembrina	25,84	1,07		21,56	1,09
	Crisina	27,88	1,02		23,51	1,02
	Galangina	28,51	-		24,07	-

Fonte: Dados da pesquisa.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 21 é possível verificar que os métodos 1, 2, 3 e 5 não atenderam ao principal objetivo do método, que é conseguir separar os 11 padrões da mistura, nestes métodos ocorreu a coeluição dos padrões, impedindo assim a correta identificação. Os métodos 4, 6, 7 e 8 conseguiram separar os 11 padrões e apresentaram os valores da seletividade ( $\alpha$ ) muito próximos. Desta forma, o método selecionado para a construção das curvas de

calibração foi o método 8, pois foi aquele que apresentou menor tempo de análise, garantindo a utilização de menor quantidade de solventes e conseqüentemente gerando menor produção de resíduos para descarte.

Segundo SCIENTIFIC (2014), a seletividade de um método dever ser sempre maior que 1, já que quando o valor de  $\alpha$  for igual a 1 significa que os picos coeluem (isto é, seus valores de tempo de retenção são os mesmos). O método 8 escolhido atende ao indicado pela literatura. Além disso, quanto maior for o valor de seletividade, mais distantes os picos se tornam um dos outros.

### 5.5.2 Resolução do método desenvolvido

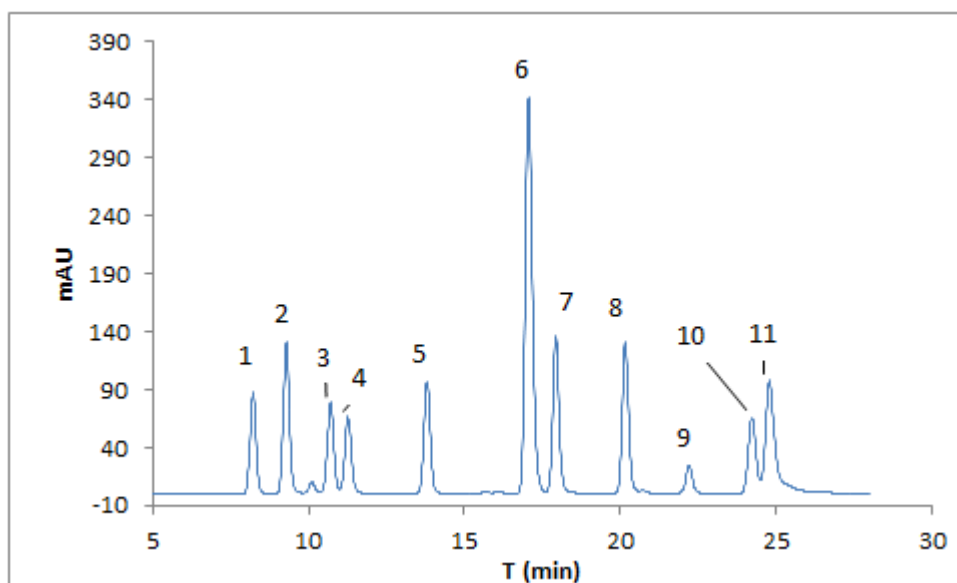
Na sequência, o método selecionado foi validado utilizando os parâmetros descritos em 4.11. A Tabela 22 traz os valores de resolução para o método 8, e a Figura 53 o cromatograma da mistura de padrões para esse método.

Tabela 22 - Valores de resolução (Rs) para o método 8

Método	Sinal	TR (min)	$\alpha$	Rs
8	1	7,56	1,13	0,87
	2	8,61	1,15	1,07
	3	9,96	1,05	0,43
	4	10,52	1,24	1,97
	5	13,11	1,23	2,21
	6	16,21	1,06	0,72
	7	17,23	1,13	1,77
	8	19,57	1,10	1,55
	9	21,56	1,09	1,43
	10	23,51	1,02	0,35
	11	24,07	-	-

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 52 – Cromatograma da mistura de padrões



Fonte: Dados da pesquisa.

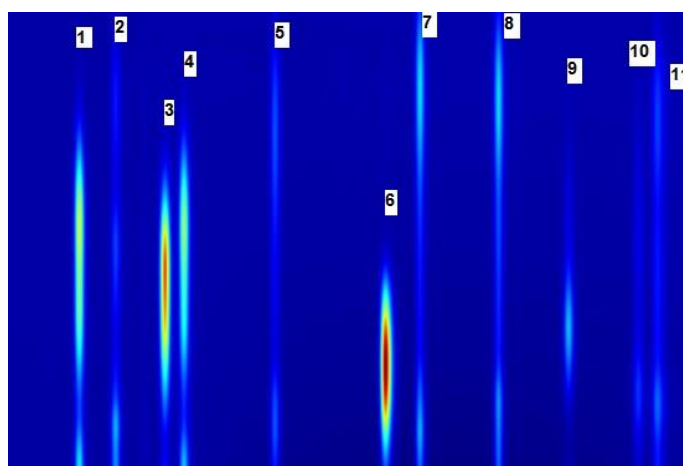
Por intermédio da Tabela 22 é possível perceber que os valores de resolução variaram de 0,35 a 2,21. Sabe-se que o parâmetro de resolução indica a qualidade da separação e larguras de base entre dois sinais consecutivos (PASCHOAL et al., 2008; SNYNER; KIRKLAND; GLAJCH, 2012). Dois baixos valores para resolução foram calculados, o primeiro entre os picos 3 e 4 ( $R_s$ : 0,43) e o segundo entre os picos 10 e 11 ( $R_s$ : 0,35). Segundo CHRISTIAN; DASGUPTA; SCHUG (2014) um valor mínimo de 0,6 é necessário para discernir um vale entre dois picos, porém é visto na Figura 53, que esse discernimento é possível, nota-se também que a seletividade entre esses dois picos apresenta um valor significativo de 1,05.

A resolução entre os picos 1 e 2 e 6 e 7 está abaixo de 1, e acima de 0,6 indicando uma boa separação entre o vale destes picos. Segundo CHRISTIAN; DASGUPTA; SCHUG (2014) valores próximos de 1 indicam apenas 2,3% de sobreposição entre dois picos, e além disso esse valor é dito como parâmetro mínimo para garantir uma boa quantificação. De um total de 10 resoluções, 7 atendem esse parâmetro. Segundo os mesmos autores citados neste parágrafo um valor de resolução acima de 1,5 indica uma sobreposição de apenas 0,1% entre os picos, apontando uma excelente resolução.

### 5.5.3 Linearidade do método desenvolvido

Após o método ser definido, faz-se necessário identificar qual padrão químico é representado por cada sinal analítico. Utilizando o detector de arranjo de diodos do equipamento, foi possível determinar qual a absorbância onde ocorre o máximo de absorção para cada padrão utilizado. A Figura 23 e a Tabela 54 indicam as absorções características de cada padrão. O detector de arranjo de diodos foi ajustado na faixa de 260 a 370 nm.

Figura 53 - Absorbância dos padrões utilizados na mistura de padrões



Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 23 - Absorção da mistura de padrões

Sinal	Padrão	Abs (nm)
1	Ácido cafeico	323
2	Mangiferina	256-317-366
3	Ácido cumárico	309
4	Ácido ferúlico	322
5	Rutina	257-355
6	Ácido trans cinâmico	276
7	Quercetina	254-370
8	Canferol	263-367
9	Pinocembrina	289
10	Crisina	267-313
11	Galangina	264-311-361

Fonte: Dados da pesquisa.

Tendo-se o conhecimento de qual padrão é representado por cada sinal, curvas de calibração foram construídas com base em inúmeras injeções das

misturas de padrões e a equação de reta, coeficientes de determinação e correlação foram calculados (Tabela 24).

Tabela 24 - R<sup>2</sup> e r<sup>2</sup> dos padrões

Padrão	Equação de reta	Coefficiente de determinação (R <sup>2</sup> )	Coefficiente de correlação (r <sup>2</sup> )
Ácido cafeico	y = 0,2955x - 0,1008	0,9895	0,9947
Mangiferina	y = 0,4030x - 0,1228	0,9878	0,9938
Ácido cumárico	y = 0,2780x - 0,1548	0,9879	0,9939
Ácido ferúlico	y = 0,2277x - 0,1089	0,9912	0,9955
Rutina	y = 0,3089x - 0,1313	0,9868	0,9933
Ácido trans cinâmico	y = 1,3844x - 0,9735	0,9935	0,9967
Quercetina	y = 0,5401x - 0,4032	0,9901	0,9950
Canferol	y = 0,5167x - 0,4285	0,9930	0,9964
Pinocembrina	y = 0,0873x - 0,1025	0,9906	0,9952
Crisina	y = 0,2431x - 0,0849	0,9911	0,9955
Galangina	y = 0,3458x - 0,8594	0,9860	0,9979

Fonte: Dados da pesquisa.

É possível concluir que todas as curvas de calibração apresentaram coeficientes de determinação muito próximos de 1, indicando uma mínima dispersão do conjunto de dados experimentais (RIBANI et al., 2004). Em outras palavras quanto mais próximo de 1 estiver o R<sup>2</sup>, melhor será a relação entre a variável Y em termos da variável X.

O r<sup>2</sup> (coeficiente de correlação) mede o grau da correlação entre duas variáveis, quanto mais próximo a 1 este valor, maior a correlação perfeita positiva entre as duas variáveis. Verifica-se que todos os valores da tabela 36 apresentam valores superiores a r<sup>2</sup>: 0,9900 é possível afirmar através destes valores que o método cromatográfico desenvolvido atende as recomendações, já que o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2003) recomenda o valor do r<sup>2</sup> acima de 0,90; e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) propõe um valor igual a 0,99.

#### 5.5.4 LD e LQ do método desenvolvido

O limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) são dois importantes parâmetros a serem investigados no processo de desenvolvimento de um método

analítico. Pois fornecem informações sobre qual a menor quantidade do analito que o equipamento consegue detectar, como também qual o valor mínimo quantificável respectivamente, com base nas curvas de calibração desenvolvidas (Tabela 25).

Tabela 25 - LD e LQ dos padrões

Padrão	LD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
Ácido cafeico	0,2765	0,9216
Mangiferina	0,3292	1,0973
Ácido cumárico	0,4365	1,4550
Ácido ferúlico	0,3990	1,3300
Rutina	0,2497	0,8324
Ácido trans cinâmico	0,2970	0,9899
Quercetina	0,3007	1,0025
Canferol	0,2280	0,7599
Pinocembrina	0,1776	0,5920
Crisina	0,2318	0,7727
Galangina	0,4661	1,5537

Fonte: Dados da pesquisa.

É possível concluir que a Pinocembrina apresentou os menores valores de LD e LQ, 0,1776 e 0,5920  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Os maiores valores de LD e LQ encontrados foram para a Galangina, 0,4661 e 1,5537  $\mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente. Este fato pode ser explicado pelo fato de a Galangina apresentar o menor valor para o  $R^2$  (Tabela 24), pois os parâmetros de LD e LQ estão diretamente relacionados à aceitação da precisão e exatidão do método pré-determinados.

#### 5.5.5 Precisão do método desenvolvido

A precisão (interdias) do método foi medida através do coeficiente de variação (CV) descrita no item 4.11.3.. O menor valor encontrado foi para a Mangiferina com CV: 11,82%, já o maior valor foi para a Pinocembrina CV: 15,75%. Todos os valores estão de acordo com a literatura, segundo BRASIL (2011) cada concentração de analito possui uma faixa aceitável de CV, este autor indica para concentrações que variam entre 1 mg/L a 100 mg/L coeficientes de variação aceitáveis são de 35 a 20% respectivamente. Segundo BRITO et al. (2003) e WOOD (1999), sugerem que para concentrações de analitos na faixa de mg/L um CV de até 16% é aceitável até

16%. RIBANI et al. (2004) indica que dependendo da complexidade dos analitos um CV de até 20% é aceitável.

Tabela 26 - Coeficientes de variação dos padrões

Padrão	CV (%)
Ácido cafeico	14,57
Mangiferina	11,82
Ácido cumárico	14,39
Ácido ferúlico	12,27
Rutina	12,63
Ácido trans cinâmico	13,01
Quercetina	12,98
Canferol	12,44
Pinocebrina	15,75
Crisina	11,92
Galangina	13,90

Fonte: Dados da pesquisa.

## 5.6 Identificação e quantificação de ácidos fenólicos e flavonoides nas amostras de própolis

Após o desenvolvimento do método cromatográfico as 33 amostras de própolis foram injetadas no cromatógrafo a líquido como descrito em 4.10. A identificação foi realizada com base no tempo de retenção e padrão de absorção de cada padrão analítico (Tabelas 22 e 23). A quantificação foi feita utilizando as curvas de calibração descritas na Tabela 24.

