

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA
PPGQ/UNICENTRO
MESTRADO EM QUÍMICA APLICADA

Estimação do Teor de Flavonoides e Capacidade Antioxidante de
Extratos de Geoprópolis por Análise de Imagens, Infravermelho e
Quimiometria

JOÃO FÁBIO TURCO

GUARAPUAVA

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA
PPGQ/UNICENTRO
MESTRADO EM QUÍMICA APLICADA

Estimação do Teor de Flavonoides e Capacidade Antioxidante de
Extratos de Geoprópolis por Análise de Imagens, Infravermelho e
Quimiometria

JOÃO FÁBIO TURCO

ORIENTADORA: Dr.^a YOHANDRA R. TORRES

CO-ORIENTADOR: VANDERLEI A. DE LIMA

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-graduação em Química, Mestrado em Química Aplicada, da Universidade Estadual do Centro-Oeste, para obtenção do grau de Mestre em Química.

GUARAPUAVA
2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois Ele me deu força física e mental para a execução deste trabalho, e proveu todos os meios necessários para realiza-lo. Agradeço principalmente a meus pais Maurício F. Turco e Linei A. de Paula Turco, pelo apoio incondicional. Agradeço especialmente à Prof.^a Dr.^a Yohandra R. Torres, minha orientadora, pela grande oportunidade oferecida de realizar o mestrado sob a sua orientação. Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Vanderlei A. de Lima, que de bom grado investiu seu tempo neste projeto. Agradeço ao prof.^o Dr.^o Renato Rau pela doação de amostras. Agradeço aos meus amigos: Jonatas S. Carvalho, Sthéfane V. de Almeida, Fernando M. dos Santos, Christiane S. M. Kolc e Monielly V. Machado, por todo o apoio que me deram, por toda a disposição em ajudar e por todos os momentos em que passamos juntos. Agradeço a minha companheira Larissa I. Taratschuk, que acompanhou toda a execução deste trabalho, sempre me oferecendo apoio e carinho. Agradeço a todos que, de alguma forma, me auxiliaram na conclusão deste trabalho. Também agradeço às agências de fomento, pelo imprescindível auxílio financeiro.

“Pequena é a abelha entre os seres alados: o que produz, entretanto, é o que há de mais doce”.

Eclesiástico 11:3

RESUMO

A geoprópolis é um produto apícola, resinoso e gomoso, com propriedades adesivas, produzido pelas abelhas nativas sem ferrão a partir da mistura de terra com própolis. As abelhas sem ferrão utilizam a geoprópolis para a construção, assepsia e calafetação dos ambientes ocupados pela colônia. A composição química da geoprópolis é variável de acordo com as características botânicas onde as colmeias estão inseridas, sendo composta usualmente de resinas, ceras, óleos essenciais e pólen, apresentando substâncias tais como os flavonoides, os ácidos fenólicos, os ésteres e os terpenos, além de outros compostos. A geoprópolis ainda não possui uma legislação específica que estipule parâmetros para seu controle de qualidade, sendo que existe uma enorme variedade de espécies de abelhas sem ferrão e tipos de geoprópolis. Este trabalho reconhece esta carência e procura investigar a relação entre a composição química e a capacidade antioxidante de geoprópolis de abelhas nativas, por meio de parâmetros espectroscópicos e análises de imagens dos extratos de geoprópolis. Assim, o objetivo principal deste trabalho foi construir modelos capazes de estimar, de maneira rápida, índices de qualidade para a geoprópolis. Dessa forma, primeiramente foram determinados os teores de flavonoides totais pelo método espectrofotométrico de complexação com AlCl_3 , e as atividades antirradicais, pelos métodos de redução do radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina) e redução do Fe^{+3} a Fe^{+2} (FRAP) dos extratos etanólicos de geoprópolis. Na sequência foram obtidos espectros NIR e imagens que foram calibrados utilizando regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). Os modelos gerados por PLS apresentaram os parâmetros de mérito R^2 (coeficiente de correlação), RMSEC (raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração), RMSECV (raiz quadrada do erro quadrático médio da validação cruzada) e RMSEP (raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão) adequados para as determinações da atividade antioxidante e teores de flavonoides totais em geoprópolis. Dessa forma, a obtenção de um espectro NIR ou de uma imagem fotográfica digital de extratos de geoprópolis permite estimar, com exatidão adequada, os teores de flavonoides totais e de sua capacidade antioxidante.

Palavras-chave: Geoprópolis; flavonoides totais; atividade antioxidante; PLS; análise multivariada de imagens; NIR.

RÉSUMÉ

La géopropolis est un produit apicole, résineux et gommeux, doté de propriétés adhésives, fabriqué par les abeilles indigènes sans dard du mélange de terre avec propolis. Les abeilles sans dard utilisent la géopropolis pour la construction, l'asepsie et le calfatage des environnements occupés par la colonie. La composition chimique de la géopropolis varie en fonction des caractéristiques botaniques où les ruches sont insérées ; généralement la géopropolis est composée de résines, de cires, d'huiles essentielles et de pollen, et présente des substances telles que les flavonoïdes, l'acides phénoliques, les esters et les terpènes, parmi d'autres composés. La géopropolis ne dispose pas encore de législation spécifique définissant les paramètres de contrôle de la qualité. Il existe une grande variété d'espèces d'abeilles et de types de géopropolis. Ce travail reconnaît cette déficience et cherche à étudier la relation entre la composition chimique et la capacité antioxydant des géopropolis d'abeilles indigènes, au moyen des paramètres spectroscopiques et analyse des images des extraits de géopropolis. L'objectif principal de ce travail académique était donc de construire des modèles capables d'estimer, de manière simple, indices de qualité pour la géopropolis. De cette manière, le contenu en flavonoïdes totaux ont été déterminés par la méthode spectrophotométrique de complexation avec AlCl_3 et les activités anti-radicalaires, par les méthodes de réduction du radicalaire stable DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) et de la réduction de l'ion Fe^{+3} en Fe^{+2} (FRAP) des extraits éthanoliques de géopropolis. Les spectres NIR et les images ont ensuite été obtenus, qui ont été calibrés en utilisant la régression des moindres carrés partiels PLS. Les modèles générés par PLS ont présenté des chiffres de mérite adéquats pour la détermination de l'activité antioxydante et de la teneur totale en flavonoïdes dans la géopropolis : le R^2 (coefficient de corrélation), le RMSEC (racine carrée de l'erreur quadratique moyenne d'étalonnage), le RMSECV (racine carrée de l'erreur quadratique moyenne de validation croisée) et le RMSEP (racine carrée moyenne de l'erreur de prédiction). L'obtention d'un spectre NIR (SPIR) ou d'une image photographique numérique d'extraits de géopropolis permet d'estimer, avec une exactitude adéquate, le contenu des flavonoïdes totaux et leur capacité antioxydant.

Mots-clés : géopropolis ; flavonoïdes totaux ; capacité antioxydant ; PLS ; analyse multivariée d'image ; SPIR

ABSTRACT

Geopropolis is a resinous gummous apicultural product, with adhesive properties, produced by native stingless bees from mixing earth and propolis. Stingless bees use geopropolis for the construction, asepsis and sealing of the environments occupied by the colony. The chemical composition of geopropolis is variable according to the botanical characteristics from the local where the colonies are inserted. Geopropolis is usually made of resins, waxes, oils and polymers, natural products from plants like flavonoids, phenolic acids, esters and terpenes, as well as other compounds. Despite the great variability of stingless bee species and possibly, different types of geopropolis, there is not a proper legislation about the quality parameters of geopropolis. The present study aimed to investigate the relationship between the chemical composition and antioxidant capacity of geopropolis extracts through the analysis of spectroscopic parameters and digital images. To accomplish this, statistical models were built in order to estimate, in a quick and simple way, quality indexes for a geopropolis. Firstly, spectrophotometric methods of reference were performed; the levels of flavonoids in geopropolis extracts were determined by complexation with $AlCl_3$, while the total antioxidant capacity was determined by DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine) and FRAP (ferric reducing antioxidant power) methods. After that, NIR spectra and digital images of geopropolis extracts were taken and calibrated using PLS regression. The models generated showed appropriate figures of merit: R^2 (Root mean square error of calibration), RMSEC (root mean square error of calibration), RMSECV (root mean square error of cross validation) and RMSEP (root mean square error of prediction), to estimate the antioxidant activity and flavonoid content in geopropolis. Consequently, NIR spectra or digital images of geopropolis extracts altogether with good PLS models would allow to predict the flavonoid content and antioxidant capacity extracts of geopropolis with high accuracy.

Keywords: geopropolis; total flavonoids; antioxydant capacity; PLS; multivariate image analysis; NIR

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|------------------|---|
| ABTS | Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) |
| BHT | <i>Butylated hydroxytoluene</i> (hidroxitolueno butilado) |
| CCD | Cromatografia em camada delgada |
| CG-MS | Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| CLC | Cromatografia líquida em coluna |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picril-hidrazila |
| EEG | Extrato etanólico de geoprópolis |
| FRAP | <i>Ferric reduction antioxidant power</i> (poder antioxidante pelo método da redução do íon férrico) |
| I% | Inibição percentual da oxidação |
| IC ₅₀ | Concentração inibitória para 50% da população testada |
| ICP-OES | <i>Inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i> (espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente) |
| IV | Infravermelho |
| MIA | <i>Multivariate image analysis</i> (análise multivariada de imagens) |
| MLG | Modelo linear generalizado |
| MM | Massa molecular |
| MS | <i>Mass spectrometer</i> (espectrômetro de massas) |
| NIR | <i>Near infrared</i> (infravermelho próximo) |
| NIRS | <i>Near infrared spectroscopy</i> (espectroscopia na região do infravermelho próximo) |
| P. A. | Padrão analítico |
| PCA | <i>Principal component analysis</i> (análise de componentes principais) |
| PLS | <i>Partial least square</i> (regressão de mínimos quadrados parciais) |
| r ² | Coefficiente de correlação |
| R ² | Coefficiente de determinação |
| RGB | <i>Red, green and blue</i> (modelo de cores baseados em vermelho, verde e azul) |
| RMSEC | <i>Root mean square error of calibration</i> (raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração) |