Tabela 27 - Quantificação dos padrões presentes nas 33 amostras de própolis

Padrão	Ácido cafeico	Ácido cumárico	Ácido ferúlico	Rutina	Ácido trans cinamico	Canferol	Pinocebrina	Crisina	Galangina
Amostra									
1 - CLP		2,05 ± 0,33			0,48 ± 0,09			15,93 ± 3,56	
2 - CLP		<b>14,25 ± 2,25</b>	5,69 ± 1,21					<b>88,33 ± 12,32</b>	7,83 ± 0,92
3 - CLP					n.q.		n.q.	1,43 ± 0,04	
4 - CLP		2,53 ± 0,04		0,06 ± 0,008	0,16 ± 0,007	1,61 ± 0,06	n.q.	11,04 ± 0,93	3,03 ± 0,08
5 - CLP		0,50 ± 0,05	0,08 ± 0,006		n.q.	1,04 ± 0,04	n.q.	7,15 ± 0,10	
1 - CNS	1,86 ± 0,37	1,37 ± 0,23	1,15 ± 0,25			<b>7,50 ± 0,34</b>	<b>80,88 ± 10,57</b>	71,69 ± 7,98	45,49 ± 9,60
2 - CNS		1,03 ± 0,17						5,33 ± 0,57	6,30 ± 0,18
3 - CNS		n.q.			n.q.		2,06 ± 0,10	1,71 ± 0,07	
1 - PMP	0,93 ± 0,10		0,67 ± 0,02	2,27 ± 0,24				3,60 ± 0,52	
2 - PMP	<b>2,72 ± 0,28</b>	3,19 ± 0,55	0,40 ± 0,07		0,63 ± 0,13	2,40 ± 0,32		25,86 ± 0,13	3,26 ± 0,22
1 - ARP	1,53 ± 0,04	4,24 ± 0,98	0,20 ± 0,02		0,86 ± 0,19			12,58 ± 1,81	
2 - ARP	0,31 ± 0,05	11,98 ± 2,02	<b>30,89 ± 4,29</b>						<b>45,95 ± 1,24</b>
1 - GCP	1,65 ± 0,40	1,28 ± 0,15						2,32 ± 0,51	
2 - GCP		0,03 ± 0,004			0,04 ± 0,006		n.q.	1,90 ± 0,05	3,36 ± 0,05
3 - GCP		0,52 ± 0,01		<b>6,11 ± 0,60</b>	0,76 ± 0,05	1,56 ± 0,34		2,02 ± 0,41	
4 - GCP					0,32 ± 0,05				
1 - PRP	1,58 ± 0,37	4,58 ± 1,03	0,35 ± 0,06					21,12 ± 2,57	3,50 ± 0,69
2 - PRP	0,36 ± 0,07	3,50 ± 0,25	0,50 ± 0,13			2,27 ± 0,17	n.q.	32,53 ± 0,33	7,56 ± 0,11
3 - PRP		n.q.			n.q.			3,44 ± 0,08	
1 - MRP		1,00 ± 0,13						14,92 ± 0,65	3,39 ± 0,17
1 - COP		1,02 ± 0,07			0,13 ± 0,01			3,89 ± 0,74	
1 - PTP		2,37 ± 0,50			1,65 ± 0,33	1,82 ± 0,16		17,26 ± 2,20	3,59 ± 0,13
2 - PTP		4,08 ± 0,05	3,47 ± 0,59		n.q.	2,12 ± 0,12	n.q.	21,22 ± 1,37	3,28 ± 0,19
1 - PNP		1,88 ± 0,08					n.q.	14,27 ± 0,13	
2 - PNP	0,06 ± 0,008	0,34 ± 0,04	n.q.		n.q.		n.q.	1,33 ± 0,17	3,15 ± 0,08
1 - UVP		1,51 ± 0,06	0,42 ± 0,04		0,60 ± 0,09	1,91 ± 0,35	11,79 ± 0,37	1,91 ± 0,35	5,48 ± 0,93
2 - UVP		n.q.	0,08 ± 0,01		0,07 ± 0,01	1,15 ± 0,12	9,22 ± 1,82	11,64 ± 2,38	6,08 ± 0,79
1 - TBS		n.q.	1,55 ± 0,30		3,31 ± 0,32		0,43 ± 0,03		
2 - TBS		n.q.	n.q.				4,26 ± 0,07	3,50 ± 0,01	4,13 ± 0,01
1 - CMP		5,29 ± 0,35	1,24 ± 0,23		1,27 ± 0,05	2,13 ± 0,09		29,31 ± 1,44	7,40 ± 0,64
2 - CMP		7,66 ± 0,38	1,58 ± 0,29		3,54 ± 0,36	3,20 ± 0,13		49,06 ± 3,59	13,97 ± 1,64
1 - STS			0,42 ± 0,06		1,90 ± 0,21				
2 - STS		n.q.	1,64 ± 0,01		<b>4,58 ± 0,39</b>		n.q.	2,66 ± 0,27	

Fonte: Dados da pesquisa.

Notas: Todos os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

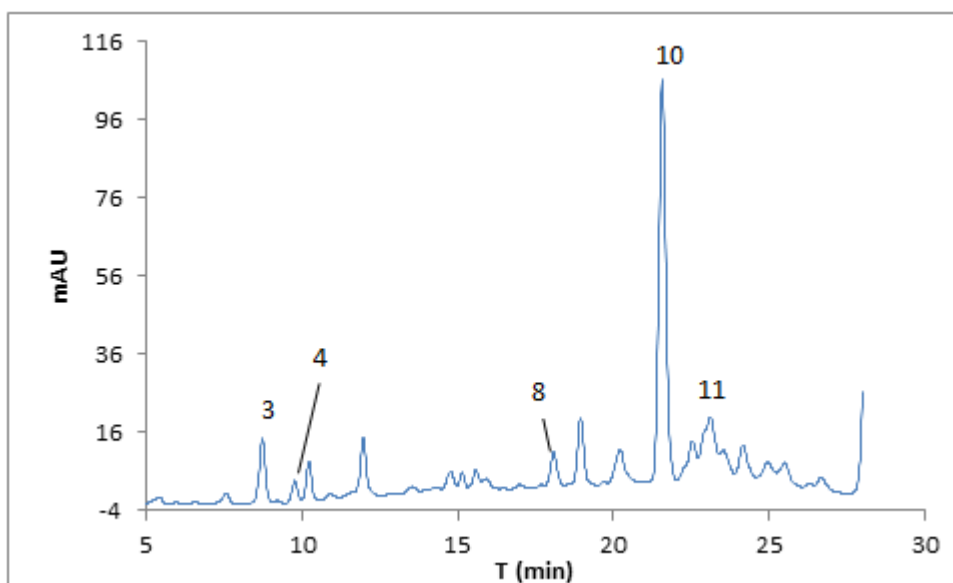
A unidade de medida para a quantificação é  $\text{mg g}^{-1}$ .

n.q.: detectado mas não quantificado.

n = 6.

As amostras de própolis apresentaram perfis químicos muito ricos, 9 dos 11 padrões foram identificados e quantificados (Tabela 27). Algumas amostras de própolis se destacaram em relação às outras quando comparado o perfil cromatográfico, sendo os compostos fenólicos mais comumente identificados e quantificados o ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido *trans*-cinâmico, crisina e galangina. A amostra 2 – CLP (Figura 55) apresentou o maiorres teores de ácido cumárico e crisina ( $14,25$  e  $88,33 \text{ mg g}^{-1}$  respectivamente), a crisina é muito evidenciada no cromatograma (Figura 55).

Figura 54 - Perfil cromatográfico da amostra 2 - CLP

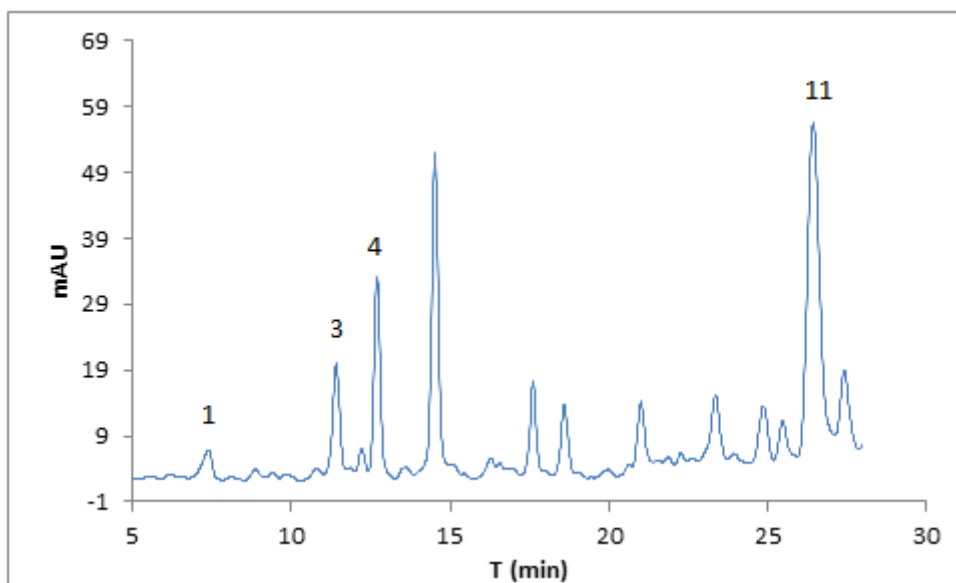


Fonte: Dados da pesquisa.

Notas: 3 = ácido cumárico; 4 = ácido ferúlico; 8 = canferol; 10 = crisina e 11 = galangina.

A amostra 2 – PMP apresentou o maior teor de para ácido cafeico ( $2,72 \text{ mg g}^{-1}$ ) e elevado teor de canferol ( $2,40 \text{ mg g}^{-1}$ ). A amostra 2 – ARP (Figura 56) apresentou elevadas concentrações de ácido ferúlico e galangina ( $30,89$  e  $45,95 \text{ mg g}^{-1}$  respectivamente).

Figura 55 - Perfil cromatográfico da amostra 2 - ARP



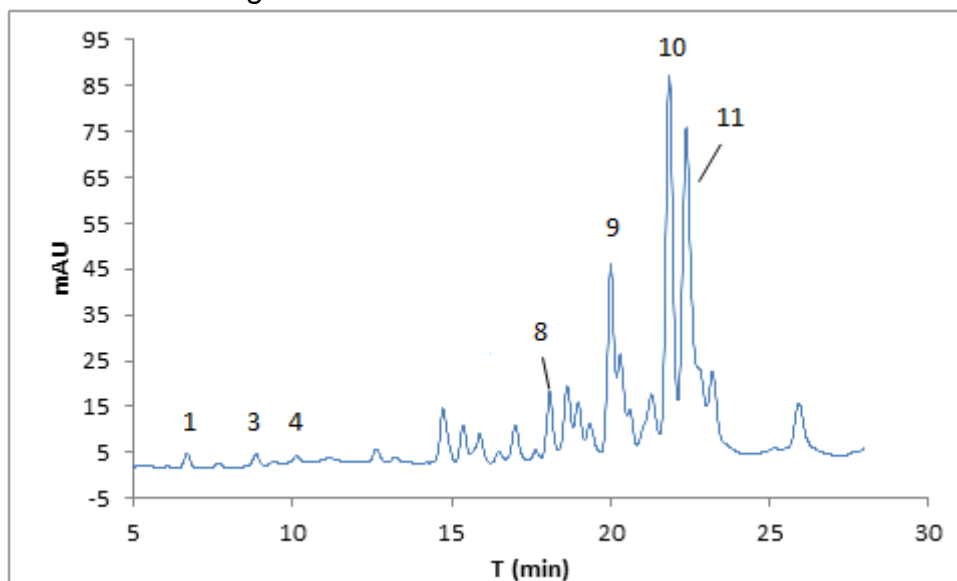
Fonte: Dados da pesquisa.

Notas: 1 = ácido cafeico; 3 = ácido cumárico; 4 = ácido ferúlico e 11 = galangina.

O flavonoide rutina foi o menos comumente encontrado nos extratos de própolis, sendo observado em 3 amostras coletadas em General Carneiro, Palmital e Campo Largo com teores de 6,11; 2,27 e 0,06 mg g<sup>-1</sup> respectivamente. O ácido *trans*-cinâmico foi muito encontrado nas amostras de própolis com concentrações que variaram entre 0,07 e 4,58 mg g<sup>-1</sup>, sendo este último o mais teor, correspondente a amostra 2 – STS da cidade de Santa Terezinha – SC.

A amostra 1 – CNS apresentou os maiores teores para o canferol e pinocembrina (7,50 e 80,88 mg g<sup>-1</sup> respectivamente). Esta amostra também apresentou os teores elevados de ácido cafeico, crisina e galangina (1,86; 71,69 e 45,49 mg g<sup>-1</sup>) (Figura 57). Esses valores corroboram com os valores encontrados para as análises de bancada realizadas para esta amostras (Tabela 6), confirmando seu rico perfil em compostos fenólicos e flavonoides.

Figura 56 - Perfil cromatográfico da amostra 1 - CNS



Fonte: Dados da pesquisa.

Notas: 1 = ácido cafeico; 3 = ácido cumárico; 4 = ácido ferúlico; 8 = canferol; 9 = pinocembrina; 10 = crisina e 11 = galangina.

No estudo de PARK; ALENCAR; AGUIAR (2002) com amostras de própolis do Brasil, os autores identificaram por CLAE o ácido ferúlico, ácido cumárico, canferol, pinocembrina, crisina, galangina, além de outros compostos não avaliados neste estudo. PARK et al. (2002), identificaram em amostras de própolis do Brasil, Argentina e Uruguai por CLAE alguns ácidos fenólicos e flavonoides, dentre eles o ácido cumárico, ácido ferúlico, canferol, pinocembrina e crisina, estes foram também identificados e quantificados no presente estudo.

CALEGARI et al. (2017) identificaram em amostras de própolis da cidade de Dois Vizinhos – PR por CLAE-DAD o ácido cafeico na faixa de 117,7 a 150,8  $\mu\text{g g}^{-1}$ , o ácido cumárico na faixa de 29,21 a 617,7  $\mu\text{g g}^{-1}$  e por fim o ácido ferúlico na faixa de concentração de 44,25 a 305,6  $\mu\text{g g}^{-1}$ . No estudo de OLDONI et al. (2015) foram identificados e quantificados o ácido cafeico ( $14,22 \pm 0,53 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ), ácido cumárico ( $37,05 \pm 1,90 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ) e ácido ferúlico ( $15,44 \pm 0,35 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ) em amostras de própolis da cidade de Dois Vizinhos – PR.

PETER et al. (2017), em seu estudo com própolis marrom do estado do Rio Grande do Sul identificaram e quantificaram alguns ácidos fenólicos e flavonoides nas amostras como o ácido cumárico, o teor encontrado para ácido cumárico foi de 3,39  $\text{mg g}^{-1}$ , o ácido ferúlico apresentou teor de 0,20  $\text{mg g}^{-1}$ , o flavonoide crisina foi

identificado porém não quantificado, o mesmo aconteceu com a galangina, pinocebrina e canferol.

XAVIER et al. (2017) indentificaram ácido trans cinâmico em amostras de própolis da região semi-árida do nordeste do Brasil. CAO et al. (2017) verificaram o perfil químico de amostras de própolis oriundas da China, e indentificaram os mesmos ácido fenólicos e flavonoides presentes da Tabela 27. CAO et al. (2017) quantificaram o ácido ferúlico e ácido cumárico (1,49 e 1,71 mg g<sup>-1</sup>), valores muito próximos aos encontrados para as amostras deste estudo (tabela 39). ORUÇ et al. (2017), indentificou e quantificou ácido cumárico e ácido trans cinamico em amostras de própolis da Turquia, que variaram, para ácido cumárico, entre 1300 a 2065 µg g<sup>-1</sup> de extrato seco de própolis, e para ácido trans cinamico variaram entre 1835 a 2198 µg g<sup>-1</sup>.

## 6 CONCLUSÃO

Foi possível determinar teor de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante das amostras de própolis por meio de análises espectrofotométricas e com isso verificar que amostras de própolis estudadas apresentaram um perfil químico diversificado, representado pelos valores de ABTS, DPPH, TCFT, TFT e FRAP. A metodologia de CLAE-DAD foi desenvolvida com êxito, permitindo a identificação e quantificação dos principais ácidos fenólicos e flavonoides presentes em própolis, com destaque para o ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido *trans*-cinâmico, pinocembrina, crisina e galangina.

A partir das análises de referência foi possível gerar bons modelos de calibração com própolis bruta, macerada, EEP e EEPC. Contudo, os melhores modelos de FRAP, ABTS, TCFT, baseados nos parâmetros,  $R^2$ , RMSEC, RMSECV, RMSEP, RMSEE, RPD, RER e razão RMSEP/RMSECV, foram obtidos para a própolis macerada, já para o parâmetro DPPH o melhor modelo foi obtido para própolis bruta e para TFT para o EEP. Estes apresentaram valores de  $R^2$  elevados, entre 0,80 e 0,96 indicando uma correlação positiva muito forte. Os valores de erros RMSEC, RMSECV, RMSEP, RMSEE, RPD e RER apresentaram-se baixos, indicando modelos com boa precisão. A razão RMSEP/RMSECV apresentou valores muito próximos de 1, indicando assim modelos muito robustos. Os pré-processamentos mais utilizados na geração dos modelos foram SG, MSC e 2D.

Deste modo, sugere-se que para a avaliação dos parâmetros FRAP, ABTS, TCFT a própolis empregada seja a macerada, para a avaliação de DPPH e TFT sugere-se que seja empregada à própolis bruta e EEP respectivamente.

Por fim, pode-se concluir que a NIRS associada a quimiometria pode ser empregada na caracterização das amostras de própolis, e que os modelos de PLS construídos, a partir dos espectros de NIRS, quimiometria empregando pré-processamentos, destacaram-se por apresentar robustez e alta capacidade de predição.

## 7 REFERÊNCIAS

AGELET, L. E.; HURBURGH, J. R.; CHARLES R. A tutorial on near infrared spectroscopy and its calibration. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 40, n. 4, p. 246-260, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Resolução RE nº 899**, de 29/05/2003.

AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J; MATSUKA, M.; ZHU, F.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1383-1392, 2007.

AKHIR, R. A. M.; BAKAR, M. F. A.; SANUSI, S. B. Antioxidant and antimicrobial activity of stingless bee bread and propolis extracts. In: **AIP Conference Proceedings**. Vol. 1891, No. 1, p. 020090, AIP Publishing, 2017.

AL-ANI, I.; ZIMMERMANN, S.; REICHLING, J.; WINK, M. Antimicrobial Activities of European Propolis Collected from Various Geographic Origins Alone and in Combination with Antibiotics. **Medicines**, v. 5, n. 1, p. 2, 2018.

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 propolis. **Journal of ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007

ALVES, A.; SANTOS, A.; ROZENBERG, P.; PÂQUES, L. E.; CHARPENTIER, J. P.; SCHWANNINGER, M.; RODRIGUES, J. A common near infrared—based partial least squares regression model for the prediction of wood density of *Pinus pinaster* and *Larix eurolepis*. **Wood Science and Technology**, v. 46, n. 1-3, p. 157-175, 2012.

ANDRADE, J. K. S.; DENADAI, M.; DE OLIVEIRA, C. S.; NUNES, M. L.; NARAIN, N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, p. 129-138, 2017.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Phenolic compounds in foods-a brief review. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ANTON, H.; RORRES, C. **Álgebra linear com aplicações**. Bookman, 2001.

ARAGÃO, N. M. D.; VELOSO, M. C. D. C.; ANDRADE, J. B. D. Validação de métodos cromatográficos de análise-um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da "Química Verde" na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2476-2481, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE MEL – ABEMEL. 2016. Disponível em: <[http://brazillletsbee.com.br/inteligencia\\_comercial\\_abemel\\_agosto\\_2016.pdf](http://brazillletsbee.com.br/inteligencia_comercial_abemel_agosto_2016.pdf)>. Acesso em: 28 de Setembro de 2016.

ASSIMOS, A. A. Avaliação da concentração e dos tipos de flavonoides na própolis, utilizando métodos quimiométricos de classificação e calibração. 2014. 103 f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2014.

BALABIN, R. M.; SAFIEVA, R. Z.; LOMAKINA, E. I. Comparison of linear and nonlinear calibration models based on near infrared (NIR) spectroscopy data for gasoline properties prediction. **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, v. 88, n. 2, p. 183-188, 2007.

BALATA, G. F.; ABDELHADY, M. I.; MAHMOUD, G. M.; MATAR, M. A.; ABD EL-LATIF, A. N.; Formulation of Saudi Propolis into Biodegradable Chitosan Chips for Vital Pulpotomy. **Current drug delivery**, v. 15, n. 1, p. 97-109, 2018.

BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, n. 1, p. 3-15, 2000.

BANO, G.; FACCO, P.; MENEGHETTI, N.; BEZZO, F.; BAROLO, M. Uncertainty back-propagation in PLS model inversion for design space determination in pharmaceutical product development. **Computers & Chemical Engineering**, v. 101, p. 110-124, 2017.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 7, p. 561-571, 2001.

BARBEIRA, P. J. S.; PAGANOTTI, R. S. N.; ÁSSIMOS, A. A. Development of a multivariate calibration model for the determination of dry extract content in Brazilian commercial bee propolis extracts through UV–Vis spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 114, p. 441-448, 2013.

BARGAŃSKA, Ż.; ŚLEBIODA, M.; NAMIEŚNIK, J. Honey bees and their products: Bioindicators of environmental contamination. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 3, p. 235-248, 2016.

BARTH, O. M. Melissopalynology in Brazil: a review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees. **Scientia Agricola**, v. 61, n. 3, p. 342-350, 2004.

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. Chemometrics, A Practical Guide. New York: John Wiley and Sons, 1998.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BETANCES-SALCEDO, E.; REVILLA, I.; VIVAR-QUINTANA, A. M.; GONZÁLEZ-MARTÍN, M. I. Flavonoid and Antioxidant Capacity of Propolis Prediction Using Near Infrared Spectroscopy. **Sensors**, v. 17, n. 7, p. 1647, 2017.

BIANCHI, M. D. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Free radicals and the main dietary antioxidants. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BONVEHÍ, J. S.; GUTIÉRREZ, A. L. Antioxidant activity and total phenolics of propolis from the Basque Country (Northeastern Spain). **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 9, p. 1387-1395, 2011.

BORBA, K. R.; SAPELLI, K. S.; SPRICIGO, P. C.; FERREIRA, M. D. Near infrared spectroscopy sugar quantification in intact orange. **Citrus Research & Technology**, v. 38, n. 2, p. 1-7, 2017.

BRAND-WILLIAMS, 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.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários. **Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA/ACS**, 2011

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. ecotoxicol. e Meio Ambiente, Curitiba**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BRUKER, **Guide for Understanding Spectra, Improving Processes**, 2007.

BUENO-SILVA, B.; MARSOLA, A.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. The effect of seasons on Brazilian red propolis and its botanical source: chemical composition and antibacterial activity. **Natural product research**, v. 31, n. 11, p. 1318-1324, 2017.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR, S. M. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.

CAI, R.; WANG, S.; MENG, Y.; MENG, Q.; ZHAO, W. Rapid quantification of flavonoids in propolis and previous study for classification of propolis from different origins by using near infrared spectroscopy. **Analytical Methods**, v. 4, n. 8, p. 2388-2395, 2012.

CAO, X. P.; CHEN, Y. F.; ZHANG, J. L.; YOU, M. M.; WANG, K.; HU, F. L. Mechanisms underlying the wound healing potential of propolis based on its in vitro antioxidant activity. **Phytomedicine**, v. 34, p. 76-84, 2017.

CALEGARI, M. A.; PRASNIEWSKI, A.; SILVA C. D; SADO, R. Y.; MAIA, F.; TONIAL, L.; OLDONI, T. L. Propolis from Southwest of Parana produced by selected bees: Influence of seasonality and food supplementation on antioxidant activity and phenolic profile. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, n. AHEAD, p. 0-0, 2017.

CALEGARIB, M. A., PRASNIEWSKI, A., DA SILVA, C., & OLDONI, T. L. C. Influência do pré-processamento e escolha das variáveis latentes na construção de modelos PLS para quantificação de fenólicos totais em própolis. **Synergismus scyentifica UTFPR**, v. 12, n. 1, p. 14-18, 2017. b

CARABAJAL, M. P. A.; ISLA, M. I.; ZAMPINI, I. C. Evaluation of antioxidant and antimutagenic activity of herbal teas from native plants used in traditional medicine in Argentina. **South African Journal of Botany**, 2016.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, p. S1-S6, 2002.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: Influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512-1516, 2007.

CASTRO, R. N.; SALGUEIRO, F. B. comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Quim. Nova**, v. 39, n. 10, p. 1192-1199, 2016

CAVALCANTE, D. R. R.; OLIVEIRA, P. S.; GÓIS, S. M.; SOARES, A. F.;  
CARDOSO, J. C.; PADILHA, F. F.; JÚNIOR, R. L. C. D. A. Efeito da própolis verde sobre displasias epiteliais orais em ratos. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 77, n. 3, p. 278-284, 2011.

CHANG, C. W.; LAIRD, D. A. Near-infrared reflectance spectroscopic analysis of soil C and N. **Soil Science**, v. 167, n. 2, p. 110-116, 2002.

CHARNIER, C.; LATRILLE, E.; JIMENEZ, J.; LEMOINE, M.; BOULET, J. C.;  
MIROUX, J.; STEYER, J. P. Fast characterization of solid organic waste content with near infrared spectroscopy in anaerobic digestion. **Waste management**, v. 59, p. 140-148, 2017.

CHRISTIAN, G. D.; DASGUPTA, P. K.; SCHUG, K.A. **Analytical chemistry**. 7 ed. Wiley: New York, 2014.

CLAUSEN, N. G.; SPIELMANN, N.; RINGER, S. K.; WEISS, M. Near-infrared spectroscopy (NIRS) in a piglet model: readings are influenced by the colour of the cover. In: **European Society of Anesthesia**. 2017.

COELHO, J.; FALCAO, S. I.; VALE, N.; ALMEIDA-MURADIN, L. B.; VILAS-BOAS, M. Phenolic composition and antioxidant activity assessment of southeastern and

south Brazilian propolis. **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 1, p. 21-31, 2017.

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

CORRÊA, F. R. S.; SCHANUEL, F. S.; MOURA-NUNES, N.; MONTE-ALTO-COSTA, A.; DALEPRANE, J. B. Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing suppressing inflammation-associated transcription factor NFκB. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 86, p. 162-171, 2017.

COSTA, M. C. A.; MORGANO, M. A.; FERREIRA, M. M. C.; MILANI, R. F. Analysis of bee pollen constituents from different Brazilian regions: Quantification by NIR spectroscopy and PLS regression. **LWT-Food Science and Technology**, v. 80, p. 76-83, 2017.

COTTICA, S. M.; SAWAYA, A. C.; EBERLIN, M. N.; FRANCO, S. L.; ZEOULA, L. M.; VISENTAINER, J. V. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 5, p. 929-935, 2011.

COULIBALY, D.; PAULY, A.; KONATÉ, S.; LINSENMAIR, E. K.; STEIN, K. Spatial and Seasonal Distribution of Bee Pollinator Species in a Sudanese Agro-ecological System in Burkina Faso (West Africa). **Entomology and applied science letters**, v. 3, n. 4, p. 1-11, 2016.

CUESTA-RUBIO, O.; PICCINELLI, A. L.; FERNANDEZ, M. C.; HERNÁNDEZ, I. M.; ROSADO, A.; RASTRELLI, L. Chemical Characterization of Cuban Propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the Brown, Red, and Yellow Cuban Varieties of Propolis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 18, p. 7502-7509, 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.

DE ARAÚJO, M. T. S.; DE SOUSA, A. H.; DE VASCONCELOS, W. E.; DE FREITAS, R. D. S.; SILVA, A. M. A.; PEREIRA, D. S.; BORGES, P. M. Avaliação da polinização e estudo comportamental de *Apis mellifera* L. na cultura do meloeiro em Mossoró, RN. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, n. 1, p. 0, 2004.

DE CASTRO, S. L. Propolis: Biological and Pharmacological Activities. Therapeutic Uses of This Bee-product. **Annual Review of Biomedical Sciences**, v. 3, p. 49-83, 2001.

DE FRANCISCO, L.; PINTO, D.; ROSSETO, H.; TOLEDO, L.; SANTOS, R.; TOBALDINI-VALÉRIO, F.; SVIDZINSKI, T.; BRUSCHI, M.; SARMENTO, B.; OLIVEIRA, M. B.; RODRIGUES, F. Evaluation of radical scavenging activity, intestinal cell viability and antifungal activity of Brazilian propolis by-product. **Food Research International**, v. 105, p. 537-547, 2018.

DE OLIVEIRA, I. R. N.; ROQUE, J. V.; MAIA, M. P.; STRINGHETA, P. C.; TEÓFILO, R. F. New strategy for determination of anthocyanins, polyphenols and antioxidant capacity of *Brassica oleracea* liquid extract using infrared spectroscopies and multivariate regression. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 2018.

DE SOUZA ROCHA, A. M.; DA SILVA SANTOS, A. J.; GONÇALVES-GERVÁSIO, R. C. R. Bioactivity of propolis extracts on the *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae) aphid in kale. **Revista de Ciências Agroveterinárias (Journal of Agroveterinary Sciences)**, v. 16, n. 3, p. 332-337, 2017.

DIAGO, M. P.; FERNÁNDEZ-NOVALES, J.; GUTIÉRREZ, S.; MARAÑÓN, M.; TARDAGUILA, J. Development and validation of a new methodology to assess the vineyard water status by on-the-go near infrared spectroscopy. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 59, 2018.

DOS SANTOS<sup>a</sup>, D. C.; DAVID<sup>b</sup>, J. M.; DAVID<sup>c</sup>, J. P. Composição química, atividade citotóxica e antioxidante de um tipo de própolis da Bahia. **Quim Nova**, v. 40, p. 171-175, 2017.

DOS SANTOS<sup>b</sup>, L.; HOCHHEIM, S.; BOEDER, A. M.; KROGER, A.; TOMAZZOLI, M. M.; NETO, R. D. P.; MARASCHIN, M.; GUEDES, A.; CORDOVA, C. M. M. Chemical characterization, antioxidant, cytotoxic and antibacterial activity of propolis extracts and isolated compounds from the Brazilian stingless bees *Melipona quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula*. **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 5, p. 543-558, 2017.