| | |
|-----------|---|
| RMSECV | <i>Root mean square error of cross validation</i> (raiz quadrada do erro quadrático médio da validação cruzada) |
| RMSEP | <i>Root mean square error of prediction</i> (raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão) |
| SEC | <i>Standard error of calibration</i> (erro padrão de calibração) |
| SPIR | <i>Spectroscopie par proche infrarouge</i> (espectroscopia no infravermelho próximo) |
| TPTZ | 2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina |
| UPLC | <i>Ultra-high pressure liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de ultra-alta performance) |
| UV-Vis | Ultravioleta-visível |
| VCEAC | <i>Vitamin C equivalent antioxidant capacity</i> (capacidade antioxidante em vitamina C equivalente) |
| λ | Comprimento de onda |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Ocupação de espaços pelos meliponíneos | 4 |
| Figura 2 – Colmeia de abelhas “jataí” instalada como ornamentação em um jardim..... | 5 |
| Figura 3 – Processo da produção de própolis e geoprópolis | 8 |
| Figura 4 – Exemplo de formação de complexo entre um flavonoide e Al^{3+} | 13 |
| Figura 5 – Redução do DPPH | 19 |
| Figura 6 – Reação simplificada de oxidação do ácido ascórbico à dehidroascórbico pelo DPPH..... | 20 |
| Figura 7 – Redução do complexo $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ por um antioxidante doador de elétrons | 21 |
| Figura 8 – “Cubo” de cores RGB. | 23 |
| Figura 9 – Número de amostras de geoprópolis analisadas por espécie de abelha nativa . | 27 |
| Figura 10 – Cidades e estados de origem das geoprópolis adquiridas | 28 |
| Figura 11 – Metodologia para obtenção dos extratos etanólicos de geoprópolis..... | 29 |
| Figura 12 – Suporte utilizado para obtenção das fotografias dos EEGs | 32 |
| Figura 13 – Processamento das fotografias dos EEGs..... | 33 |
| Figura 14 – Curva analítica para quantificação de flavonoides totais dos EEGs..... | 36 |
| Figura 15 – Concentração de flavonoides totais | 37 |
| Figura 16 – Curva analítica para determinação do potencial antioxidante dos extratos de geoprópolis pelo método DPPH. | 40 |
| Figura 17 – Capacidade de inibição do radical estável DPPH, expressa em vitamina C equivalente..... | 41 |
| Figura 18 – Curva analítica para determinação da concentração do complexo $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ | 43 |
| Figura 19 – Capacidade antioxidante de geoprópolis expressa em μg de Fe^{2+}/g de geoprópolis | 44 |
| Figura 20 – Sobreposição de espectros NIR dos EEGs..... | 48 |
| Figura 21 – Modelos NIR-flavonoides..... | 51 |
| Figura 22 – Modelos NIR-DPPH | 52 |
| Figura 23 – Modelos NIR-FRAP | 53 |
| Figura 24 – Modelos imagem-flavonoides..... | 56 |
| Figura 25 – Modelos imagem-DPPH | 57 |
| Figura 26 – Modelos imagem-FRAP | 59 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Testes de efeitos do modelo: teores de flavonoides totais..... | 38 |
| Tabela 2 – Testes de efeitos de modelo: capacidade antioxidante pelo método DPPH. | 42 |
| Tabela 3 – Testes de efeitos do modelo: capacidade antioxidante pelo método FRAP. | 45 |
| Tabela 4 – Parâmetros de correlação do modelo NIR-Flavonoides. | 50 |
| Tabela 6 – Parâmetros de correlação do modelo NIR-DPPH..... | 51 |
| Tabela 6 – Parâmetros de correlação do modelo NIR-FRAP..... | 53 |
| Tabela 7 – Parâmetros de correlação do modelo MIA-Flavonoides. | 55 |
| Tabela 8 – Parâmetros de correlação do modelo MIA-DPPH..... | 57 |
| Tabela 9 – Parâmetros de correlação do modelo MIA-FRAP..... | 58 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. OBJETIVOS..... | 3 |
| 2.1. Objetivo Geral..... | 3 |
| 2.2. Objetivos Específicos | 3 |
| 3. REFERÊNCIAL TEÓRICO..... | 4 |
| 3.1 As abelhas sem ferrão | 4 |
| 3.1.1 Meliponicultura no Brasil | 5 |
| 3.2 Própolis e geoprópolis | 7 |
| 3.3 Composição química da geoprópolis | 9 |
| 3.4 Atividades farmacológicas de geoprópolis | 14 |
| 3.4.1 Capacidade antioxidante | 17 |
| 3.4.1.1 Determinação <i>in vitro</i> das capacidades antioxidantes da geoprópolis..... | 19 |
| 3.5 Análises espectrais..... | 21 |
| 3.6 Quimiometria | 24 |
| 3.6.1 Regressão por mínimos quadrados parciais – PLS | 24 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 27 |
| 4.1 Amostras de geoprópolis..... | 27 |
| 4.2 Obtenção dos extratos etanólicos de geoprópolis (EEGs) | 28 |
| 4.3 Determinação dos teobres de flavonoides totais em EEGs..... | 29 |
| 4.4 Determinação da capacidade antioxidante dos EEGs através do método da inibição do radical estável DPPH | 30 |
| 4.5 Determinação da capacidade antioxidante dos EEGs pelo método de redução de ferro (FRAP)..... | 31 |
| 4.6 Obtenção dos espectros dos EEGs na região do infravermelho próximo | 32 |
| 4.7 Obtenção das imagens digitais dos EEGs..... | 32 |
| 4.7.1 Processamento das fotografias | 33 |
| 4.8 Análises Estatísticas..... | 34 |
| 4.8.1 Análises dos dados de referência | 34 |
| 4.8.2 Análise de correlação de Pearson | 34 |
| 4.8.3 Análise por modelos lineares generalizados (MLG) | 34 |
| 4.8.4 Análises de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) | 34 |

| | |
|--|----|
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 36 |
| 5.1 Teores de flavonoides totais em EEGs | 36 |
| 5.2 Capacidade antioxidante dos EEGs pelo método DPPH | 39 |
| 5.3 Capacidade antioxidante dos EEGs pelo método FRAP | 43 |
| 5.4 Correlações entre os teores de flavonoides e capacidade antioxidante de geoprópolis de abelhas sem ferrão..... | 46 |
| 5.5 Espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) para os EEGs..... | 48 |
| 5.6 Desenvolvimento de modelos de calibração e validação..... | 49 |
| 5.6.1 Desenvolvimento de modelos de regressão por PLS para NIR | 50 |
| 5.6.2 MIA dos EEGs aplicada na regressão PLS | 55 |
| 5.6.3 Considerações sobre os modelos construídos | 59 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 60 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 61 |
| ANEXOS..... | 76 |
| Anexo 1 | 76 |
| Anexo 2..... | 78 |
| Anexo 3..... | 80 |
| Anexo 4..... | 82 |

1. INTRODUÇÃO

A própolis é um produto natural apícola, assim como mel, geleia real, cera e pólen de abelha. É um material resinoso e gomoso, com fortes propriedades adesivas, possui cor e odor característicos. As abelhas empregam a própolis na construção, assepsia e calafetação dos ambientes ocupados pela colônia; ela também é aplicada no selamento de fendas e rachaduras, na regulação térmica do ambiente e na suavização das paredes internas da colmeia (Marcucci, 1996). As abelhas produzem a própolis a partir de diversas substâncias de origem vegetal, tais como resinas, seivas e óleos essenciais (Sforcin, 2007).

As espécies de abelhas nativas, popularmente conhecidas como “abelhas sem ferrão”, produzem um material conhecido como geoprópolis, assim denominado porque, para a produção desse material, as abelhas sem ferrão acrescentam partes de terra e/ou barro juntamente aos materiais resinosos e cerosos que normalmente compõem a própolis (Cunha *et al.*, 2009). Mesmo não sendo sua principal componente, a terra presente na geoprópolis é a sua característica diferencial em comparação à própolis ordinária (Sforcin *et al.*, 2017).

O uso de própolis e geoprópolis é amplamente difundido na medicina popular de muitos países (Cardozo, *et al.*, 2015), uma vez que estes produtos naturais apresentam efeitos farmacológicos comprovadamente significativos, dentre os quais podem ser citados: atividade antimicrobiana (Campos *et al.*, 2015; Libério *et al.*, 2011), efeitos anti-inflamatórios (Campos *et al.*, 2015; Franchin *et al.*, 2013; Machado, 2008), atividade antifúngica (Kujumgiev *et al.*, 1999), efeito antioxidante (De Souza, *et al.*, 2013; Sawaya *et al.*, 2009), ação antitumoral (Assunção, 2011; Campos *et al.*, 2015; Choudhari *et al.*, 2013; da Cunha *et al.*, 2016; Umthong *et al.*, 2011) e atividade gastroprotetora (Ribeiro-Junior *et al.*, 2015). Os efeitos farmacológicos da geoprópolis têm atraído o interesse de diversos pesquisadores, especialmente daqueles que estão à procura de novos fármacos antibacterianos (Sforcin, 2017), logo que a resistência de muitos patógenos aos medicamentos tradicionais vem aumentando (Sheldon, 2003).

No Brasil encontram-se mais de 400 espécies de abelhas nativas sem ferrão, produtoras de mel, própolis e geoprópolis (Dutra *et al.*, 2008). Estudos científicos acerca da composição química e da atividade farmacológica de geoprópolis ainda são escassos, bem como, também não existe uma regulamentação que especifique os parâmetros de qualidade para esse material. Por conseguinte, é importante identificar e padronizar as principais características desses produtos naturais, principalmente no que tange à prospecção de sua composição química e seu potencial farmacológico (Cunha *et al.*, 2009).

A dificuldade de padronização de extratos de própolis e geoprópolis é um dos principais empecilhos para o uso farmacológico rotineiro desse produto. Ainda, o seu controle de qualidade requer a determinação dos teores dos principais compostos bioativos como flavonóides, ácidos fenólicos, terpenos, etc, bem como, a expressão de sua atividade antimicrobiana e antioxidante. Essas determinações envolvem o uso de protocolos analíticos multietapas que implicam em alto consumo de reagentes, solventes orgânicos, tempos longos de análise e exposição do analista. No presente estudo nos propoemos investigar a aplicabilidade de modelos estatísticos para estimar o teor de flavonoides e a capacidade antioxidante de extratos de própolis a partir de imagens digitais e/ou espectros no infravermelho próximo. Isto, com o intuito de proporcionar meios diretos, simples, e incorporados aos princípios da química verde, para o controle de qualidade de extratos de geoprópolis.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar a relação entre a composição química e atividades farmacológicas de geoprópolis produzidas por diferentes espécies de abelhas nativas com parâmetros espectroscópicos e físico químicos, com a intenção de futuramente formular modelos capazes de estimar índices de qualidade para o material.

2.2. Objetivos Específicos

1. Investigar a composição química de geoprópolis através da determinação do teor de flavonoides totais;
2. Determinar a capacidade antioxidante de geoprópolis através dos métodos de redução do íon férrico (FRAP) e redução do radical estável DPPH;
3. Realizar um estudo comparativo de extratos de geoprópolis utilizando ferramentas de análise multivariada: regressão PLS e análise multivariada de imagens e de espectros de infravermelho;
4. Construir modelos de regressão por mínimos quadrados parciais capazes de associar a composição química e a atividade biológica, com dados obtidos a partir da análise multivariada das imagens dos extratos de geoprópolis;
5. Construir modelos de regressão por mínimos quadrados parciais capazes de associar a composição química e a capacidade antioxidante, com dados obtidos através de espectros vibracionais no infravermelho de extratos de geoprópolis;
6. Averiguar o poder preditivo dos modelos gerados em estimar a composição química e a atividade biológica de novas amostras de geoprópolis.

3. REFERÊNCIAL TEÓRICO

3.1 As abelhas sem ferrão

Os meliponíneos, conhecidos popularmente como abelhas sem ferrão, fazem parte da subfamília *Meliponinae*, pertencente à família *Apidae*. A subfamília *Meliponinae* divide-se nas tribos *Trigonini* e *Meliponini*. Estas tribos abrangem 52 gêneros e mais de 600 espécies de abelhas sem ferrão (Freitas, 2003). São abelhas que possuem caracteristicamente o ferrão atrofiado e não funcional (Camargo *et al.*, 2017), o que motiva o seu nome popular (Freitas, 2003). Os meliponíneos encontram-se amplamente distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais da Terra; sua ocorrência é descrita na África, Austrália, Sudeste Asiático e nas Américas Central e do Sul (Roubik, 1992). No Brasil são conhecidas mais de 400 espécies de abelhas nativas sem ferrão (Cunha *et al.*, 2009), distribuídas por todo o país, existindo algumas diferenças entre as espécies de cada região (Freitas, 2003). Essas espécies são responsáveis por polinizar a maioria da flora nativa do Brasil (Dutra *et al.*, 2008).

Os meliponíneos geralmente constroem suas colmeias em cavidades nas árvores (Figura 1a), porém algumas espécies também nidificam em outros locais como galhos de árvore, fendas em rochas e buracos no chão. Os meliponíneos também podem ocupar espaços em estruturas criadas pelo homem (Figura 1b), como frestas e espaços vazios em paredes e assoalhos de madeira ou tijolos (Freitas, 2003).

Figura 1 – Ocupação de espaços pelos meliponíneos: (1a) abelhas popularmente conhecidas como “jataí” ocupam uma cavidade em uma árvore, área rural de Candói – PR; (1b) a mesma espécie de abelhas ocupa um cano plástico fixado em um muro de pedras, área urbana de Guarapuava – PR.



Fonte: (1a) O autor, 2019; (1b) Torres, 2018.