ELFADL, 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, p. 259–270, 2010.

EL-GUENDOZ, S.; AL-WAILI, N.; AAZZA, S.; ELAMINE, Y.; ZIZI, S.; AL-WAILI, T.; AL-WAILI, A.; LYOUSSI, B. Antioxidant and diuretic activity of co-administration of *Capparis spinosa* honey and propolis in comparison to furosemide. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 10, n. 10, p. 974-980, 2017.

EMBRAPA, 2015. **Conheça o histórico da apicultura no Brasil/Sebrae**. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/conheca-o-historico-da-apicultura-no-brasil,c078fa2da4c72410VgnVCM100000b272010aRCRD>>. Acesso em: 14 de Agosto de 2016.

EYLENBOSCH, D.; BODSON, B.; BAETEN, V.; FERNÁNDEZ PIERNA, J. A. NIR hyperspectral imaging spectroscopy and chemometrics for the discrimination of roots and crop residues extracted from soil samples. **Journal of Chemometrics**, v. 32, n. 1, 2018.

FALCÃO, S. I.; TOMÁS, A.; VALE, N.; GOMES, P.; FREIRE, C.; VILAS-BOAS, M. Phenolic quantification and botanical origin of Portuguese propolis. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 805-812, 2013.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, M. M.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.

FLYBORG, L.; BJÖRLENIUS, B.; ULLNER, M.; PERSSON, K. M. A PLS model for predicting rejection of trace organic compounds by nanofiltration using treated wastewater as feed. *Separation and Purification Technology*, v. 174, p. 212-221, 2017.

FONT, R.; RIO-CELESTINO, M.; CARTEA, E.; HARO-BAILON, A. D. Quantification of glucosinolates in leaves of leaf rape (*Brassica napus* ssp. *pabularia*) by near infrared spectroscopy. **Phytochemistry**, v. 66, p.175–185, 2005.

GALASSO, H. L.; CALLIER, M. D.; BASTIANELLI, D.; BLANCHETON, J. P.; ALIAUME, C. The potential of near infrared spectroscopy (NIRS) to measure the chemical composition of aquaculture solid waste. **Aquaculture**, v. 476, p. 134-140, 2017.

GARÓFALO, C. A. Diversidade e abundância de abelhas solitárias: viabilidade e utilização como polinizadores na agricultura. **II Encuentro colombiano sobre abejas silvestres**, p. 36, 2004.

GENISHEVA, Z.; QUINTELAS, C.; MESQUITA, D. P.; FERREIRA, E. C.; OLIVEIRA, J. M.; AMARAL, A. L. New PLS analysis approach to wine volatile compounds characterization by near infrared spectroscopy (NIR). **Food chemistry**, v. 246, p. 172-178, 2018.

GONZÁLEZ-MARTÍN, M. I.; ESCUREDO, O.; REVILLA, I.; VIVAR-QUINTANA, A. M.; COELLO, M. C.; RIOCEREZO, C. P.; MONCADA, G. W. Determination of the Mineral Composition and Toxic Element Contents of Propolis by Near Infrared Spectroscopy. **Sensors**, v. 15, n. 11, p. 27854-27868, 2015.

GONZÁLEZ-MARTIN, M. I.; REVILLA, I.; VIVAR-QUINTANA, A. M.; SALCEDO, E. B. Pesticide residues in propolis from Spain and Chile. An approach using near infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 165, p. 533-539, 2017.

GREENLEAF, S. S.; KREMEN, C. Wild bees enhance honey bees' pollination of hybrid sunflower. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 37, p. 13890-13895, 2006.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of toxicology**, v. 86, n. 3, p. 345-391, 2012.

GÜLÇİN, I.; BURSAL, E.; ŞEHİTOĞLU, M. H.; BILSEL, M.; GÖREN, A. C. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 8, p. 2227-2238, 2010.

GUO, X.; CAI, R.; WANG, S.; TANG, B.; LI, Y.; ZHAO, W. Non-destructive geographical traceability of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) using near infrared spectroscopy combined with chemometric methods. **Royal Society Open Science**, v. 5, n. 1, p. 170714, 2018.

GUZELMERIC, E.; RISTIVOJEVIĆ, P.; TRIFKOVIĆ, J.; DASTAN, T.; YILMAZ, O.; CENGİZ, O.; YESİLADA, E. Authentication of Turkish propolis through HPTLC fingerprints combined with multivariate analysis and palynological data and their comparative antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 87, p. 23-32, 2018

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. The antioxidants of human extracellular fluids. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 280, n. 1, p. 1-8, 1990.

HEALD, M. A.; MARION, J. B. Classical electromagnetic radiation. Courier Corporation, 2012.

HOGENDOORN, E. A.; SOMMEIJER, M. J.; VREDENBREGT, M. J. Alternative method for measuring beeswax content in propolis from the Netherlands. **Journal of Apicultural Science**, v. 57, n. 2, p. 81-90, 2013.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. vii, 1055 p.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*, v. 37, n. 9, p. 937-942, 1999.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL – INMETRO. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

JOLLIVET, M. Agricultura e meio ambiente: reflexões sociológicas. **Estudos Econômicos, São Paulo**, v. 24, p. 183-198, 1994.

JUNIOR, A. F.; LOPES, M. M. R.; COLOMBARI, V.; MONTEIRO, A. C. M.; VIEIRA, E. P. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 294-297, 2006.

JURD, L.; GEISSMAN, T. A. Absorption Spectra of Metal Complexes of Flavonoid Compounds. **Journal of Organic Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 1395-1401, 1956.

KERKER, M. The scattering of light and other electromagnetic radiation: physical chemistry: a series of monographs. Academic press, 2013.

KEVAN, P. G.; VIANA, B. F. The Global decline of Pollination Services. **Tropical Conservancy**, n. 4, v. 4, p. 3-8, 2003.

KOLEVA, I. I.; VAN BEEK, T. A.; LINSSEN, J. P.; GROOT, A. D.; EVSTATIEVA, L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical analysis*, v. 13, n. 1, p. 8-17, 2002.

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.

KREPPER, G.; ROMEO, F.; FERNANDES, D. D. S.; DINIZ, P. H. G. D.; ARAÚJO, M. C. U.; NEZIO, M. S. D.; PISTONESI, M. F.; CENTURIÓN, M. E. Determination of fat content in chicken hamburgers using NIR spectroscopy and the Successive Projections Algorithm for interval selection in PLS regression (iSPA-PLS). **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 189, p. 300-306, 2018

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

KUMARI, D.; MADHUJITH, T.; CHANDRASEKARA, A. Comparison of phenolic content and antioxidant activities of millet varieties grown in different locations in Sri Lanka. **Food Science & Nutrition**, 2016.

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

KUMAZAWA, S.; YONEDA, M.; SHIBATA, I.; KANAEDA, J.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Direct Evidence for the Plant Origin of Brazilian Propolis by the Observation of Honeybee Behavior and Phytochemical Analysis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 6, p. 740-742, 2003.

LEE, I. K.; HAN, M. S.; KIM, D. W.; YUN, B. S. Phenylpropanoid acid esters from Korean propolis and their antioxidant activities. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 24, n. 15, p. 3503-3505, 2014.

LEOPOLDINI, M.; MARINO, T.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. *The Journal of Physical Chemistry A*, v. 108, n. 22, p. 4916-4922, 2004.

LI, Q.; PAN, F.; ZHAO, Z. Concurrent probabilistic PLS regression model and its applications in process monitoring. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 171, p. 40-54, 2017.

LIMA, M. C.; ROCHA, S. A. Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil. **Proposta metodológica de acompanhamento. Brasília: IBAMA**, 2012.

LI, X.; LONG, Q.; GAO, F.; HAN, C.; JIN, P.; ZHENG, Y. Effect of cutting styles on quality and antioxidant activity in fresh-cut pitaya fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 124, p. 1-7, 2017.

LI, W.; XING, L.; CAI, Y.; QU, H. Classification and quantification analysis of *Radix scutellariae* from different origins with near infrared diffuse reflection spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 55, n. 1, p. 58-64, 2011.

LOPES, C. G. R.; BERIÃO, D. C. C.; PEREIRA, L. A.; ALENCAR, L. C. Levantamento da flora apícola em área de cerrado no município de Floriano, estado do Piauí, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 14, n. 2, 2016.

LU, Y.; DU, C.; YU, C.; ZHOU, J. Fast and nondestructive determination of protein content in rapeseeds (*Brassica napus* L.) using Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy (FTIR-PAS). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 11, p. 2239-2245, 2014.

MACHADO, N.; DOMÍNGUEZ-PERLES, R.; RAMOS, A.; ROSA, E. A. S.; BARROS, A. I. R. N. A. Spectrophotometric versus NIR-MIR assessments of cowpea pods for discriminating the impact of freezing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2017.

MADRAS-MAJEWSKA, B.; MAJEWSKI, J. Importance of bees in pollination of croSG in the European Union Countries. In: **Economic Science for Rural Development Conference Proceedings**. 2016.

MAMILLA, R. K.; MISHRA, V. K. Effect of germination on antioxidant and ACE inhibitory activities of legumes. **LWT-Food Science and Technology**, v. 75, p. 51-58, 2017.

MARCHINI, L.C.; SODRÉ, G.S.; MORETI, A.C.C.C. **Mel brasileiro: composição e normas**. Ribeirão Preto: A.S. Pinto, 2004. 111 p.

MARTINEZ, O. A.; SOARES, A. E. E. Melhoramento genético na apicultura comercial para produção da própolis. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 4, p. 982-990, 2012.

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.

MAZOYER, M.; ROUDART, L. **História das agriculturas do mundo: do neolítico à crise contemporânea**. Instituto Piaget, 1998. [tradução de Cláudia F. Falluh Balduino Ferreira]. – São Paulo: Editora UNESP; Brasília, DF: NEAD, 2010.

MAZUREK, S.; SZOSTAK, R.; KITA, A.; KUCHARSKA, A. Z.; SOKÓŁ-ŁĘTOWSKA, A.; HAMOUZ, K. Determination of Antioxidant Activity and Polyphenols Content in Chips by Raman and IR Spectroscopy. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 12, p. 3964-3971, 2017

MCLACHLAN, P.; KISHIMOTO, J.; DE RIBEAUPIERRE, S.; LEE, D. S.; DIOP, M.; ST LAWRENCE, K. Development of a NIRS method to quantify cerebral perfusion and oxidative metabolism in preterm infants with post-hemorrhagic ventricle dilation (Conference Presentation). In: **Advanced Biomedical and Clinical Diagnostic and Surgical Guidance Systems XV**. International Society for Optics and Photonics, 2017. p. 100540S

MEMMEDOV, H.; DURMAZ, B.; OKTAY, L. M.; SELVI, N.; YLDIRIM, H. K.; SÖZMEN, E. Y. Biologically Transformed Propolis Exhibits Cytotoxic Effect on A375 Malignant Melanoma Cells In Vitro. **Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings**, v. 1, n. 10, p. 1059, 2017.

MEYER, C. D. **Matrix analysis and applied linear algebra**. Siam, 2000.

MICHENER, C. D. **The bees of the world**. JHU Press, 2000.

MIHAI, C. M.; MARGHITAS, L. A.; DEZMIREAN, D. S.; BARNUTIU, L. Correlation between polyphenolic profile and antioxidant activity of propolis from Transylvania. **Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies**, v. 44, n. 2, p. 100-103, 2011.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. Pearson Education, 2010.

MUJICA, V.; ORREGO, R.; PÉREZ, J.; ROMERO, P.; OVALLE, P.; ZÚÑIGA-HERNÁNDEZ, J.; ARREDONDO, M.; LEIVA, E. The Role of Propolis in Oxidative Stress and Lipid Metabolism: A Randomized Controlled Trial. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.

MUNERA, S.; AMIGO, J. M.; ALEIXOS, N.; TALENS, P.; CUBERO, S.; BLASCO, J. Potential of VIS-NIR hyperspectral imaging and chemometric methods to identify similar cultivars of nectarine. **Food Control**, v. 86, p. 1-10, 2018

MUXFELDT, H. **Apicultura para todos**. 6. ed. Porto Alegre: Sulina, 1987. 242 p.

NARIMANE, S.; DEMIRCAN, E.; SALAH, A.; SALAH, R. Correlation between antioxidant activity and phenolic acids profile and content of Algerian propolis: Influence of solvent. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 30, 2017.

NEVES, L. C.; ALENCAR, S. M.; CARPES, S. T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. VII BMCFB, p. 107-10, 2009.

NOGUEIRA-NETO, P. Notas sobre a história da apicultura brasileira. **Manual de Apicultura**. Editora Agronomia Ceres, São Paulo, p. 17-32, 1972.

OLDONI, T. L. C.; CABRAL, I. S.; D'ARCE, M. A. R.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M.; NASCIMENTO, A. M.; ALENCAR, S. M. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and purification Technology**, v. 77, n. 2, p. 208-213, 2011.

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. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 26, p. 2054–2062, 2015.

OLIVEIRA, E. M.; BRAGA, J. W. B.; COSTA, A. F. D. Discrimination between similar woods by molecular fluorescence and partial least squares. **Química Nova**, v. 38, n. 9, p. 1176-1180, 2015.

OLIVEIRA, S. D. Determinação da capacidade antirradicalar de produtos naturais utilizando-se a quimiluminescência do luminol e ensaios fotométricos com radicais estáveis. 2011. 95 f. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ORBEGOZO, D.; SU, F.; XIE, K.; RAHMANIA, L.; TACCONE, F. S.; DE BACKER, D.; VINCENT, J. L.; CRETEUR, J. Peripheral Muscle Near-Infrared Spectroscopy (NIRS) Variables are Altered Early in Septic Shock. **Shock**, 2017.

ORUÇ, H. H.; SORUCU, A.; ÜNAL, H. H.; AYDIN, L. Effects of season and altitude on biological active certain phenolic compounds levels and partial standardization of

propolis. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 64, n. 1, p. 13-20, 2017.

PARANI, J. R.; CORTOPASSI-LAURINO, M. Flores e abelhas em São Paulo. Edusp, 1993.