3.1.1 Meliponicultura no Brasil

O conjunto das técnicas empregadas para a criação e reprodução das abelhas da tribo *Meliponini* (abelhas sem ferrão) é chamado de meliponicultura. O local onde estas abelhas são criadas é chamado de meliponário (Santos, 2010). A criação de abelhas nativas sem ferrão e a utilização dos seus produtos (mel, cera, pólen, própolis e geoprópolis) é uma herança dos povos indígenas, que os utilizavam para diversas finalidades (dos Santos e Antonini, 2008). Populações indígenas e rurais, principalmente das regiões Norte e Nordeste do Brasil, praticam a meliponicultura há séculos (Carvalho *et al.*, 2014), difundindo e propagando por gerações o uso medicinal dos produtos elaborados pelas abelhas nativas. O uso medicinal, dos produtos apícolas dos meliponíneos, faz parte da cultura popular do país até a atualidade (dos Santos e Antonini, 2008).

A meliponicultura também ocupa mão de obra familiar, gerando renda para os pequenos produtores rurais, com a venda do mel e outros produtos apícolas (Holanda *et al.*, 2012). As abelhas sem ferrão também são criadas como forma de *hobby* e ornamentação (Figura 2), ou mesmo para fins educacionais, em áreas urbanas ou rurais, sendo que esta prática ajuda na preservação de muitas espécies (Cortopassi-Laurino *et al.*, 2006).

Figura 2 – Colmeia de abelhas “jataí” instalada como ornamentação em um jardim, região rural de Candói – PR.



Fonte: O autor, 2019.

Uma das vantagens da criação das abelhas sem ferrão é justamente a ausência de um ferrão funcional, logo, o manejo destas espécies não apresenta riscos de acidentes com enxames, o que facilita a manipulação e a extração de produtos como mel, própolis e geoprópolis (Carvalho *et al.*, 2014). Carvalho *et al.* (2014) ressaltam que a meliponicultura ajuda na conservação e preservação das espécies de abelhas nativas sem ferrão, que por sua vez, contribuem em muito com a polinização de plantações (agricultura) e de espécies vegetais nativas (redução de danos ambientais) (Carvalho *et al.*, 2014). O Brasil possui um vasto território, que apresenta regiões geográficas distintas, com fauna e flora variadas, além de climas diferentes; estes fatores figuram o Brasil como um país com elevado potencial apícola (Marchini, 2004), propiciando aos apicultores colheitas de mel em praticamente qualquer período do ano (Lopes *et al.*, 2016).

Durante o período colonial, o Brasil exportava o mel de abelhas nativas sem ferrão para a Europa, onde era utilizado como adoçante e tinha alto valor comercial. Esta prática começou a perder força gradativamente a partir do início do ciclo do açúcar no Brasil, entre meados dos séculos XVI e XVIII, mas hoje volta como uma tendência de consumo, por conta do sabor único do mel de abelhas nativas, que atrai muitos apreciadores (Palumbo, 2015). O mel das abelhas nativas sem ferrão possui um sabor diferenciado, mais ácido que o mel de *Apis mellifera*; também apresenta coloração normalmente mais clara (Alves *et al.*, 2005). Os mercados mundiais avaliam o mel por sua cor, sendo que os méis de tonalidades mais claras alcançam preços mais elevados (de Carvalho *et al.*, 2003), por conseguinte, a predominância de cores claras nos méis de meliponíneos, resulta num produto com alto potencial de aceitação no mercado internacional (Pereira *et al.*, 2017).

A extração do mel de abelhas nativas sem ferrão, deve ocorrer nas épocas adequadas para cada espécie e também deve seguir formas apropriadas de manejo e higiene. A garantia de um produto de boa qualidade, traz preços vantajosos para os produtores (Oliveira *et al.*, 2013). Em média, no Brasil, uma colônia de meliponíneos produz de 1 a 10 Kg de mel, por ano, dependendo de sua localização geográfica, delimitação climática e espécie. Uma colônia de *A. mellifera*, no mesmo período, produz 15 Kg de mel, em média, por ano. A diferença na produtividade entre os tipos de abelha é compensada pelo valor de mercado do mel produzido pelas abelhas sem ferrão: enquanto o mel de *A. mellifera* é comercializado, pelos produtores, por um preço de até R\$ 10,00/kg, o mel dos meliponíneos pode alcançar até R\$ 120,00/Kg, dependendo da espécie de abelha produtora e da demanda de mercado (Pereira *et al.*, 2017). A criação de abelhas nativas sem ferrão tem efeito de diversificação

produtiva para famílias de baixa renda, por conta da produção e venda de mel e outros produtos apícolas, tais como geoprópolis, cera e pólen.

Adicionalmente, a meliponicultura também proporciona incrementos à segurança alimentar de famílias de baixa renda, logo que, o pólen de abelha nativa (saborá) possui alto valor proteico (cerca de 20% dos valores diários) e é tradicionalmente utilizado como um importante complemento alimentar (Oliveira *et al.*, 2013). Na região amazônica, o pólen de abelhas sem ferrão é considerado um recurso importante. O consumo do polén é uma opção significativa, logo que nessa região, a oferta de alimentos ricos em proteínas é altamente sazonal, com as principais fontes permanentes sendo o peixe e a mandioca (Murrieta *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2013).

A própolis e a geoprópolis são outros produtos importantes produzidos pelas abelhas nativas sem ferrão. Embora existam poucos estudos científicos, sobre as propriedades medicinais da geoprópolis e da própolis de abelhas nativas, o uso dessas substâncias é bastante difundido na medicina popular brasileira (Cardozo *et al.*, 2015). Esses materiais são utilizados pela medicina popular para o tratamento de diversas doenças, tais como: inflamações, tosse, bronquite, fadiga, indisposição, gastrite, infecções e doenças de pele (Kerr, 1987). O Brasil é um grande exportador de própolis, existindo um espaço amplo e perene para venda de própolis brasileiras, principalmente em países asiáticos. No mercado mundial, o Brasil ocupa a terceira posição em produção de própolis, com aproximadamente 150 toneladas por ano, com dois terços desse total sendo destinados à exportação. A nação que mais importa própolis brasileira é o Japão. A própolis brasileira supre cerca de 92% da própolis *in natura* consumida naquele país, onde o extrato alcóolico da substância é vendido em frascos de 100 mL por até US\$ 110, segundo dados do *Japan Trade Organization* (Sebrae, 2017).

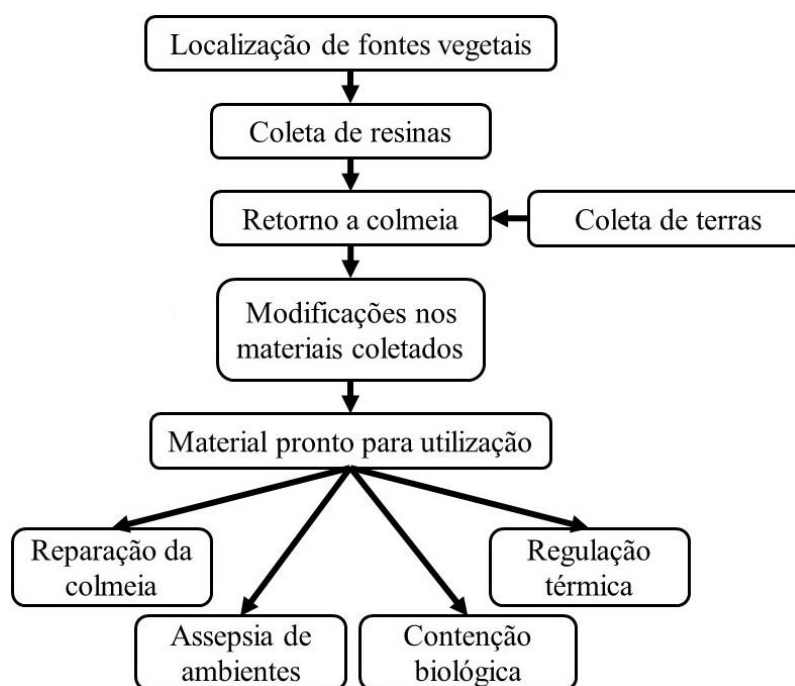
3.2 Própolis e geoprópolis

A própolis e a geoprópolis, são materiais resinosos e gomosos, sólidos a temperatura ambiente, com aspecto pegajoso. As abelhas produzem a própolis a partir de resinas vegetais, que vem de diferentes partes das plantas, como brotos, flores e exsudatos de seiva. Após a coleta, as resinas são levadas até a colmeia, onde serão misturadas inconscientemente com ceras, pólen de abelha e enzimas presentes na saliva das operárias (Bankova, 2000; Burdock, 1998). Para a produção de geoprópolis, os meliponíneos adicionam terra, lama ou argila à mistura (Araújo *et al.*, 2016; da Cunha, *et al.*, 2016). As abelhas utilizam a própolis e a geoprópolis para diversas funções, principalmente na construção e manutenção da colmeia.

O material é utilizado para vedar frestas e rachaduras, no reparo e fortalecimento de favos (Ghisalberti, 1979) e para tornar a entrada da colmeia mais resistente a ataques de inimigos naturais e intempéries climáticas (Freitas, 2003). Própolis é utilizada por todas as espécies de abelhas na construção de ambientes assépticos, principalmente aqueles utilizados pela rainha para a postura dos ovos (Marcucci, 1996). A própolis também é utilizada pelas abelhas como barreira de contenção biológica, evitando infecções e ataques de fungos na colmeia. As abelhas matam insetos invasores que ocasionalmente adentrem em sua colmeia, depois utilizam a própolis para cobrir e embalsamar as carcaças que não conseguiram transportar para fora, deixando-as no fundo ou em uma das paredes da colmeia (Ghisalberti, 1979).

Os meliponíneos são conhecidos por produzirem além da própolis, também a geoprópolis. Além dos materiais resinosos e da cera contida na própolis, a geoprópolis apresenta certa quantidade de terra em sua composição (Cunha *et al.*, 2009). A Figura 3 apresenta um esquema simplificado de como se dá a produção e a utilização de própolis e/ou geoprópolis por uma colônia de abelhas

Figura 3 – Processo da produção de própolis e geoprópolis.



Fonte: O autor, 2018.

A terra contida na geoprópolis é a sua característica diferencial, muito embora não seja o seu principal constituinte (Sforcin *et al.*, 2017). Os meliponíneos constroem seu ninho utilizando geoprópolis e ceras. Os materiais são utilizados para produzir as células de cria e os potes para armazenamento de mel e pólen de abelha (Freitas, 2003).

A composição química e as características físicas da própolis e da geoprópolis, dependem sensivelmente da flora disponível para a coleta de resinas (Marcucci, 1996; Silva *et al.*, 2013). O aspecto físico da própolis normalmente apresenta cores variadas, geralmente em tons de verde, vermelho e marrom escuro. A própolis pode exalar aromas característicos, dependendo de suas origens botânicas, sendo que algumas variedades podem até não apresentar odor algum (Cardozo *et al.*, 2015; Marcucci, 1996; Sforcin, 2007). O termo “própolis” tem origem no grego, com a união dos étimos *pro* (em defesa de, em favor de) e *polis* (cidade, comunidade), denotando que esta substância tem grande importância para uma colônia de abelhas (Ghisalberti, 1979).

Por suas propriedades farmacológicas, o interesse mundial na própolis vem aumentando. A própolis de *Apis mellifera* (abelha comum) brasileira está entre aquelas com maior valor comercial no mercado mundial. No Brasil ainda não existe uma legislação específica que regule os produtos originados da meliponicultura (Villas-Bôas, 2018). Em tese, poder-se-ia utilizar os parâmetros já estabelecidos para a própolis de *A. mellifera* pela legislação brasileira (Brasil, 2001), porém a diferença entre as espécies é considerável, assim como a composição dos seus produtos, o que os torna difícil de serem comparados (Sforcin, 2017).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) regulamenta, em âmbito federal, os produtos produzidos pelas abelhas, haja vista que eles têm origem animal. O principal documento sobre este assunto é o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), que vem sendo atualizado desde sua ratificação em 1952, sendo que a sua última modificação foi feita em 19 de março de 2017, pela lei Nº 9.013. A última alteração trouxe um avanço: finalmente dedicou-se atenção à meliponicultura. Agora constam separados os produtos das abelhas do gênero *Apis* (mel, pólen apícola, geleia real, própolis, cera de abelhas e apitoxina) e os produtos das abelhas nativas sem ferrão (mel de abelhas sem ferrão, pólen de abelhas sem ferrão e própolis de abelhas sem ferrão). Infelizmente o cerume e geoprópolis ainda não foram contemplados pela legislação. Apesar do avanço, o decreto apenas define os produtos que existem, e estabelece parâmetros básicos acerca da produção (Vilas-Boas, 2018).

3.3 Composição química da geoprópolis

A composição química da geoprópolis é variada e sensivelmente dependente da flora onde a colmeia está alojada. Amostras de própolis produzidas em diferentes países e regiões têm composições distintas, por consequência da diversidade botânica de cada local

(Bankova, 2000). Na América do Norte, Europa e oeste da Ásia, a fonte predominante de resinas para a produção de própolis é o exsudato do botão de álamo (*Populus sp.*). Na América do Sul as espécies vegetais do gênero *Populus* não existem nativamente, no entanto há uma enorme diversidade botânica, que é utilizada pelas abelhas para a coleta de resinas (Park *et al.*, 2002; Simone-Finstrom e Spivak, 2010). Todavia, em países como o Brasil, de clima predominantemente tropical e que possuem grande biodiversidade, existe um grande número de espécies vegetais disponíveis para a coleta de resinas, que servem para a produção de própolis. Em consequência, a própolis e a geoprópolis brasileira apresentam uma composição química altamente complexa, a depender da sua região de origem (Araújo *et al.*, 2015). Logo, a padronização e o controle de qualidade destes produtos apícolas se mostram tarefas difíceis, no entanto, extremamente necessárias para a efetivação na utilização destes materiais para fins terapêuticos (Bankova, 2005).

Estudos sobre a composição química da geoprópolis ainda são escassos na literatura (Cardozo *et al.*, 2015), entretanto, a geoprópolis produzida pelas abelhas sem ferrão é considerada uma fonte promissora de compostos biologicamente ativos. Geralmente a geoprópolis apresenta em sua composição química substâncias da classe dos ácidos fenólicos e terpenoides (Popova *et al.*, 2007). A composição química da própolis, e por consequência também a composição da geoprópolis, de abelhas nativas é normalmente muito complexa, com mais de 300 compostos de baixa massa molecular já identificados (Maraschin *et al.*, 2017). Em amostras de própolis e geoprópolis já foram encontrados fenóis, flavonoides, aminoácidos, ácidos aromáticos, ácidos graxos e vitaminas (A, B1, B2, B6, C e PP), além de minerais como Si, Mn, Cu, Ca, Al, V, Ni, Zn e Cr. Entre os componentes solúveis da própolis estão os materiais cerosos (30% em média), tais como bálsamos, óleos essenciais e derivados fenólicos (Maraschin *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2002).

Bankova *et al.* (1998) analisaram a composição química das geoprópolis produzidas por três espécies de abelhas nativas sem ferrão: *Melipona compressipes*, *Melipona quadrifasciata anthidioides* e *Tetragona clavipes*. Os autores utilizaram técnicas cromatográficas (CG-MS) e identificaram mais de 50 compostos diferentes, sendo a maioria deles terpenoides e ácidos fenólicos.

Kujumgiev *et al.* (1999) analisaram extratos alcoólicos de geoprópolis brasileiras produzidas no Estado do Paraná, de duas espécies diferentes de abelhas sem ferrão: *Melipona compressipes* e *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Os autores utilizaram os extratos etanólicos de geoprópolis, empregando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). Os autores observaram, na composição das geoprópolis,

a presença de ácidos diterpênicos (3%), ácidos aromáticos (5%), glico-flavonoides (10%) e triterpenos (10%).

Dutra *et al.* (2008) analisaram a composição do extrato hidroalcoólico de geoprópolis de *Melipona fasciculata*, produzida por meliponários instalados na região da Baixada maranhense, no Estado do Maranhão. O objetivo do estudo era o de caracterizar o material, do ponto de vista farmacognóstico, utilizando técnicas cromatográficas de bancada. Dutra *et al.* (2008) empregaram a cromatografia em camada delgada (CCD), para a análise comparativa dos extratos de geoprópolis. Os autores observaram a predominância de compostos fenólicos na composição química da geoprópolis de *M. fasciculata*. Os autores também constataram a presença de triterpenos e saponinas, além da ausência de alcaloides. Os teores de flavonoides totais, dos extratos etanólicos das amostras testadas, quantificados através do método espectrofotométrico, variaram entre 0,17 a 2,6%. Segundo Dutra *et al.* (2008), os resultados apresentados pela geoprópolis da *M. fasciculata* apresentam, comparativamente, similaridades para com os resultados normalmente observados para a própolis de *A. mellifera*. Para a maioria das amostras, os valores encontrados estavam acima do mínimo exigido pela legislação brasileira específica para própolis de *A. mellifera*.

Souza *et al.* (2013) realizaram um estudo exploratório sobre a geoprópolis produzida pela espécie *Melipona subnitida*, na região do semiárido do Estado da Paraíba. Os autores utilizaram técnicas de cromatografia líquida em coluna (CLC), para isolar do extrato metanólico da geoprópolis da *M. subnitida* dois fenilpropanoides: 6-*O*-cinamoil-1-*O*-*p*-cumaroil- β -D-glucopiranosose e 6-*O*-*p*-cumaroil-D-galactopiranosose. Além disso, os autores também caracterizaram outros sete flavonoides: 7,4'-di-*O*-metil-aromadendrina, 3-*O*-metil-quercetina, 4'-*O*-metil-caempferol, 5-*O*-metil-aromadendrina e 5-*O*-metil-caempferol, 7-*O*-metil-aromadendrina e 7-*O*-metil-naringenina. Os compostos foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e suas estruturas foram posteriormente confirmadas a partir de dados espectrais de IV, LC-ESI-MS e RMN.

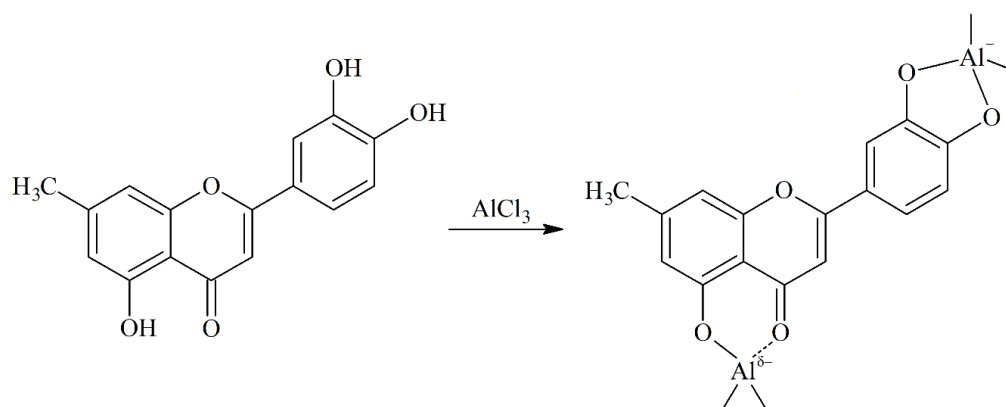
Araújo *et al.* (2015) analisaram a composição química de geoprópolis produzida por *M. fasciculata*, criadas no Maranhão, aplicando técnicas cromatográficas aos extratos etanólicos. O estudo revelou a presença de compostos das mesmas classes químicas encontradas por Dutra *et al.* (2008) e Souza *et al.* (2013), porém, Araújo *et al.* (2015) também identificaram: polióis (álcoois de açúcares) (5%); alquilresorcínóis (5,9%); triterpenos (15,9%); ácido anacárdico (8,3%); carboidratos e seus derivados (19,8%). Os autores também identificaram, em pequenas quantidades, na mesma geoprópolis: monossacarídeos (hexose, pentose); dissacarídeos; poliálcoois (xilitol, glucitol, inositol, glicerina); os ácidos

glucurônico, salicílico e metilmalônico; lupeol, α -amirina e β -amirina; resorcinóis; cetonas triterpênicas.

Cardozo *et al.* (2015) estudaram a variabilidade química de geoprópolis de três espécies de abelhas nativas: *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* (Mandaçaia), *Melipona marginata* (Mandurí) e *Tetragonisca angustula* (Jataí), doadas por meliponicultores de Prudentópolis, no Estado do Paraná. As amostras foram coletadas em diferentes épocas do ano. Os pesquisadores utilizaram cromatografia líquida de ultra alta performance (UPLC) acoplada a espectrometria de massas (MS) para identificação de componentes químicos dos extratos. A identificação de compostos baseou-se na comparação com padrões autênticos, análise de dados de ESI(-)-MS/MS em comparação com dados já reportados na literatura. Segundo Cardozo *et al.* (2015), todas as amostras de geoprópolis analisadas, independentemente da época em que foi feita a sua coleta e a espécie da abelha produtora, apresentaram como principais constituintes ácidos terpênicos (agatálico, cuprêssico e isocuprêssico) e flavonoides (canferida e a *di*-hidrocanferida). Também foram identificados outros compostos de concentração sazonal, como os ácidos cafeico e cumárico, vanilina e ácidos terpênicos.

Silva *et al.* (2016) avaliaram a composição química e o potencial terapêutico do extrato hidroalcoólico da geoprópolis de *Plebeia flavocincta*, produzida no semiárido do Estado do Rio Grande do Norte. Os autores determinaram os teores de flavonoides totais nos extratos através do método espectrofotométrico descrito por Woisky e Salatino (1998). O método espectrofotométrico está entre as metodologias mais utilizadas para quantificar os teores de flavonoides totais, em extratos de própolis e geoprópolis. Esta metodologia se baseia na propriedade que os flavonoides apresentam de formarem quelatos estáveis com o cátion Al^{3+} , em meio alcoólico (Figura 4). Estes complexos apresentam máximos de absorvância deslocados para comprimentos de onda na região do visível (Wollenweber e Jay, 1988), o que permite quantificar os teores de flavonoides por meio de técnicas espectrofotométricas, sem interferências causadas por outras substâncias fenólicas (Marcucci *et al.*, 1998) (Figura 4).

Figura 4 – Exemplo de formação de complexo entre um flavonoide e Al^{3+} .



Fonte: O autor, adaptado de Mabry *et al.*, 1970.

Por outro lado, as propriedades físico-químicas e a composição química da geoprópolis tem despertado recentemente o interesse de pesquisadores pela importância que o material vem adquirindo como indicador ambiental (Bonsucesso *et al.*, 2018). A determinação das concentrações de metais potencialmente tóxicos em produtos apícolas, apresenta-se como uma ferramenta eficiente para monitoramento ambiental (Martin *et al.*, 2016), especialmente com o crescimento da produção de produtos apícolas em áreas urbanas (Perugini *et al.*, 2011).

Bonsucesso *et al.* (2018) determinaram as concentrações de metais Cd, Cr, Cu, Fe, Ni e Pb em geoprópolis de *M. scutellaris*, produzidas na Região Metropolitana de Salvador, Estado da Bahia. Para realizar o estudo, foram coletadas amostras de geoprópolis e amostras de solo das proximidades. Os autores submeteram as amostras a procedimentos de digestão ácida, para na sequência quantificar os teores de metais, por espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES). Bonsucesso *et al.* (2018) destacaram os teores de Cr e Fe como sendo os mais importantes, tendo em vista que a geoprópolis é composta por partes de terra. Os autores observaram que os solos ao redor dos meliponários estavam ligeiramente poluídos por Cu, Cr, Ni, Pb e Zn, porém, a geoprópolis apresentou concentrações menores do que as esperadas para estes metais no solo. Houve uma mudança no tamanho das partículas de terra presentes na geoprópolis, sendo mais arenosas do que aquelas do solo circundante ao meliponário; dessa forma os autores concluíram que as abelhas excluem terras com maiores teores de metais pesados. Entretanto, os autores também constataram que, as proporções entre os metais litogênicos (naturalmente presentes no solo) e os antropogênicos (advindos de poluição) indicam uma origem externa para os metais Cu e Ni, sendo seus níveis 20% maiores do que o naturalmente esperado. Segundo os autores, a geoprópolis é indicador eficiente da poluição do solo, mesmo que os

poluentes se apresentem em pequenas quantidades. Também, a localização de uma colmeia pode conferir concentrações distintas de metais diferentes à geoprópolis.