PARK, Yong K.; ALENCAR, Severino M.; AGUIAR, Claudio L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502-2506, 2002.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; AGUIAR, C. L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência rural**, v. 32, n. 6, p. 997-1003, 2002.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, v. 58, p. 2-7, 2000.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; WANG, H. K.; BASTOW, K.; COSENTINO, M.; LEE, K. H. Determinação das atividades citotóxicas e anti-HIV dos extratos etanólicos de própolis coletadas em diferentes regiões do Brasil. **Mensagem Doce**, v. 56, p. 2-5, 2000.

PARK, Y. K.; KOO, M. H.; SATO, H. H.; CONTADO, J. L. Survey of some components of propolis which were collected by *Apis mellifera* in Brazil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia** v. 38, p. 1253–1259, 1995.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. D. S.; REYES, F. G. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 1190-1198, 2008.

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.

PEIRS, A.; TIRRY, J.; VERLINDEN, B.; DARIUS, P.; NICOLAI, B. Effect of biological variability on the robustness of NIR models for soluble solids content of apples. **Post Harvest Biology and Technology**, v. 28, p. 269–280, 2002.

PENNER, Michael H. Basic principles of spectroscopy. In: Food Analysis. Springer US, p. 375-385, 2010.

PEREIRA D. S.; ADELINO, C. J.; OLIVEIRA, M. S.; SILVA, M.; HOLANDA-NETO, J. P. Apicultura como fonte de renda na comunidade de Vaca Morta no município de Marcelino Vieira–RN, Brasil. **Cadernos de Agroecologia**, v. 10, n. 3, 2016.

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.

PIERINI, G. D.; FERNANDES, D. D. S.; DINIZ, P. H. G. D.; ARAÚJO, M. C. U.; DI NEZIO, M. S.; CENTURIÓN, M. E. A digital image-based traceability tool of the geographical origins of Argentine propolis. **Microchemical Journal**, v. 128, p. 62-67, 2016.

PIETTA, P. G.; GARDANA, C.; PIETTA, A. M. Analytical methods for quality control of propolis. **Fitoterapia**, v. 73, p. S7-S20, 2002.

PIZZI, G. T.; PEDRETTI, E. F.; DUCA, D.; ROSSINI, G.; MENGARLLI, C.; LLARI, A.; RENZI, A.; MANCINI, M. Energy characteristics assessment of olive pomace by means of FT-NIR spectroscopy. **Energy**, v. 147, p. 51-58, 2018.

POLAK, T.; HERRMANN, M. J.; MÜLLER, L. D.; ZELLER, J. B.; KATZORKE, A.; FISCHER, M.; SPIELMANN, F.; WEINMANN, E.; HOMMERS, L.; LAUER, M.; FALLGATTER, A. J.; DECKERT, J. Near-infrared spectroscopy (NIRS) and vagus somatosensory evoked potentials (VSEP) in the early diagnosis of Alzheimer's

disease: rationale, design, methods, and first baseline data of the Vogel study. **Journal of Neural Transmission**, v. 124, n. 11, p. 1473-1488, 2017.

POZZI, A. C. S. Desenvolvimento de métodos de análise Espectrofotométrica de flavonóides do “maracujá”. 2007. 86 f. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

PRATAMI, D. K.; MUN'IM, A.; SUNDOWO, A.; SAHLAN, M. Phytochemical Profile and Antioxidant Activity of Propolis Ethanolic Extract from Tetragonula Bee. **Pharmacognosy Journal**, v. 10, n. 1, 2018.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231-1237, 1999.

REINHOLDS, I.; BARTKEVICS, V.; SILVIS, I. C.; VAN RUTH, S. M.; ESSLINGER, S. Analytical techniques combined with chemometrics for authentication and determination of contaminants in condiments: A review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 44, p. 56-72, 2015.

REVILLA, I.; VIVAR-QUINTANA, A. M.; GONZÁLEZ-MARTÍN, I.; 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.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RICE-EVANS, C. A.; BURDON, R. H. (Ed.). Free radical damage and its control. Elsevier, 1994.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RINNAN, Å.; VAN DEN BERG, F.; ENGELSEN, S. B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 1201-1222, 2009.

ROFFET-SALQUE, M.; RIGERT, M.; EVERSLED, R. P.; OUTRAM, A. K.; CRAMP, L. J. E.; DECAVALLAS, O.; DUNNE, J.; GERBAULT, P.; MILETO, S.; MIRABAUD, S.; PAAKKONEN, M.; SMYTH, J.; SOBERL, L.; WHELTON, H. L.; ALDAY-RUIZ, A.; ASPLUND, H.; BARTKOWIAK, M.; BAYER-NIEMEIER, E.; BELHOUCHE, L.; BERDARDINI, F.; BUDJA, M.; COONEY, G.; CUBAS, M.; DANAHER, E. M.; DINIZ, M.; DOMBOROCZKI, L.; FABBRI, C.; GONZALES-URQUIJO, J.; GUILAINE, J.; HACHI, S.; HARTWELL, B. N.; HOFMANN, D.; HOHLE, I.; IBANEZ, J. J.; KARUL, N.; KHERBOUCHE, F.; KIELY, J.; KOTSAKIS, K.; LUETH, F.; MALLORY, J. P.; MANEN, C.; MARCINIAK, A.; MAURICE-CHABARD, B.; GONIGLE, M. A. M.; MULAZZANI, S.; OZDOGAN, M.; PERIC, O. S.; PERIC, S. R.; PETRASCH, J.; PETREQUIN, A. M.; PETREQUIN, P.; POENSGEN, U.; POLLARD, C. J.; POPLIN, F.; RADI, G.; STADLER, P.; SATAUBLE, H.; TASIC, N.; UREM-KOTSOU, D.; VUKOVIC, J. B.; WALSH, F.; WHITTLE, A.; WOLFRAM, S.; ZAPATA-PENA, L.; ZOUGHLAMI, J. Widespread exploitation of the honeybee by early Neolithic farmers. **Nature**, v. 527, n. 7577, p. 226-230, 2015.

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; DE MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. D. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado técnico**, 2006.

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; DE MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. D. G.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS<sup>o+</sup>. **Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico**,

2007.

SAEYS, W.; MOUAZEN, A. M.; RAMON, H. Potential for onsite and online analysis of pig manure using visible and near infrared reflectance spectroscopy. **Biosystems Engineering**, v. 91, n. 4, p. 393-402, 2005.

SAHINLER, N.; KAFTANOGLU, O. Natural product propolis: Chemical composition. **Natural Product Research**, v. 19, n. 2, p. 183-188, 2005.

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.

SARIKAYA, S. B. O.; GÜLÇİN, İ.; SUPURAN, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of human erythrocyte isozymes I and II with a series of phenolic acids. **Chemical biology & drug design**, v. 75, n. 5, p. 515-520, 2010.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. **Analytical chemistry**, v. 36, n. 8, p. 1627-1639, 1964.

SCIENTIFIC, C. The theory of HPLC. Chromatographic parameters. e-Learning for the Analytical Chemistry Community, LC/GC, **Chromacademy**, p. 1-21, 2014.

SEBRAE. **Boletim setorial sobre o Agronegócio**. Recife, 15 p. 2011. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/Anexos/boletim-apicultura.pdf>>. Acesso em: 9 de Novembro de 2016.

SETTLE, F. A. Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. Prentice Hall PTR, 1997.

SFORCIN, J. M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 113, n. 1, p. 1-14, 2007.

SHAHIDI, F. (Ed.). Handbook of antioxidants for Food Preservation. Woodhead Publishing, 2015.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Critical reviews in food science & nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SHARMA, B. K. Instrumental methods of chemical analysis. Krishna Prakashan Media, 2000.

SIESLER, H. W.; OZAKI, Y.; KAWATA, S.; HEISE, H. M. (Eds.). Near-infrared spectroscopy: principles, instruments, applications. **John Wiley & Sons**, 2008.

SIMÕES, C. C.; ARAÚJO, D. B.; ARAÚJO, R. P. C. Estudo in vitro e ex vivo da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 84-9, 2008.

SINELLI, N.; SPINARDI, A.; EGIDIO, V.D.; MIGNANI, I.; CASIRAGHI, E. Evaluation of quality and nutraceutical content of blueberries (*Vaccinium corymbosum*) by near and mid-infrared spectroscopy. **Postharvest Biology and Technology**, v. 50, p. 31-36, 2008.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, 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.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Fundamentals of analytical chemistry. 9 ed. Cengage Learning, 2014.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. John Wiley & Sons, 2012.

SOARES, L. F.; SILVA, D. C. D.; BERGO, M. C., CORADIN, V. T., BRAGA, J. W.; PASTORE, T. Evaluation of a nir handheld device and pls-da for discrimination of six similar amazonian wood species. **Química Nova**, v. 40, n. 4, p. 418-426, 2017.

SOARES, R. N.; REIMER, R. A.; ALENEZI, Z.; DOYLE-BAKER, P. K.; MURIAS, J. M. Near-infrared spectroscopy can detect differences in vascular responsiveness to a hyperglycaemic challenge in individuals with obesity compared to normal-weight individuals. **Diabetes and Vascular Disease Research**, v. 15, n. 1, p. 55-63, 2018.

SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

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.

SOUZA, A. M. D.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 223-229, 2012.

STOCKL, A.; LICHTI, F. Near-infrared spectroscopy (NIRS) for a real time monitoring of the biogas process. **Bioresource technology**, v. 247, p. 1249-1252, 2018.

STUART, B. **Infrared spectroscopy**. John Wiley & Sons, Inc., 2005.

STUART, B.H. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2004.

SUN, D. W. (Ed.). **Infrared spectroscopy for food quality analysis and control**. Academic Press, 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.

TEIXEIRA, K. S. S.; DA CRUZ FONSECA, S. G.; DE MOURA, L. C. B.; DE MOURA, M. L. R.; BORGES, M. H. P.; BARBOSA, E. G. Use of chemometrics to compare NIR and HPLC for the simultaneous determination of drug levels in fixed-dose combination tablets employed in tuberculosis treatment. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 149, p. 557-563, 2018.

TRIPATHI, S.; MISHRA, H. N. A rapid FT-NIR method for estimation of aflatoxin B 1 in red chili powder. **Food Control**, v. 20, n. 9, p. 840-846, 2009.

TRYGG, J.; HOLMES, E.; LUNDSTEDT, T. Chemometrics in metabonomics. **Journal of proteome research**, v. 6, n. 2, p. 469-479, 2007.

UTISPAN, K.; CHITKUL, B.; KOONTONGKAEW, S. Cytotoxic Activity of Propolis Extracts from the Stingless Bee *Trigona Sirindhornae* Against Primary and Metastatic Head and Neck Cancer Cell Lines. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 18, n. 4, p. 1051, 2017.

VALDERRAMA, L.; PAIVA, V. B.; MARÇO, P. H.; VALDERRAMA, P. Proposta experimental didática para o ensino de análise de componentes principais. **Química Nova**, v. 39, n. 2, p. S1-S2, 2016.

VAN'T LEVEN, L.; BOOT, W. J.; MUTSAERS, M.; SEGEREN, P.; VELTHUIS, H. **Beekeeping in the tropics**. Agromisa/CTA, 2005.

VARMUZA, K.; FILZMOSER, P. **Introduction to multivariate statistical analysis in chemometrics**. CRC press, 2016.

VENEGAS, Y.; PEÑA, C.; PASTENE, E.; CONTRERAS, D. A new near-infrared method for simultaneous determination of caffeic acid phenethyl ester and antioxidant activity of propolis samples. **Journal of Apicultural Research**, v. 55, n. 1, p. 8-18, 2016.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. Isolation and identification of phenolic compounds. In: **Phenolic compound biochemistry**. Springer Netherlands. p. 151-196, 2008.

VIEIRA, M. I. **Apicultura atual: abelhas africanizadas: melhor adaptação ecológica, maior produtividade, maiores lucros**. São Paulo: Nobel, 1986. 136 p.

VISIOLI, F.; BELLOMO, G.; GALLI, C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 247, n. 1, p. 60-64, 1998.

VOLPI, N.; BERGONZINI, G. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC–electrospray mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, n. 3, p. 354-361, 2006.

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, p. e0182161, 2017.

WANG, Y.; VELTKAMP, D. J.; KOWALSKI, B. R. Multivariate instrument standardization. **Analytical Chemistry**, v. 63, p. 2750–2756, 1991.

WILLARD, H. H.; MERRITT, JR. L. L.; DEAN, J. A.; SETTLE JR. F. A. *Instrumental methods of analysis*. 1988.

WILLIAMS, P.C.; NORRIS, K.H. (eds). **Near-infrared Technology in the Agricultural and Food Industries**. American Association of Cereal Chemists, St Paul, Minnesota, p. 145–169, 2001.

WINFREE, R.; GROSS, B. J.; KREMEN, C. Valuing pollination services to agriculture. **Ecological Economics**, v. 71, p. 80-88, 2011.

WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, v. 58, n. 2, p. 109-130, 2001.

WOOD, R. How to validate analytical methods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 9-10, p. 624-632, 1999.

WU, S.; HUANG, X. Preparation and antioxidant activities of oligosaccharides from *Crassostrea gigas*. **Food Chemistry**, v. 216, p. 243-246, 2017.

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.

XU, L.; YAN, S. M.; CAI, C. B.; YU, X. P. Untargeted detection and quantitative analysis of poplar balata (PB) in Chinese propolis by FT-NIR spectroscopy and chemometrics. **Food chemistry**, v. 141, n. 4, p. 4132-4137, 2013.

YAO, X. H.; ZHANG, Z. B.; SONG, P.; HAO, J. Y.; ZHANG, D. Y.; ZHANG, Y. F. Different harvest seasons modify bioactive compounds and antioxidant activities of *Pyrola incarnata*. **Industrial CroSG and Products**, v. 94, p. 405-412, 2016.

YE, M.; GAO, Z.; LI, Z.; YUAN, Y.; YUE, T. Rapid detection of volatile compounds in apple wines using FT-NIR spectroscopy. **Food chemistry**, v. 190, p. 701-708, 2016.

YILMAZ, O. Honey Bee Products in Turkey. **Journal of Animal Science Advances**, v. 6, n. 10, p. 1779-1785, 2016.