3.4 Atividades farmacológicas de geoprópolis

A própolis tem sido utilizada pelo homem desde a antiguidade para diversas finalidades medicinais e terapêuticas. Devido às propriedades antimicrobianas que retardam o processo de putrefação, os antigos egípcios utilizavam a própolis no complexo processo de embalsamamento de múmias. A própolis também era reconhecida pelos médicos da Grécia e da Roma antigas, tais como Galeno, Plínio, Dioscórides e Aristóteles. A própolis também foi utilizada por outros povos como os incas e os árabes, que a utilizavam como agente antisséptico e antipirético (Castaldo e Capasso, 2002).

O aumento da resistência das bactérias às drogas antibióticas tradicionais e os efeitos colaterais observados após o uso destas (Loureiro *et al.*, 2016), tem chamado a atenção de muitos pesquisadores para o estudo de produtos naturais com atividade antimicrobiana, principalmente de materiais como a própolis e a geoprópolis (Sforcin *et al.*, 2017).

As atividades biológicas da própolis e/ou geoprópolis dependem diretamente de sua composição química, que por sua vez está relacionada às substâncias extraídas das plantas pelas abelhas. Por possuírem hábitos alimentares generalistas, as abelhas sem ferrão produzem própolis e geoprópolis com grande variação em sua composição. Mesmo entre as amostras de uma mesma região podem haver diferenças significativas entre suas atividades farmacológicas (Sforcin *et al.*, 2017).

Duailibe *et al.* (2007), em estudo realizado *in vivo*, demonstraram que os extratos etanólicos da geoprópolis de *M. compressipes* apresentam resultados com grande potencial para manutenção e tratamento da saúde bucal. Os autores analisaram a saliva de voluntários, que utilizaram o extrato de geoprópolis de *M. compressipes*, como enxaguante bucal por uma semana e, por fim, constataram que houve a inibição total do crescimento da bactéria *S. mutans*. Esta bactéria é a principal causadora de caries dentárias e outras infecções bucais. Duailibe *et al.* (2007) propõem que o extrato de própolis de *Melipona compressipes* pode ser uma opção viável para o tratamento e prevenção de doenças bucais.

Libério *et al.* (2011), em estudo *in vivo* sobre a atividade antimicrobiana de geoprópolis, produzida pela espécie *M. fasciculata*, analisaram a ação inibitória sobre o crescimento de *S. mutans* e *Candida albicans*. Os autores avaliaram a ação de um gel a base de geoprópolis, aplicado por via tópica na cavidade oral de camundongos. O produto foi aplicado durante um minuto e depois removido, repetindo-se este mesmo processo por

quatro dias seguidos. Ao final do tratamento, o sangue dos camundongos foi coletado, para análise das citocinas ligadas a processos inflamatórios IFN- γ , IL-4, TNF- α e IL-10. O gel a base de geoprópolis de *M. fasciculata* levou a um aumento significativo na produção das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10, enquanto a produção das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α manteve-se inalterada, quando foi comparada aos grupos controle. Os autores concluem que, o gel a base de geoprópolis, apresenta atividade anti-inflamatória significativa, com potencial a ser explorado para uso em tratamentos anti-inflamatórios. Adicionalmente, a administração de gel contendo geoprópolis não provocou nenhum efeito tóxico nos camundongos. Segundo Libério *et al.* (2011), a geoprópolis de *M. fasciculata* apresenta capacidade de controle e/ou prevenção de doenças da cavidade oral, especialmente aquelas agravadas por cáries ou candidíase.

Campos *et al.* (2015) testaram a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis de *Tetragonisca fiebrigi*. Os autores testaram o extrato em bactérias gram-positivas *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, nas gram-negativas *Klebsiella pneumonia*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, e também nos fungos *Candida glabrata*, *C. albicans*, que foram isolados a partir de diferentes fluidos biológicos e cepas referência. Os autores observaram que extrato foi ativo contra todos os micro-organismos. O extrato também apresentou capacidade antioxidante por eliminação de radicais livres, inibindo hemólise e peroxidação lipídica em eritrócitos humanos incubados com um agente oxidante e inibição da hemólise. Campos *et al.* (2015) também investigaram o potencial anti-inflamatório do extrato de própolis de *T. fiebrigi*, por meio de testes com inibição da enzima hialuronidase. A atividade citotóxica foi dependente da concentração em células K562, com predominância de morte por necrose. Em conjunto, esses resultados mostram que a própolis de *T. fiebrigi* tem importantes atividades terapêuticas, o que sugere sua potencial aplicação na indústria farmacêutica, bem como em alimentos saudáveis, bebidas e suplementos nutricionais (Campos, *et al.*, 2015).

Silva *et al.* (2016) analisaram os efeitos farmacológicos do extrato de geoprópolis da abelha sem ferrão *Plebeia flavocincta*, produzida no semi-árido do Rio Grande do Norte, e a consideraram eficaz sob o ponto de vista da atividade antibacteriana. Foram testados extratos hidroalcoólicos nas cepas das bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, utilizado o método de difusão em ágar Mueller Hinton (AMH). Os extratos promoveram a formação de halos de inibição para todas as cepas testadas, demonstrando o potencial antibacteriano e inibitório da geoprópolis de *P. flavocincta*.

A ação cicatrizante da geoprópolis de *P. flavocincta* também foi testada, *in vivo*, por Silva *et al.* (2016), e foi constatada uma influência positiva na cicatrização de feridas cutâneas experimentais em ratos, que foram tratados utilizando-se um creme com 20% de geoprópolis, aplicado sobre feridas cutâneas dos animais. Um grupo controle foi utilizado, o qual não teve as feridas tratadas com o creme de geoprópolis. Os autores então observaram uma influência positiva na cicatrização das feridas utilizando o creme geoprópolis, logo que o processo inflamatório teve menor intensidade e o fechamento cutâneo foi mais rápido no grupo tratado do que o grupo controle.

Bartolomeu *et al.* (2016) investigaram o potencial antitumoral da combinação entre drogas comumente utilizadas contra o câncer (carboplatina, metotrexato e doxorubicina) e o extrato etanólico de geoprópolis de *M. fasciculata*. Os autores investigaram *in vivo* se a geoprópolis da *M. fasciculata* aumenta o efeito anticancerígeno dos medicamentos, contra as células do carcinoma epidermoide da laringe (HEp-2). As células foram tratadas apenas com geoprópolis e em combinação com cada droga. O crescimento celular, citotoxicidade e apoptose celular foram avaliadas utilizando ensaios de brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e citometria da liberação de fluxo do lactato de desidrogenase (LDH). Um ensaio de risco foi utilizado para analisar a migração celular e também foi empregada a microscopia de transmissão eletrônica, para observar as alterações morfológicas dos tumores. Segundo Bartolomeu *et al.* (2016), a geoprópolis influenciou positivamente na inibição da proliferação e migração de células cancerígenas. A combinação entre o extrato de geoprópolis de *M. fasciculata* e o medicamento antitumoral doxorubicina, levou a uma maior atividade citotóxica, levando à perda de integridade da membrana das células tumorais, induzindo a apoptose. Segundo os autores, estes dados indicam que a geoprópolis, em combinação com a doxorubicina, apresenta potencial para usos quimioterapêuticos, para o tratamento do câncer de laringe. Esta aplicação poderia contribuir para a prevenção ou diminuição de efeitos colaterais adversos, em pacientes que estejam em fase de tratamento, uma vez que as drogas utilizadas contra o câncer podem causar vários efeitos adversos e podem afetar diferentes órgãos como o cérebro, rins e fígado.

Da Cunha *et al.* (2016) investigaram o potencial anti-inflamatório do extrato alcoólico da geoprópolis da abelha sem ferrão *Melipona scutellaris*, uma espécie comumente encontrada no litoral nordestino. Os autores isolaram a *ent-nemorosona*, uma benzofenona com potencial anti-inflamatório, a partir dos extratos de geoprópolis, para depois ser aplicada em testes farmacológicos. Os autores observaram no decorrer de seus ensaios que o composto é capaz de inibir a migração de neutrófilos durante o processo inflamatório, sendo

que esta atividade migratória está diretamente ligada à inibição da liberação das citocinas TNF- α (Fator de Necrose Tumoral). As citocinas TNF- α são moléculas capazes de causar apoptose em células cancerígenas e em macrófagos por meio da supressão de fosforilação da proteína ERK $\frac{1}{2}$ (*Extracellular signal-regulated kinases*) e ativação do NF- κ B (*nuclear factor kappa B*). A geoprópolis de *M. mondury* pode ser utilizada como uma auxiliar (complemento) no tratamento contra inflamações, também apresentando resultados promissores até mesmo contra células tumorais, o que ainda carece de mais estudos. Santos *et al.* (2017) também estudaram a capacidade antibacteriana da geoprópolis de *M. mondury*, produzida no Estado da Bahia, e constataram a presença de ácidos fenólicos e flavonoides. Também foi observada grande capacidade de antioxidante, em termos de IC₅₀ (6,91 μ g/mL), em ensaios utilizando o radical estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH). Os autores verificaram que o extrato alcoólico da geoprópolis de *M. mondury* possui propriedades antibacterianas contra cepas das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Da Cunha *et al.* (2016) também observaram que os extratos alcoólicos, da geoprópolis de *M. scutellaris*, podem ser uma alternativa promissora na prevenção e tratamento de cáries, devido à sua capacidade de atuar sobre filmes de polissacarídeos (atividade anti-biofilme). Estes biofilmes são essenciais para a fixação de bactérias como a *Streptococcus mutans*, principal agente causadora de cáries. Como a geoprópolis de *M. scutellaris* apresenta os efeitos benéficos da *ent-nemorosona* para a saúde, os seus extratos poderiam ser utilizados como uma fonte auxiliar no tratamento de cáries e inflamações bucais, principalmente entre as populações carentes, uma vez que o material não possui custos elevados de produção e pode ser facilmente encontrado.

3.4.1 Capacidade antioxidante

O excesso de radicais livres no organismo pode provocar efeitos nocivos à saúde, como por exemplo, a peroxidação lipídica, um processo que está ligado a patogênese de diversas doenças tais como câncer, *diabetes mellitus*, aterosclerose e males degenerativos, além de provocar o envelhecimento precoce de órgãos e tecidos biológicos. (Nagai *et al.*, 2003). Os radicais livres são produzidos naturalmente pelos organismos vivos, principalmente durante processos de metabolismo celular aeróbio (Silva e Ferrari, 2011). Os radicais livres são definidos como sendo compostos orgânicos ou inorgânicos que contém, ao menos um elétron desemparelhado, e por esta razão apresentam elevada reatividade e instabilidade, com breve período de meia-vida (Ferreira e Matsubara, 1997).

Os antioxidantes são compostos que conseguem combater os danos oxidativos causados pelos radicais livres, estes compostos eliminam as reações que ocorrem pela ação dos radicais livres (Kumar, 2015). Esses agentes capazes de retardar os processos oxidativos (antioxidantes) podem ser produzidos naturalmente pelo organismo, mas também podem ser obtidos a partir dos alimentos. Os antioxidantes possuem uma importante função na proteção contra os danos provocados pelos radicais livres (Nagai *et al.*, 2003). Estudos apontam a presença de substâncias antioxidantes em produtos de origem apícola, relacionando esta propriedade principalmente à classe dos compostos fenólicos, destacando-se entre eles a classe dos flavonoides (Silva *et al.*, 2016). Nagai *et al.* (2003) correlacionaram alta capacidade antioxidante, em extratos de própolis brasileiras, com os elevados teores destes compostos fenólicos (Nagai *et al.*, 2003).

Sawaya *et al.* (2009) investigaram a ação antioxidante da geoprópolis de abelhas das espécies *Scaptotrigona depilis* e *Scaptotrigona bipunctata*, ambas produzidas nos Estados de São Paulo e Maranhão, coletadas em diferentes épocas do ano. Os extratos etanólicos das geoprópolis de *S. depilis* e *S. bipunctata* foram avaliados quanto a sua capacidade antioxidante em testes *in vitro*, através do método de inibição do radical estável DPPH. Os autores também avaliaram a composição química dos extratos, por meio de técnicas de ionização por eletrospray acoplada a espectrometria de massas (ESI-MS) e os resultados foram comparados por análise de componentes principais (PCA). Sawaya *et al.* (2009) encontraram diferenças nas composições das amostras, entre as espécies. Também foram observadas variações de acordo com a estação do ano, sendo que a geoprópolis coletada na primavera demonstrou o maior potencial antioxidante, para ambas as espécies. Os autores concluem que a sazonalidade e características geográficas podem influenciar significativamente na composição e na capacidade antioxidante, da geoprópolis destas abelhas do gênero *Scaptotrigona*.

Da Silva *et al.* (2013) avaliaram os extratos metanólico e etanólico de geoprópolis, produzidas pelas espécies de abelhas sem ferrão *Melipona interrupta* e *Melipona seminigra* no sul do Estado do Amazonas. A capacidade antioxidante dos extratos metanólico e etanólico de geoprópolis foi testada *in vitro*, utilizando-se o método de inibição do radical estável DPPH e o método da redução do íon férrico (FRAP). Em ambos os testes, os autores confirmaram o potencial antioxidante das geoprópolis de *M. interrupta* e *M. seminigra*, sugerindo que essa atividade seja influenciada diretamente pela alta presença de compostos fenólicos nas amostras. Uma investigação química das amostras revelou a presença de

hidroxiflavonas, pentaidroxiflavanol, naringenina e miricetina, que são compostos com grande capacidade antioxidante.

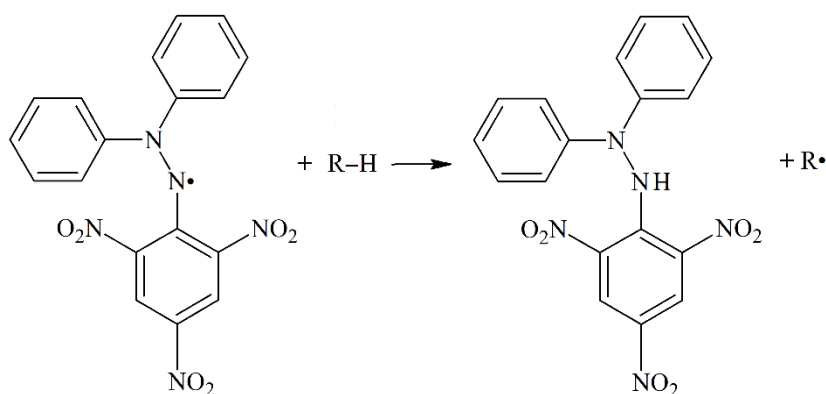
Campos *et al.* (2015) analisaram a capacidade da geoprópolis de *Tetragonisca fiebrigi* de eliminar radicais livres em células, que foram cultivadas em meio a substâncias oxidantes. Os autores utilizaram os extratos etanólicos de geoprópolis de *T. fiebrigi*, produzida no Estado de Mato Grosso do Sul, que foi aplicado diretamente sobre cultura de células. O extrato apresentou capacidade antioxidante, inibindo o processo de hemólise em hemácias e a peroxidação lipídica em eritrócitos humanos. O estudo de Campos *et al.* (2015) aponta, com estes resultados positivos, que a geoprópolis de *T. fiebrigi* possui importantes atividades terapêuticas. Os autores também sugerem a sua aplicação nas indústrias farmacêutica, alimentícia e de suplementos nutricionais.

3.4.1.1 Determinação *in vitro* das capacidades antioxidantes da geoprópolis

Método pela inibição do radical estável DPPH

O radical orgânico estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (Figura 4) apresenta coloração violeta, com máximo de absorbância próximo de 517 nm. Quando em presença de substâncias com propriedades antioxidantes, ocorre a redução da molécula de DPPH, que se dá normalmente pela doação de um hidrogênio das substâncias antioxidantes, tornando-a na molécula estável 2,2-difenil-picril-hidrazina (DPPH-H), que apresenta coloração amarelada (Brand-Williams *et al.*, 1995).

Figura 5 – Redução do DPPH

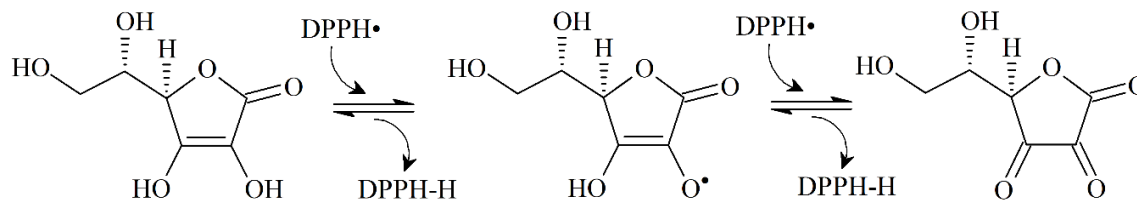


Fonte: O autor, adaptado de Behrendorff *et al.* (2013).

O ácido ascórbico ou vitamina C é uma substância com grande capacidade antioxidante que pode ser encontrada naturalmente em alimentos, como frutas e verduras.

Cada molécula de ácido ascórbico é capaz de reduzir até duas moléculas de DPPH (Brand-Williams *et al.*, 1995), como está representado na Figura 6.

Figura 6 – Reação simplificada de oxidação do ácido ascórbico à dehidroascórbico pelo DPPH.



Fonte: O autor, adaptado de Brand-Williams *et al.* (1995).

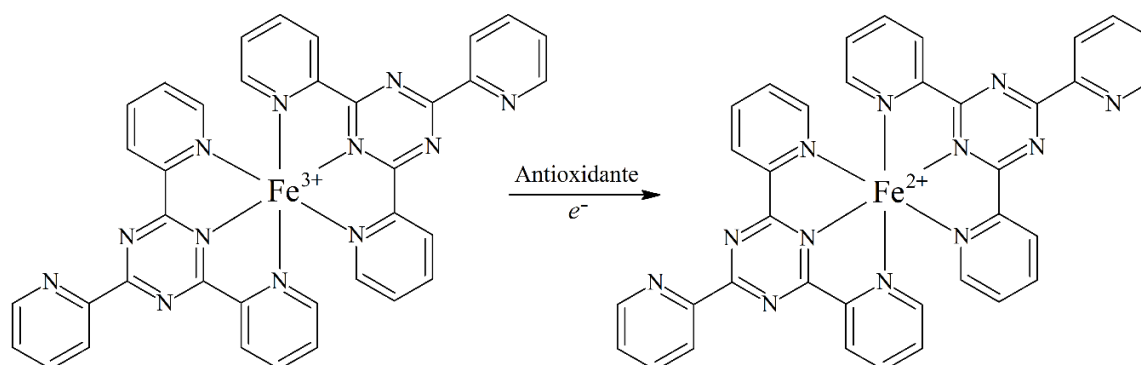
Recentemente, o ácido ascórbico tem sido utilizado como uma alternativa de padrão analítico, para a determinação da capacidade antioxidante de méis e própolis. Boulanouar *et al.* (2017) testaram as atividades antioxidantes de amostras de mel e própolis, produzidas no sul da Argélia, por meio de dois métodos diferentes: inibição do radical DPPH e poder redutor de ferro III (FRAP). Os autores compararam as atividades antioxidantes das amostras com aquelas apresentadas pelos padrões ácido ascórbico, hidroxitolueno butilado (BHT) e Trolox®. Nos testes utilizando DPPH, concluíram que havia uma forte correlação entre os resultados das análises, de modo que os padrões utilizados apresentaram valores para capacidade antioxidante similares. Ramnath e Venkataramgowda (2016) utilizaram curvas de calibração, com diferentes concentrações do ácido ascórbico, para a determinação das capacidades antioxidantes de extratos etanólicos de própolis indiana de *A. mellifera*, através do método de inibição do radical estável DPPH. Aguiar *et al.* (2018) realizaram testes de capacidade antioxidante nos extratos etanólicos de própolis vermelha, pelo método DPPH. Os autores observaram resultados significativos, em termos de IC₅₀, para o poder antioxidante da própolis vermelha (24,0 µg/L), e denotam que esta apresentou resultados aproximadamente duas vezes maiores do que o ácido ascórbico (43,0 µg/L), utilizado como padrão de comparação.

Método pela redução do íon férrico (FRAP)

O ensaio FRAP (do inglês: *Ferric Reducing Antioxidant Power*) determina o poder antioxidante de uma amostra pela sua capacidade de reduzir o íon Fe³⁺, produzindo o íon Fe²⁺. Em pH baixo o íon Fe³⁺ forma um complexo com TPTZ (2,4,6-tripiridil-*s*-triazina) (Figura 7) que apresenta coloração roxa clara. Quando ocorre a redução do íon Fe³⁺, através da doação de elétrons por parte dos antioxidantes, há uma intensificação da tonalidade da mistura, logo que o novo complexo formado por Fe²⁺ com TPTZ (figura 7) apresenta uma

coloração roxa intensa, cuja a absorvância pode ser medida no comprimento de onda de 593 nm (Benzie e Strain, 1999). Quanto mais intensa for a coloração, maior será sua absorvância a 593 nm, porque há mais Fe^{2+} no meio, o que demonstra um maior potencial antioxidante da amostra testada (Benzie e Strain, 1999; Antolovich *et al.*, 2002).

Figura 7 – Redução do complexo $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ por um antioxidante doador de elétrons.



Fonte: O autor, adaptado de Rufino *et al.*, 2006.

3.5 Análises espectrais

Diversas técnicas instrumentais podem ser empregadas para analisar a composição e as características de um produto natural. A cromatografia, a eletroquímica e as técnicas espectroscópicas estão entre as principais técnicas normalmente utilizadas para este processo (Skoog e Holler, 2007). Estas técnicas analíticas estão em constante desenvolvimento e já apresentaram grandes vantagens sobre outras técnicas como a gravimetria, titulometria, entre outras formas clássicas de análise (Sharma, 2000). Elas conseguem coletar uma enorme quantidade de informações, em uma ampla faixa de dados, com facilidade e de maneira célere (Christian *et al.*, 2014).

Os dados obtidos através de um espectro, em geral, apresentam alto grau de complexidade, possuindo inúmeras variáveis. São dados multivariados e necessitam ser tratados por meio de um conjunto de ferramentas estatísticas aplicadas a análises químicas, a quimiometria (Skoog *et al.*, 2007). Técnicas instrumentais de análise, como a espectroscopia na região do infravermelho, quando associadas à quimiometria, apresentam elevado grau de confiabilidade e precisão. Este arranjo vem sendo desenvolvido para auxiliar pesquisadores e indústrias a otimizar as suas rotinas laboratoriais (Kumar *et al.*, 2015).

Análises multivariadas de espectros de infravermelho próximo

A espectroscopia na região do infravermelho é uma técnica que permite identificar e/ou caracterizar uma amostra através da radiação infravermelha. Ao ser absorvida por uma substância, a radiação infravermelha causa alteração nos modos vibracionais e rotacionais das moléculas: um detector é utilizado para registrar a diferença entre a radiação emitida a partir de uma fonte e a radiação absorvida pela amostra e, desta forma, é gerado um espectro de absorção (Barbosa, 2013). A espectroscopia na região do infravermelho se divide em três classes diferentes, que utilizam três regiões distintas no espectro: infravermelho próximo (NIR, do inglês: *near infrared*), que abrange a faixa de ondas entre 13330 a 4000 cm^{-1} ; infravermelho médio (MIR, do inglês: *median infrared*), que está entre as faixas de 4000 a 400 cm^{-1} ; infravermelho distante (FIR, do inglês: *far infrared*), que engloba a região entre 400 a 10 cm^{-1} (Stuart, 2005).