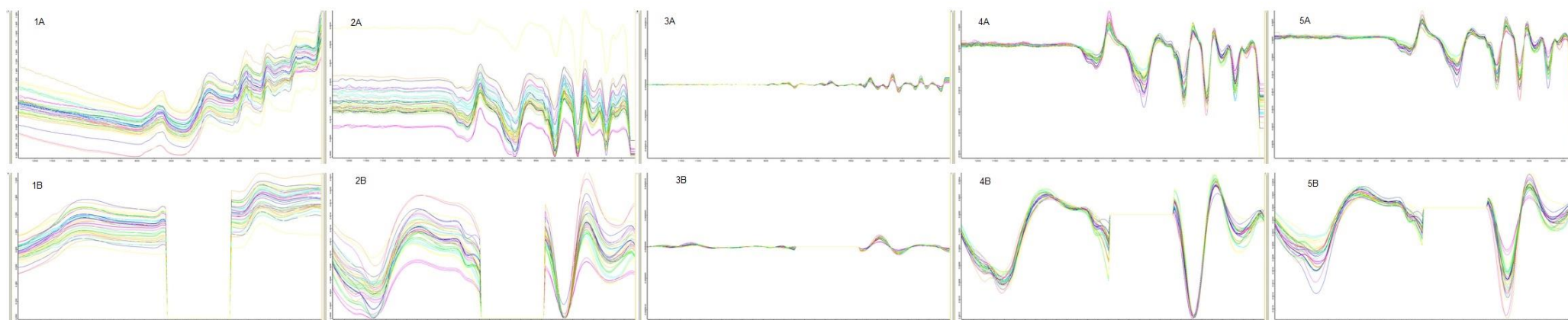
YU, Y.; ZHANG, K.; ZHANG, L.; ZONG, H.; MENG, L.; HAN, R. Cerebral near-infrared spectroscopy (NIRS) for perioperative monitoring of brain oxygenation in children and adults. **The Cochrane Library**, 2018.

ZHANG, C.; SHEN, X.; CHEN, J.; JIANG, X.; HU, F. Identification of Free Radical Scavengers from Brazilian Green Propolis Using Off-Line HPLC-DPPH Assay and LC-MS. **Journal of Food Science**, 2017.

ZHANG, T.; OMAR, R.; SIHERI, W.; AL-MUTAIRI, S.; CLEMENTS, C.; FEARNLEY, J.; EDRADA-EBEL, R. A.; WATSON, D. Chromatographic analysis with different detectors in the chemical characterisation and dereplication of African propolis. **Talanta**, v. 120, p. 181-190, 2014.

## APENDICE 1

Figura 57 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para FRAP de própolis bruta



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

1A: espectros sem pré-processamento (toda região); 1B: espectros sem pré-processamento (região selecionada)

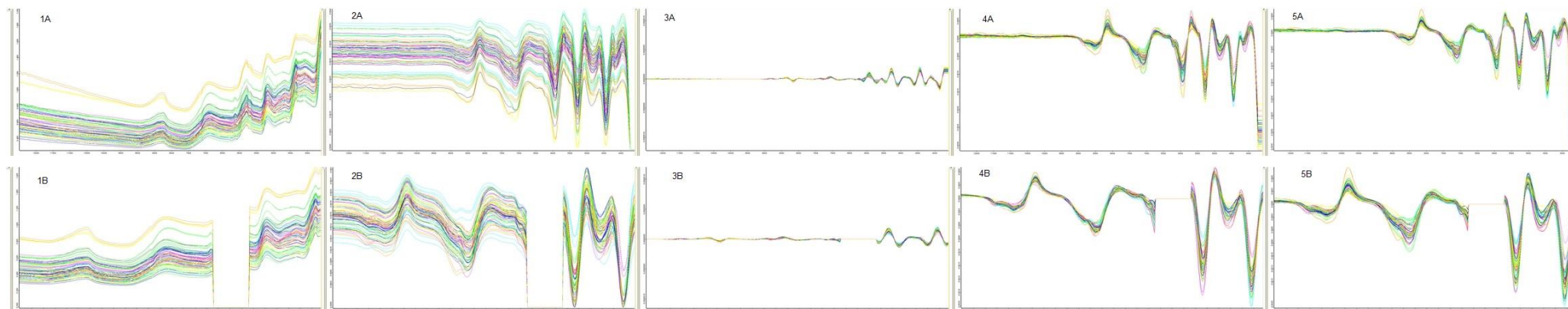
2A: espectros com SG + COE (toda região); 2B: espectros com SG + COE (região selecionada)

3A: espectros com SG + 2D (toda região); 3B: espectros com SG + 2D (região selecionada)

4A: espectros com SG + MSC (toda região); 4B: espectros com SG + MSC (região selecionada)

5A: espectros com SG (toda região); 5B: espectros com SG (região selecionada)

Figura 58 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para FRAP de própolis macerada



Fonte: Do *software* Opus 7.2 quant 2.

1A: espectros sem pré-processamento (toda região); 1B: espectros sem pré-processamento (região selecionada)

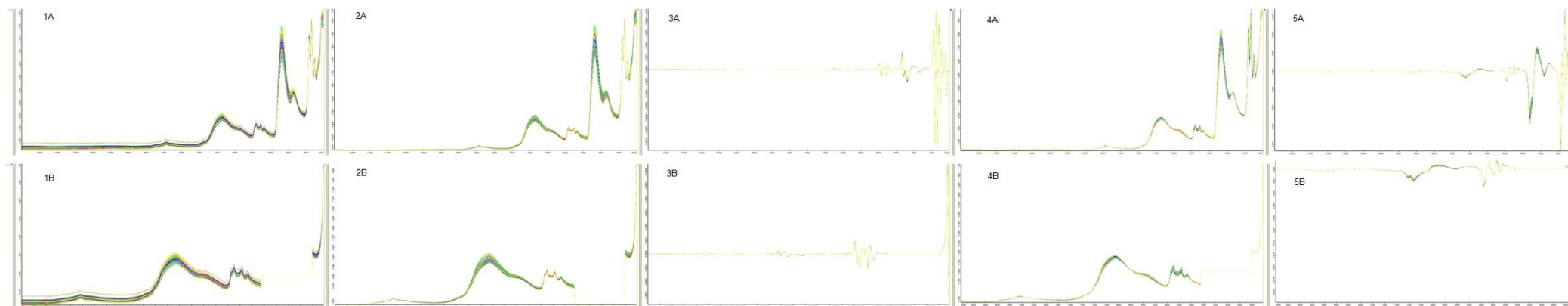
2A: espectros com SG + COE (toda região); 2B: espectros com SG + COE (região selecionada)

3A: espectros com SG + 2D (toda região); 3B: espectros com SG + 2D (região selecionada)

4A: espectros com SG + MSC (toda região); 4B: espectros com SG + MSC (região selecionada)

5A: espectros com SG (toda região); 5B: espectros com SG (região selecionada)

Figura 59 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para FRAP de EEP



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

1A: espectros sem pré-processamento (toda região); 1B: espectros sem pré-processamento (região selecionada)

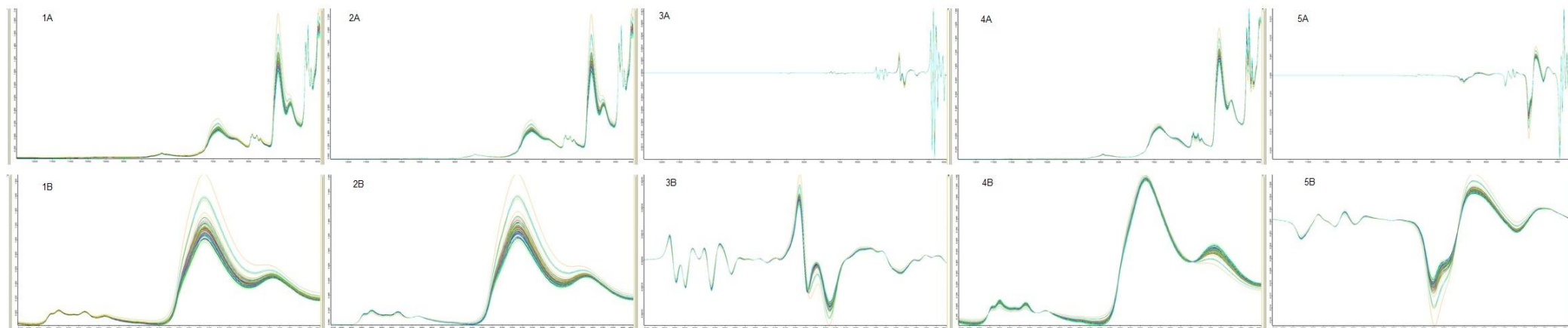
2A: espectros com COE (toda região); 2B: espectros com COE (região selecionada)

3A: espectros com 2D (toda região); 3B: espectros com 2D (região selecionada)

4A: espectros com MSC (toda região); 4B: espectros com MSC (região selecionada)

5A: espectros com SG (toda região); 5B: espectros com SG (região selecionada)

Figura 60 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para FRAP de EEPc



Fonte: Do *software* Opus 7.2 quant 2.

1A: espectros sem pré-processamento (toda região); 1B: espectros sem pré-processamento (região selecionada)

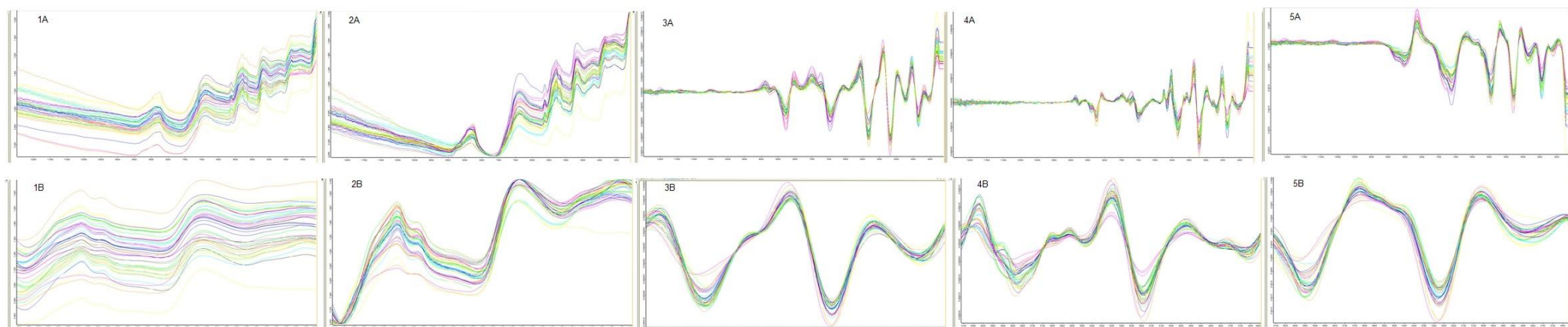
2A: espectros com COE (toda região); 2B: espectros com COE (região selecionada)

3A: espectros com 2D (toda região); 3B: espectros com 2D (região selecionada)

4A: espectros com MSC (toda região); 4B: espectros com MSC (região selecionada)

5A: espectros com SG (toda região); 5B: espectros com SG (região selecionada)

Figura 61 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para ABTS de própolis bruta



Fonte: Do *software* Opus 7.2 quant 2.

1A: espectros sem pré-processamento (toda região); 1B: espectros sem pré-processamento (região selecionada)

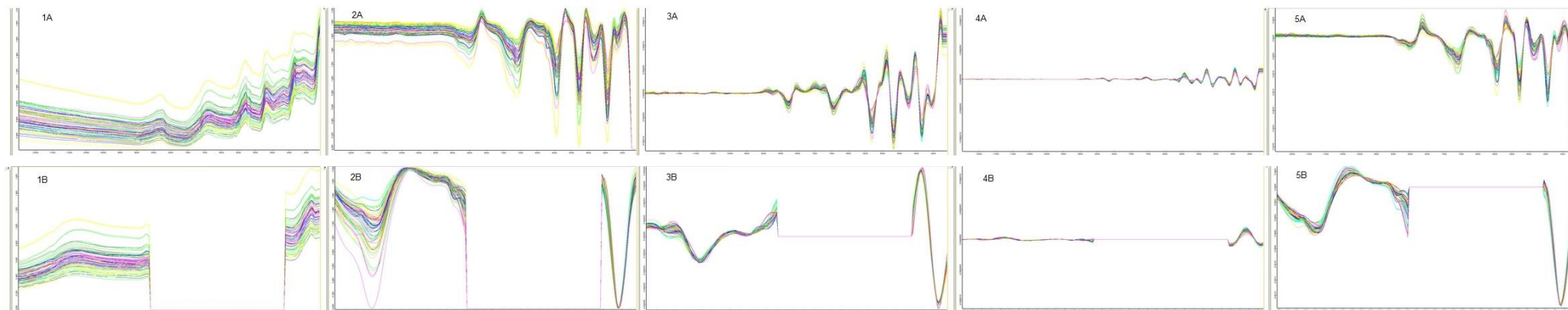
2A: espectros com Min-Max normalization (toda região); 2B: espectros com Min-Max normalization (região selecionada)

3A: espectros com SG + 1D + MSC (toda região); 3B: espectros com SG + 1D + MSC (região selecionada)

4A: espectros com 2D (toda região); 4B: espectros com 2D (região selecionada)

5A: espectros com 1D + MSC (toda região); 5B: espectros com 1D + MSC (região selecionada)

Figura 62 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para ABTS de própolis macerada



Fonte: Do *software* Opus 7.2 quant 2.

1A: espectros sem pré-processamento (toda região); 1B: espectros sem pré-processamento (região selecionada)

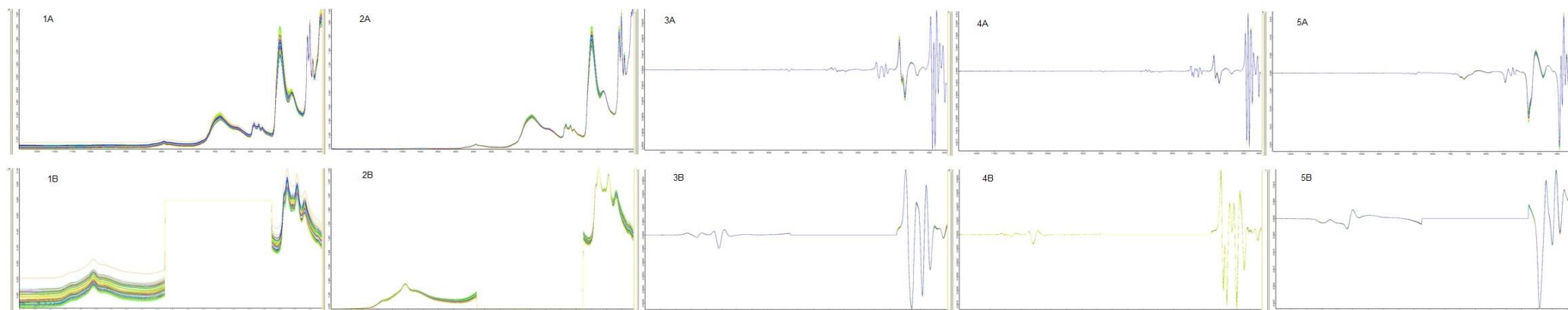
2A: espectros com SG + Min-Max normalization (toda região); 2B: espectros com SG + Min-Max normalization (região selecionada)

3A: espectros com SG + 1D + MSC (toda região); 3B: espectros com SG + 1D + MSC (região selecionada)

4A: espectros com SG + 2D (toda região); 4B: espectros com SG + 2D (região selecionada)

5A: espectros com SG + MSC (toda região); 5B: espectros com SG + MSC (região selecionada)

Figura 63 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para ABTS de EEP



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

1A: espectros sem pré-processamento (toda região); 1B: espectros sem pré-processamento (região selecionada)

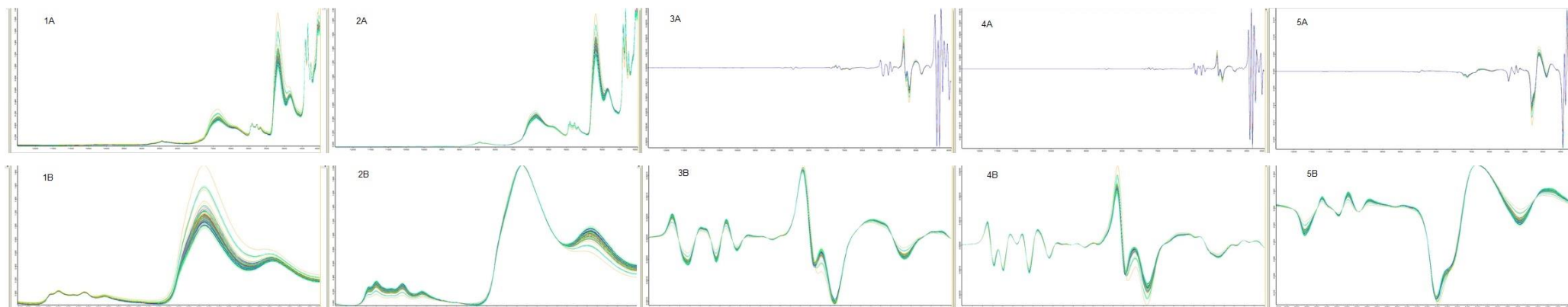
2A: espectros com Min-Max normalization (toda região); 2B: espectros com Min-Max normalization (região selecionada)

3A: espectros com SG + 1D + MSC (toda região); 3B: espectros com SG + 1D + MSC (região selecionada)

4A: espectros com 2D (toda região); 4B: espectros com 2D (região selecionada)

5A: espectros com 1D + MSC (toda região); 5B: espectros com 1D + MSC (região selecionada)

Figura 64 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para ABTS de EEPC



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

1A: espectros sem pré-processamento (toda região); 1B: espectros sem pré-processamento (região selecionada)

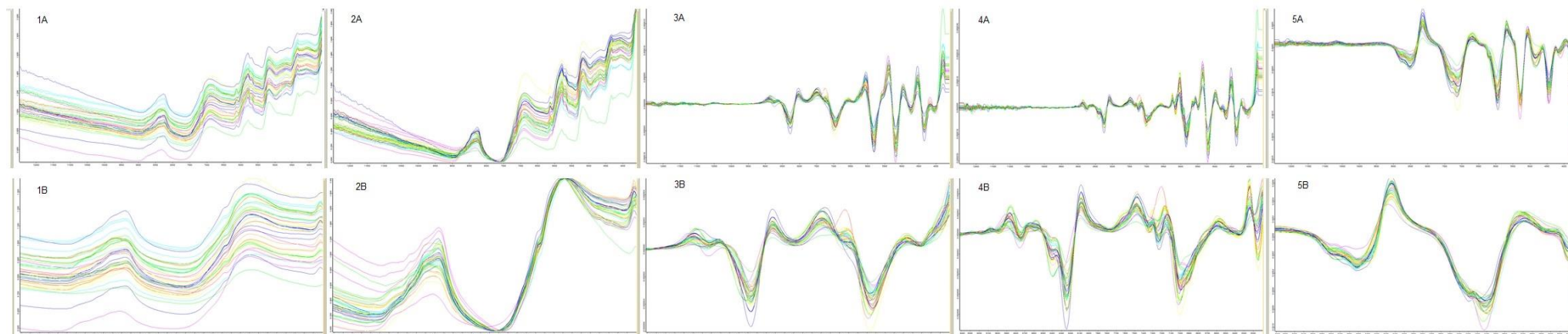
2A: espectros com Min-Max normalization (toda região); 2B: espectros com Min-Max normalization (região selecionada)

3A: espectros com SG + 1D + MSC (toda região); 3B: espectros com SG + 1D + MSC (região selecionada)

4A: espectros com 2D (toda região); 4B: espectros com 2D (região selecionada)

5A: espectros com 1D + MSC (toda região); 5B: espectros com 1D + MSC (região selecionada)

Figura 65 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para fenólicos de própolis bruta



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

1A: espectros sem pré-processamento (toda região); 1B: espectros sem pré-processamento (região selecionada)

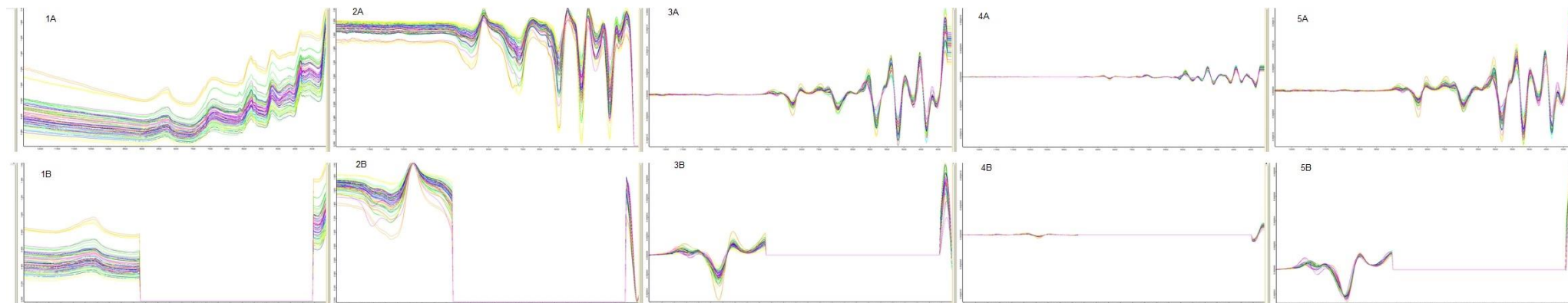
2A: espectros com Min-Max normalization (toda região); 2B: espectros com Min-Max normalization (região selecionada)

3A: espectros com SG + 1D (toda região); 3B: espectros com SG + 1D (região selecionada)

4A: espectros com 2D (toda região); 4B: espectros com 2D (região selecionada)

5A: espectros com 1D + MSC (toda região); 5B: espectros com 1D + MSC (região selecionada)

Figura 66 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para fenólicos de própolis macerada



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

1A: espectros sem pré-processamento (toda região); 1B: espectros sem pré-processamento (região selecionada)

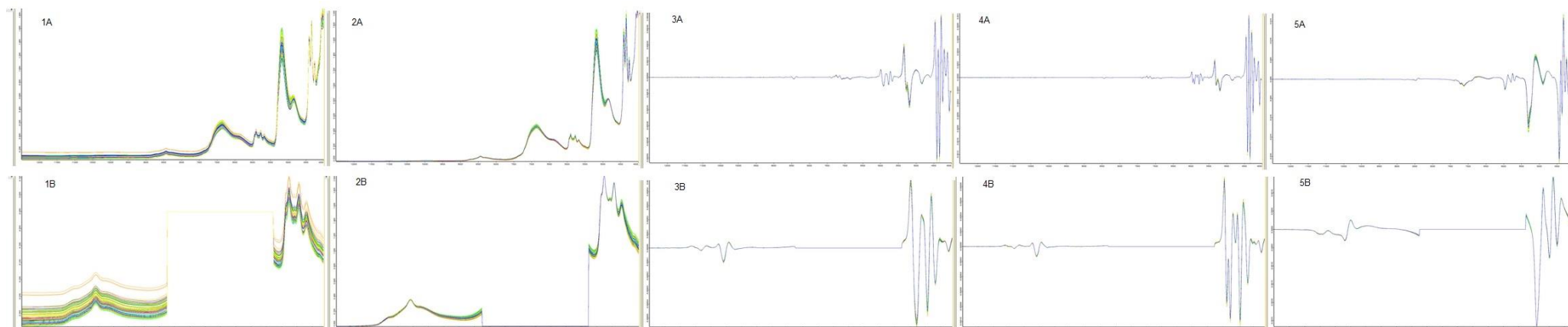
2A: espectros com SG + Min-Max normalization (toda região); 2B: espectros com SG + Min-Max normalization (região selecionada)

3A: espectros com SG + 1D (toda região); 3B: espectros com SG + 1D (região selecionada)

4A: espectros com SG + 2D (toda região); 4B: espectros com SG + 2D (região selecionada)

5A: espectros com SG + 1D + MSC (toda região); 5B: espectros com SG + 1D + MSC (região selecionada)

Figura 67 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para fenólicos de EEP



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

1A: espectros sem pré-processamento (toda região); 1B: espectros sem pré-processamento (região selecionada)

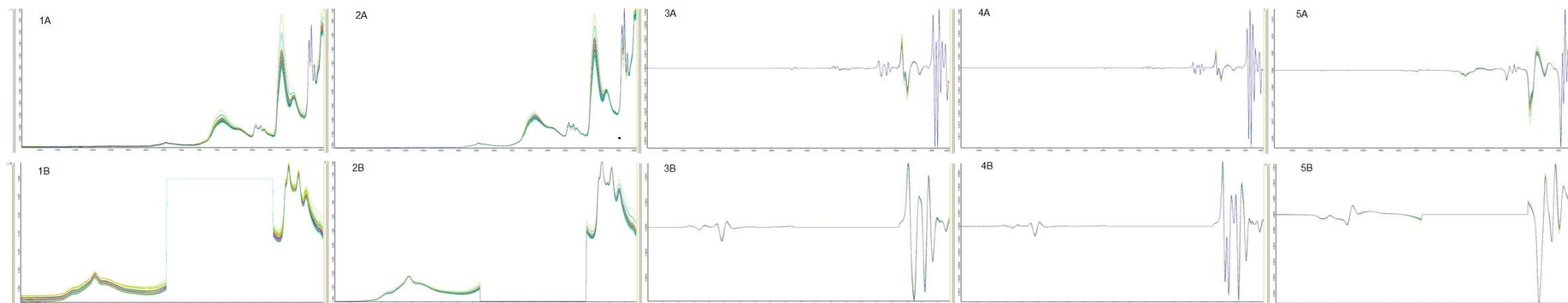
2A: espectros com SG + Min-Max normalization (toda região); 2B: espectros com SG + Min-Max normalization (região selecionada)

3A: espectros com SG + 1D (toda região); 3B: espectros com SG + 1D (região selecionada)

4A: espectros com 2D (toda região); 4B: espectros com 2D (região selecionada)

5A: espectros com 1D + MSC (toda região); 5B: espectros com 1D + MSC (região selecionada)

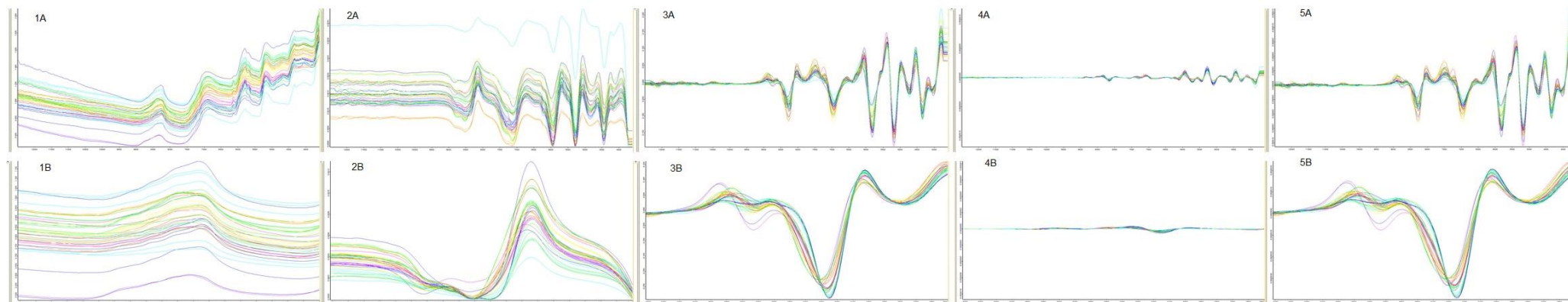
Figura 68 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para fenólicos de EEPc



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

- 1A: espectros sem pré-processamento (toda região); 1B: espectros sem pré-processamento (região selecionada)  
2A: espectros com Min-Max normalization (toda região); 2B: espectros com Min-Max normalization (região selecionada)  
3A: espectros com SG + 1D (toda região); 3B: espectros com SG + 1D (região selecionada)  
4A: espectros com 2D (toda região); 4B: espectros com 2D (região selecionada)  
5A: espectros com 1D + MSC (toda região); 5B: espectros com 1D + MSC (região selecionada)

Figura 69 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para DPPH de própolis bruta



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

1A: espectros sem pré-processamento (toda região); 1B: espectros sem pré-processamento (região selecionada)