A espectroscopia no infravermelho, quando associada a ferramentas quimiométricas, apresenta importantes vantagens, tais como o baixo custo e a rapidez nas análises, pouca utilização de solventes orgânicos e a pouca geração de resíduos (González-Martín *et al.*, 2017). Entretanto, os espectros gerados na espectroscopia de infravermelho normalmente apresentam enorme quantidade de informação, que em geral, é demasiadamente complexa para se analisar apenas visualmente. Assim sendo, é necessário utilizar combinações entre análises estatísticas (quimiometria) com ferramentas computacionais, para absorver as informações essenciais apresentadas a partir dos espectros, bem como, para facilitar a sua interpretação e para reconhecer padrões característicos do analito (de Souza *et al.*, 2013).

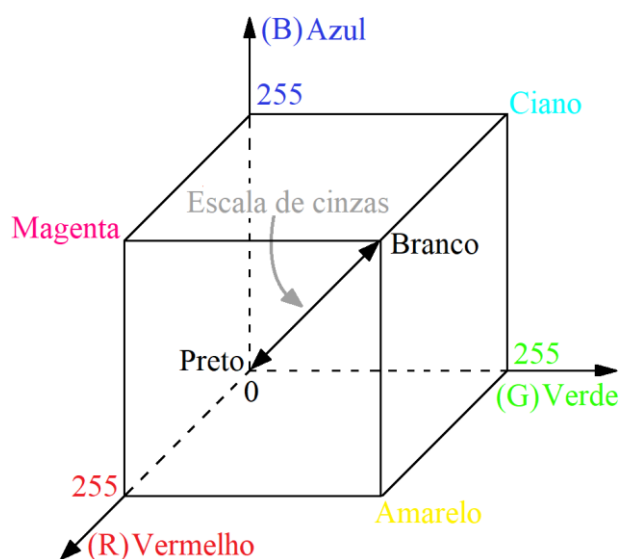
O equipamento para obtenção de espectros NIR é amplamente utilizado em diversas indústrias, como por exemplo a petroquímica, por sua simplicidade técnica, rapidez e versatilidade de análise, além de ser uma técnica não destrutiva (Sun, 2009). Um equipamento para espectroscopia de NIR, consegue verificar e quantificar n componentes de uma matriz, de forma simultânea e, para a maioria dos casos, as matrizes não requerem necessariamente uma preparação (Christian *et al.*, 2014; Sun, 2009).

Análise multivariada de imagens – MIA

Geladi *et al.* (1986) introduziram o uso de análises multivariadas de imagens, para identificar sinais analíticos, na área química. A análise multivariada de imagens (MIA, do inglês: *multivariate image analysis*) é constituída da aplicação conjunta de ferramentas de análise multivariada com o processamento de imagens digitais (Geladi *et al.*, 1986).

Imagens digitais, monocromáticas ou coloridas, são aproximações de imagens reais, geralmente obtidas utilizando-se dispositivos de captura de imagem, que utilizam sensores de tipo CCD (do inglês: *Charge-Coupled Device*) ou CMOS (do inglês: *Complementary metal oxide semiconductor*) para captura de imagens (Fernandez-Oliveras *et al.*, 2009). O modelo de cores RGB (do inglês: *Red, Green and Blue*) é o mais comum para composição de imagens digitais coloridas, sendo também o modelo mais comum em câmeras e televisores. Pode-se descrever geometricamente o modelo RGB, baseando-se em um sistema de coordenadas cartesianas, considerando-o como um cubo: os três eixos (x, y e z) representam as cores primárias aditivas vermelho, verde e azul; os outros três vértices deste cubo representam as cores secundárias ciano, magenta e amarelo. O vértice sobre a origem dos planos representa a cor preta, enquanto o vértice mais distante da origem representa a cor branca (Gonzales e Woods, 2008). A Figura 8 ilustra o modelo RGB de modo esquematizado:

Figura 8 – “Cubo” de cores RGB.



Fonte: O autor (2018), adaptado de Damasceno *et al.* (2015).

Uma imagem digital baseada no modelo RGB é matematicamente um arranjo tridimensional das cores primárias aditivas vermelho, verde e azul; a tonalidade de cada *pixel* que compõe uma imagem é obtida pela combinação destas cores (Damasceno *et al.*, 2015).

Segundo Sridhar (2013), cada ponto no cubo RGB (Figura 8) representa uma combinação de cor possível para um *pixel*. Como os índices (tons ou intensidades) variam em cada eixo de 0 a 255 “tons”, logo, existem exatamente $256^3 = 16.777.216$ de combinações de cores possíveis. Sridhar (2013) assinala que, esse número ajuda-nos a compreender, como pode ser grande a sensibilidade no processo de reconhecimento de padrões e na diferenciação de cores de uma imagem digital.

A distribuição dos níveis de cinza de uma imagem RGB pode ser representada por um gráfico de distribuição (histograma) que indica número de *pixels* existentes na imagem para cada tom na escala de cinzas (Pedrini e Schwartz, 2007). Metodologias analíticas que utilizam a análise multivariada de imagens, comumente utilizam os histogramas de imagens digitais dos analitos, correlacionando suas características com as propriedades de interesse, de modo muito semelhante à forma de análise de espectros ou cromatogramas. Estas metodologias apresentam algumas características significativamente vantajosas, como a rapidez e o baixo custo das análises, a mínima geração de resíduos e também a simplicidade e facilidade da técnica e logística (Damasceno *et al.*, 2015).

3.6 Quimiometria

A quimiometria pode atuar em diversas frentes em uma pesquisa, podendo ser utilizada no planejamento de experimentos, no reconhecimento de padrões, na construção de modelos de calibração multivariada, no processamento de imagens, dentre outras aplicações (Valderrama *et al.*, 2016).

A espectroscopia NIR associada a ferramentas de regressão de mínimos quadrados parciais (PLS) é relativamente recente para a análise de própolis e geoprópolis, porém já existem estudos onde se desenvolveram modelos de calibração por regressão PLS para estes fins. Gonzáles-Martín *et al.* (2017) analisaram a presença de pesticidas em amostras de própolis de *A. mellifera* do Chile e da Espanha, empregando espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) para a detecção dos contaminantes nas amostras. Os autores utilizaram modelos de PLS discriminante (PLS-DA) e regressão de mínimos quadrados parciais modificados (MPLS) para quantificar as concentrações dos contaminantes. Costa *et al.* (2017) empregaram a regressão por PLS associada à espectroscopia NIR para quantificar os compostos majoritários de amostras de pólen de abelha produzidas no Brasil.

3.6.1 Regressão por mínimos quadrados parciais – PLS

A regressão por PLS (do inglês: *Patial Least Squares*) foi desenvolvida em meados de 1960 pelo estatístico norueguês Herman Wold. Foi originalmente desenvolvida para fazer parte do conjunto de ferramentas estatísticas utilizadas no campo da econometria, porém no final da década de 1970 a regressão por PLS começou a ser utilizada na quimiometria. Segundo Geladi e Kowalski (1986), a regressão por PLS mostra-se como sendo uma alternativa considerável frente às ferramentas clássicas de análise de regressão nas

componentes principais (RPC) e de regressão linear múltipla. Os autores destacam que a regressão por PLS é mais robusta, visto que os parâmetros de um modelo não mudam consideravelmente quando novas amostras de calibração são retiradas da população total.

A aplicação da regressão por PLS como objetivo encontrar uma relação entre uma matriz (\mathbf{X}) que contém os dados de espectro infravermelho próximo ou dados de imagem dos extratos etanólicos de geoprópolis (EEGs) com uma matriz resposta (\mathbf{y}), que neste caso armazena as respectivas medidas obtidas experimentalmente (teores de flavonoides totais e capacidade antioxidante pelos métodos FRAP e DPPH). O resultado é uma equação semelhante à Equação 1, onde \mathbf{b} é o vetor de regressão e \mathbf{e} é o vetor que representa os erros do modelo (Geladi e Kowalski, 1986).

$$y = Xb + e \quad (\text{Equação 1})$$

Para a aplicação quimiométrica da regressão por PLS, primeiramente desenvolvem-se os modelos utilizados para a calibração (Pimentel *et al.*, 1996). Desta forma, uma matriz \mathbf{X} é composta de \mathbf{m} colunas, que correspondem ao sinal espectral de absorbância para cada número de onda, com \mathbf{n} linhas, que representam cada amostra de EEG. A matriz \mathbf{y} é definida a partir de \mathbf{k} colunas, contendo as informações químicas dos extratos de geoprópolis (teores de flavonoides totais, etc), com \mathbf{n} linhas, que representam cada extrato. Por meio da técnica de análise das componentes principais, a matriz \mathbf{X} é decomposta em uma soma de matrizes de tamanho menor (Equação 2) (Geladi e Kowalski, 1986):

$$X = \left(\sum_{i=1}^r M_i \right) + E \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo \mathbf{M}_i as variáveis latentes (ou componentes principais), com \mathbf{r} dimensões (número de variáveis latentes) selecionadas para “truncar” a igualdade. \mathbf{E} é correspondente a matriz de resíduos, que está relacionada ao número de fatores \mathbf{r} escolhidos. Em seguida a matriz \mathbf{y} também é decomposta, de maneira análoga à matriz \mathbf{X} . Por fim, determina-se a correlação entre as variáveis latentes, utilizando-se das componentes destas matrizes menores. Em um modelo de regressão por PLS, as matrizes \mathbf{X} e \mathbf{y} são decompostas simultaneamente, por meio iterativo. Acredita-se que as informações que estão contidas na matriz \mathbf{y} sejam transferidas para a matriz \mathbf{X} (Geladi e Kowalski, 1996). Após o processo de calibração, é possível prever as propriedades químicas de novas amostras (Ferrão *et al.*, 1996) de extrato de geoprópolis, a partir de seus respectivos espectros. Os sinais espectrais de NIR ou dados de imagem destas amostras compõem uma matriz \mathbf{X}_p , formada novamente por \mathbf{m} colunas (contendo os dados espectrais) e \mathbf{t} linhas, que representam as novas amostras. Agora, utilizando-se da correlação construída no processo de calibração do modelo, as

propriedades desconhecidas (valores de predição para os teores de flavonoides e para as atividades antioxidantes DPPH e FRAP) são coletadas em uma nova matriz y_p .

Validação dos modelos de regressão PLS

Os modelos de calibração multivariada desenvolvidos necessitam passar por um processo de validação, logo que, os modelos podem não ser verdadeiros no que tange às suas capacidades de predição.

Segundo Kumar (2015) e Sinelli *et al.* (2008), os principais parâmetros a serem observados para avaliar a exatidão do modelo, após a construção dos modelos de calibração, são o coeficiente de determinação (R^2), a raiz quadrada do erro médio da validação cruzada (RMSECV, do inglês: *Root Mean Square Errors of Cross Validation*), o desvio de predição residual (RPD, do inglês: *Residual Prediction Deviation*) e o erro padrão de predição (SEP, do inglês: *Standard Error of Prediction*) (Kumar, 2015).

O coeficiente de determinação (R^2) demonstra a proporção da variância no conjunto dos dados de referência que podem ser explicados pela variação nos dados previstos. O coeficiente de determinação é o quadrado do coeficiente de correlação (r).