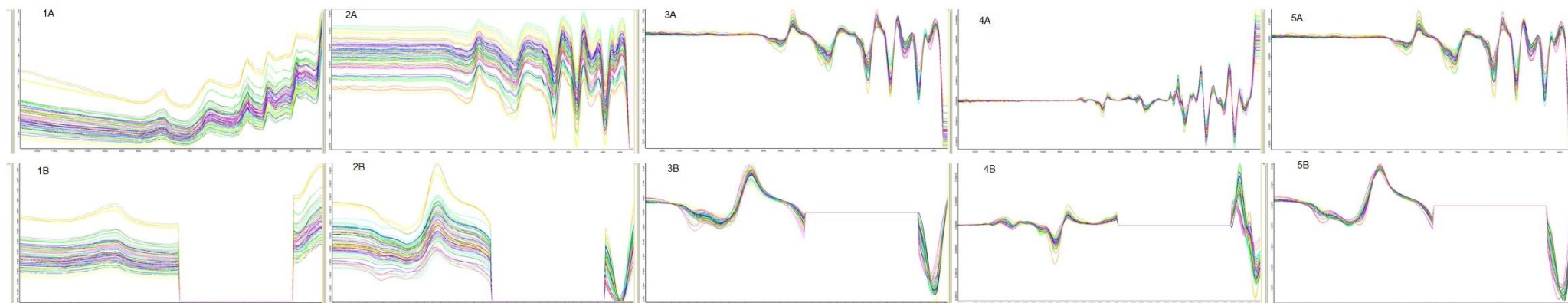
2A: espectros com SG + COE normalization (toda região); 2B: espectros com SG + COE (região selecionada)

3A: espectros com SG + 1D + SNV (toda região); 3B: espectros com SG + 1D + SNV (região selecionada)

4A: espectros com SG + 2D (toda região); 4B: espectros com SG + 2D (região selecionada)

5A: espectros com SG + 1D + MSC (toda região); 5B: espectros com SG + 1D + MSC (região selecionada)

Figura 70 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para DPPH de própolis macerada



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

1A: espectros sem pré-processamento (toda região); 1B: espectros sem pré-processamento (região selecionada)

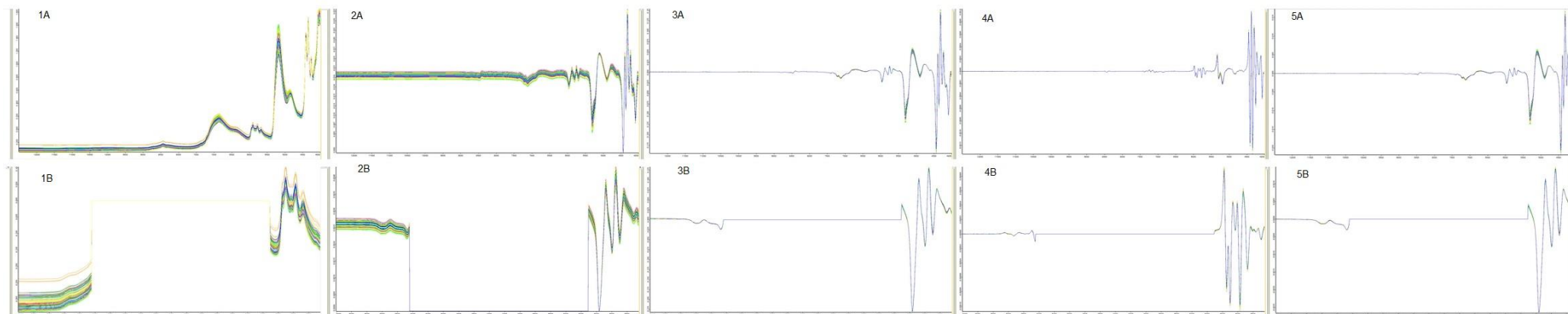
2A: espectros com SG + COE normalization (toda região); 2B: espectros com SG + COE (região selecionada)

3A: espectros com 1D + SNV (toda região); 3B: espectros com 1D + SNV (região selecionada)

4A: espectros com 2D (toda região); 4B: espectros com 2D (região selecionada)

5A: espectros com 1D + MSC (toda região); 5B: espectros com 1D + MSC (região selecionada)

Figura 71 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para DPPH de EEP



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

1A: espectros sem pré-processamento (toda região); 1B: espectros sem pré-processamento (região selecionada)

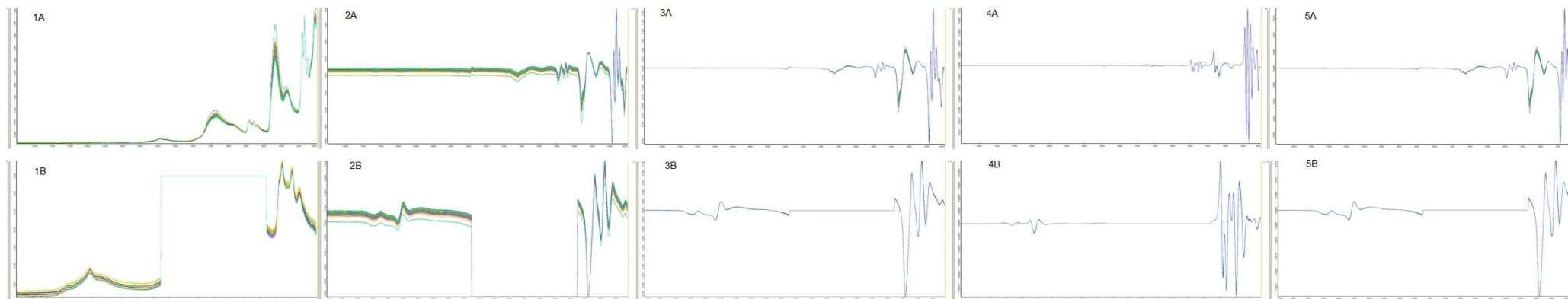
2A: espectros com SG + COE normalization (toda região); 2B: espectros com SG + COE (região selecionada)

3A: espectros com 1D + SNV (toda região); 3B: espectros com 1D + SNV (região selecionada)

4A: espectros com 2D (toda região); 4B: espectros com 2D (região selecionada)

5A: espectros com 1D + MSC (toda região); 5B: espectros com 1D + MSC (região selecionada)

Figura 72 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para DPPH de EEPC



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

1A: espectros sem pré-processamento (toda região); 1B: espectros sem pré-processamento (região selecionada)

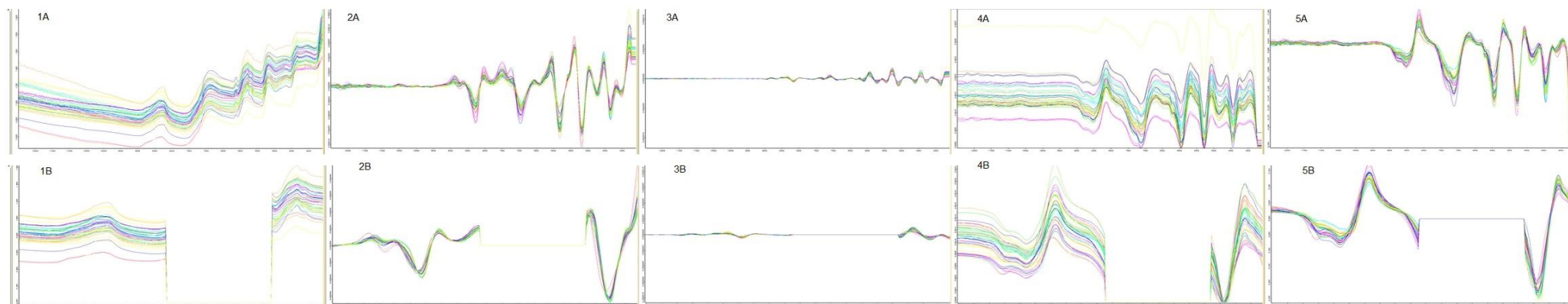
2A: espectros com SG + COE normalization (toda região); 2B: espectros com SG + COE (região selecionada)

3A: espectros com 1D + SNV (toda região); 3B: espectros com 1D + SNV (região selecionada)

4A: espectros com 2D (toda região); 4B: espectros com 2D (região selecionada)

5A: espectros com 1D + MSC (toda região); 5B: espectros com 1D + MSC (região selecionada)

Figura 73 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para flavonoides de própolis bruta



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

1A: espectros sem pré-processamento (toda região); 1B: espectros sem pré-processamento (região selecionada)

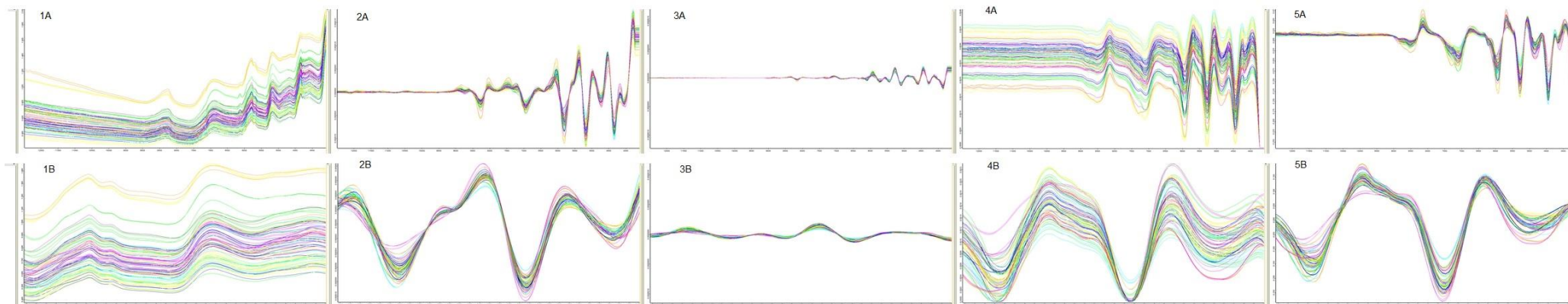
2A: espectros com SG + 1D + MSC normalization (toda região); 2B: espectros com SG + 1D + MSC (região selecionada)

3A: espectros com SG + 2D (toda região); 3B: espectros com SG + 2D (região selecionada)

4A: espectros com SG + COE (toda região); 4B: espectros com SG + COE (região selecionada)

5A: espectros com SG + SNV (toda região); 5B: espectros com 1D + MSC (região selecionada)

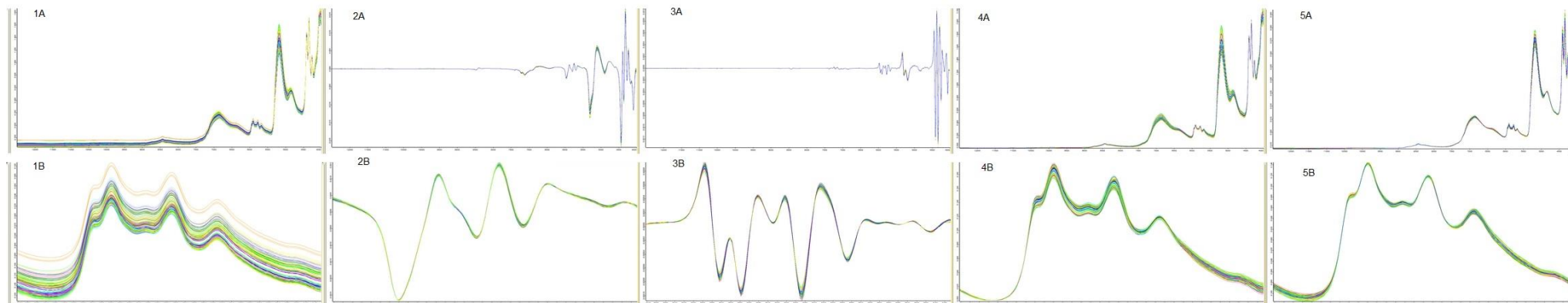
Figura 74 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para flavonoides de própolis macerada



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

- 1A: espectros sem pré-processamento (toda região); 1B: espectros sem pré-processamento (região selecionada)  
2A: espectros com SG + 1D + MSC normalization (toda região); 2B: espectros com SG + 1D + MSC (região selecionada)  
3A: espectros com SG + 2D (toda região); 3B: espectros com SG + 2D (região selecionada)  
4A: espectros com SG + COE (toda região); 4B: espectros com SG + COE (região selecionada)  
5A: espectros com SG + SNV (toda região); 5B: espectros com SG + SNV (região selecionada)

Figura 75 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para flavonoides de EEP



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

1A: espectros sem pré-processamento (toda região); 1B: espectros sem pré-processamento (região selecionada)

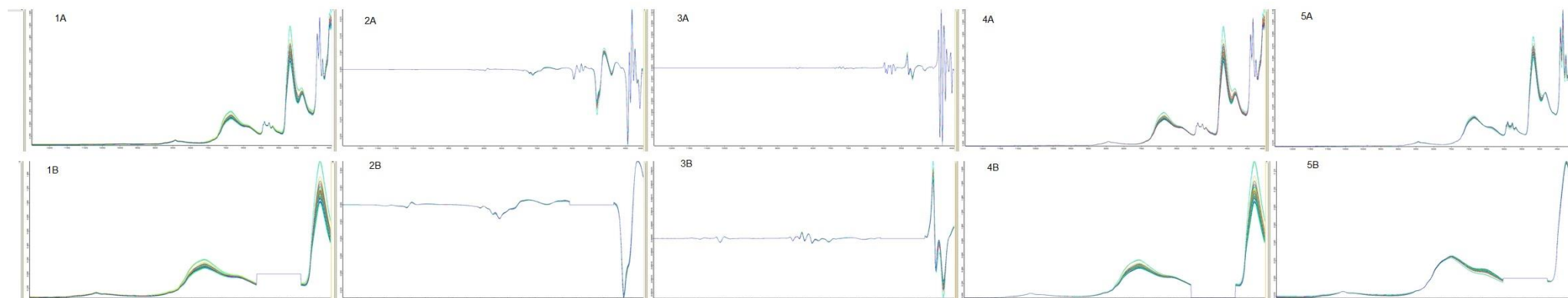
2A: espectros com 1D + MSC normalization (toda região); 2B: espectros com 1D + MSC (região selecionada)

3A: espectros com 2D (toda região); 3B: espectros com 2D (região selecionada)

4A: espectros com COE (toda região); 4B: espectros com COE (região selecionada)

5A: espectros com SNV (toda região); 5B: espectros com SNV (região selecionada)

Figura 76 - Comparação dos pré-processamentos aplicados aos espectros para flavonoides de EEPC



Fonte: Do software Opus 7.2 quant 2.

1A: espectros sem pré-processamento (toda região); 1B: espectros sem pré-processamento (região selecionada)

2A: espectros com 1D + MSC normalization (toda região); 2B: espectros com 1D + MSC (região selecionada)

3A: espectros com 2D (toda região); 3B: espectros com 2D (região selecionada)

4A: espectros com COE (toda região); 4B: espectros com COE (região selecionada)

5A: espectros com SNV (toda região); 5B: espectros com SNV (região selecionada)