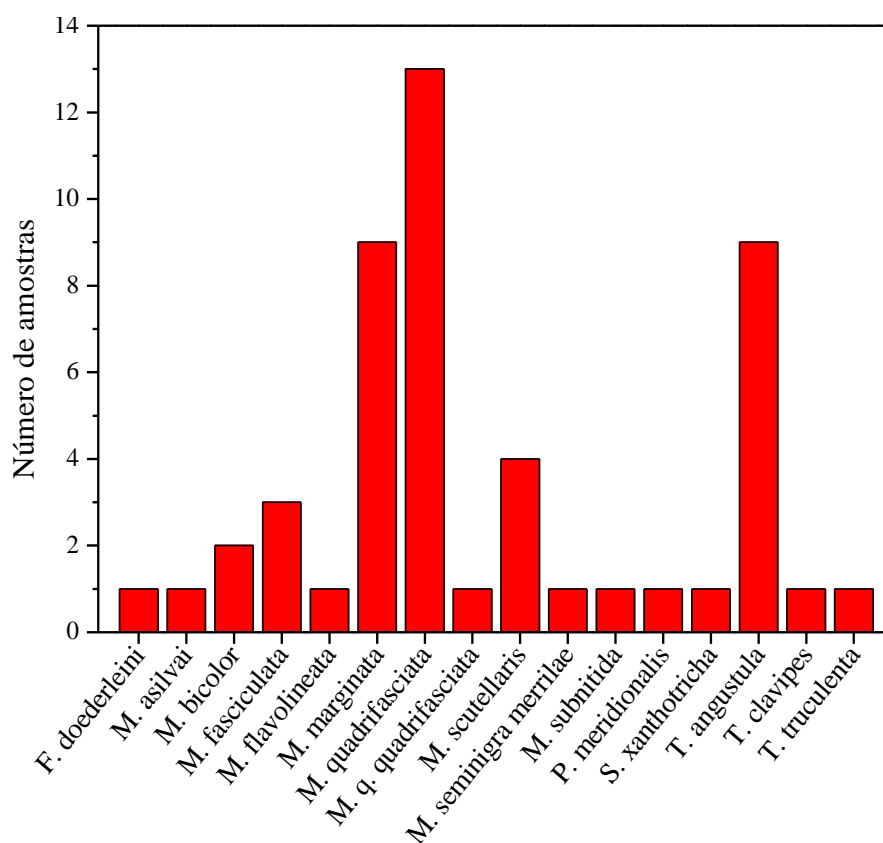
Quando se utiliza a validação cruzada (*Cross Validation*), o RMSECV expressa a raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada. O RMSECV é uma medida quantitativa da exatidão alcançada no processo de previsão de valores para as amostras, durante a validação cruzada. Portanto, é definido como sendo o desvio padrão das diferenças entre: dados espectrais e dados de referência, no conjunto de amostras da validação cruzada (Kumar, *et al.*, 2015; Sinelli *et al.*, 2008). Segundo Sinelli *et al.* (2008), um modelo de calibração deve ser selecionado, buscando sempre a minimização do valor do RMSECV.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras de geoprópolis

As amostras de geoprópolis foram adquiridas pelo Laboratório de Cromatografia e Produtos Naturais (CRONAT), por meio de doações dos produtores e também de outros pesquisadores. As amostras foram preservadas separadamente em sacos plásticos, sob refrigeração em geladeira, longe de luz solar, calor ou umidade. Foram testadas um total de 50 amostras diferentes de geoprópolis, que foram produzidas por 16 espécies de abelhas nativas sem ferrão. Na Figura 9 estão representados os números de amostras de geoprópolis, utilizadas durante os estudos, agrupadas por espécie de abelha produtora.

Figura 9 – Número de amostras de geoprópolis analisadas por espécie de abelha nativa produtora.



Fonte: O autor, 2018.

A maioria das amostras de geoprópolis foi produzida por abelhas criadas no Estado do Paraná. Porém, foram recebidas algumas amostras produzidas em outros quatro estados brasileiros: Maranhão, Pernambuco, São Paulo e Sergipe (Figura 10). O maior número de amostras testadas foi produzido por abelhas pertencentes ao gênero *Melipona*. No anexo 1 encontram-se discriminados os dados sobre cada uma das amostras de geoprópolis utilizadas

durante os estudos: origem, nome científico da abelha produtora e o número de identificação da amostra.

Figura 10 – Cidades e estados de origem das geoprópolis adquiridas. Número de amostras adquiridas em cada local especificado entre parêntesis.

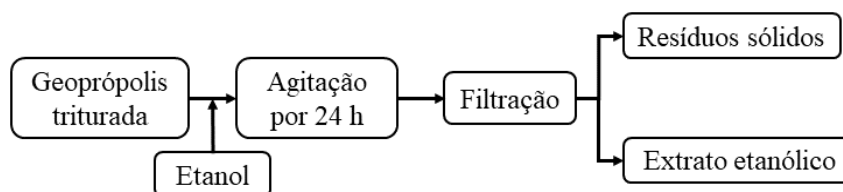


Fonte: O autor, 2018.

4.2 Obtenção dos extratos etanólicos de geoprópolis (EEGs)

As amostras *in natura* de geoprópolis foram conservadas em freezer até o momento do preparo dos extratos. A extração foi realizada em triplicata para cada amostra de geoprópolis, totalizando no final 150 extratos. Para o processo de extração utilizou-se aproximadamente 2 g de geoprópolis *in natura*. Na sequência a geoprópolis foi triturada em almofariz com pistilo e depois a extração se deu por maceração em 20 mL de etanol P.A (F. Maia®, 99 %) durante 24 horas, utilizando incubadora (Tecnal®) a 180 rpm e 25°C. Após o tempo estabelecido, as soluções foram filtradas com papel de filtro qualitativo (Qualy®) sob baixa pressão, para retirar os resíduos sólidos insolúveis (ceras, solo, folhas, pedaços de madeira, etc.). A Figura 11 descreve brevemente a metodologia de extração utilizada.

Figura 11 – Metodologia para obtenção dos extratos etanólicos de geoprópolis.



Fonte: O autor, 2018.

Os extratos de geoprópolis tiveram seu volume ajustado para 25 mL com etanol em balão volumétrico, resultando em uma concentração de 0,08 g/mL, e depois foram armazenados em frasco âmbar, devidamente etiquetados, sob refrigeração em freezer.

4.3 Determinação dos teores de flavonoides totais em EEGs

Os teores de flavonoides totais, presentes na geoprópolis, foram quantificados segundo a metodologia descrita por Woisky e Salatino (1998), com algumas adaptações. Em balão volumétrico de 5 mL, adicionou-se uma alíquota de 100 µL de EEG e em seguida, acrescentou-se 250 µL de solução de cloreto de alumínio (AlCl₃) di-hidratado (Biotec® 98%) 5% m/v em metanol, e por fim, completou-se o volume do balão com etanol (F. Maia® 99%). Após decorrido o tempo de reação de 30 min, realizou-se a leitura de absorbância em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu® UV-1800), a 425nm. Para o branco, em balão volumétrico de 5 mL, foram adicionados 250 µL da solução metanólica de cloreto de alumínio e depois completou-se o volume do balão com etanol.

Como referência foi construída uma curva analítica utilizando o padrão quercetina (Sigma-Aldrich® 98%). A partir de uma solução estoque de quercetina na concentração 1,060 g/L em etanol (F. Maia® 99%) foram preparadas soluções padrão de quercetina nas concentrações 0,11; 0,53; 1,06; 2,65; 5,30; 10,60; 15,90; 21,20; 26,50; 31,80 e 37,10 mg/L. Para tal, alíquotas de 1; 5; 10; 25; 50; 100; 150; 250; 300 e 350 µL foram retiradas da solução estoque de quercetina, transferidas para balões volumétricos de 10 mL e em seguida completou-se o volume com etanol. Para complexação da quercetina com AlCl₃ e construção da curva analítica, 500 µL de cada solução padrão de quercetina foram misturados com 250 µL da solução de AlCl₃, em balão volumétrico de 5mL e por fim completou-se o volume com etanol. Assim, a curva analítica foi elaborada com 11 níveis de concentração de quercetina (0,011; 0,05; 0,11; 0,27; 0,53; 1,06; 1,59; 2,12; 2,65; 3,18 e 3,71 mg/L).

Após o tempo de 30 minutos foi realizada a medida da absorbância a 425 nm. As leituras se deram contra o mesmo branco utilizado nas análises das amostras. Estes procedimentos foram realizados em triplicata. Por meio da equação da reta, obtida através

da regressão linear da curva de absorvância vs. concentração do padrão quercetina, realizou-se o cálculo dos teores de flavonoides totais presentes nos extratos. Os resultados foram reportados em função da massa inicial de geoprópolis utilizada para fazer os extratos, sendo expressos em μg de quercetina equivalente/g de geoprópolis *in natura*.

4.4 Determinação da capacidade antioxidante dos EEGs através do método da inibição do radical estável DPPH

A capacidade antioxidante dos extratos de geoprópolis foi estimada através da inibição do radical estável DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) pela ação dos antioxidantes presentes nos EEGs, através do método espectrofotométrico, segundo metodologia de Brand-Williams *et al.* (1995), adaptada por Kim *et al.* (2002). No momento das análises, foi preparada uma solução de trabalho de DPPH (Sigma-Aldrich® 99,9%) 20 mg/L em etanol (F. Maia® 99%), com absorvância próxima de 0,7 a 517 nm. Em tubos de ensaio, adicionou-se 2500 μL da solução de trabalho de DPPH, em seguida foram acrescentadas alíquotas de 50 μL dos extratos de geoprópolis e por último completou-se o volume no tubo para 3 mL com etanol. Os tubos foram agitados em vortex e deixados no escuro, para que as reações entre os compostos sequestradores de radicais livres presentes no EEGs e o DPPH ocorressem sem a interferência da luz. Após o tempo reacional de 30 minutos efetuou-se a leitura de absorvância em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu® UV-1800), a 517 nm (A_{final}), contra um branco de etanol. A porcentagem de inibição (I%) do radical estável DPPH, provocada por cada extrato de geoprópolis foi calculada por meio da Equação 1. A_{inicial} é a absorvância da solução resultante após a diluição de 2500 μL da solução de trabalho de DPPH acrescidos de 500 μL de etanol.

$$I(\%) = \left(\frac{A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}}}{A_{\text{inicial}}} \right) \times 100\% \quad \text{(Equação 3)}$$

Como referência foi construída uma curva analítica utilizando o ácido ascórbico (vitamina C) como padrão externo de substância antioxidante, segundo metodologia descrita por Kim *et al.* (2002), com pequenas adaptações. Uma solução estoque do padrão ácido ascórbico (F. Maia® 99,9%) 0,1040 g/L em etanol (F. Maia® 99%) foi utilizada para preparar 13 soluções padrão nas concentrações de: 0,07; 0,17; 0,35; 0,69; 1,39; 1,73; 2,08; 2,77; 3,47; 3,81; 4,16; 4,51 e 4,85 $\mu\text{g/mL}$. Para a construção da curva analítica foram adicionados 2500 μL de solução trabalho de DPPH em tubos de ensaio, e em seguida, foram acrescentados 2; 5; 10; 20; 40; 50; 60; 80; 100; 110; 120; 130 e 140 μL da solução estoque

do padrão ácido ascórbico. Por fim ajustou-se o volume nos tubos com etanol para 3 mL com micropipeta. Os tubos foram agitados em vortex e deixados para reagir no escuro. Após o tempo de reação de 30 min, foi efetuada a leitura de absorvância no espectrofotômetro a 517 nm (A_{final}), contra um branco de etanol. Os procedimentos foram realizados em triplicata. A inibição percentual (I%) do DPPH provocada pelo ácido ascórbico, foi calculada através da Equação 3 e então obteve-se uma curva de inibição do DPPH por concentração de ácido ascórbico. Por meio da equação da reta, obtida a partir da regressão linear desta curva e, a partir da inibição % do DPPH provocada por cada EEG, realizou-se o cálculo da capacidade antioxidante dos extratos de geoprópolis em termos de VCEAC (do inglês: *Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity*). Os resultados foram calculados em função das massas iniciais de geoprópolis, utilizadas para fazer os extratos, e expressos em mg de vitamina C equivalente/g de geoprópolis *in natura*.

4.5 Determinação da capacidade antioxidante dos EEGs pelo método de redução de ferro (FRAP)

A capacidade antioxidante dos EEGs foi medida pelo método FRAP (do inglês: *Ferric Reducing Antioxidant Power*). A metodologia empregada para a execução do ensaio FRAP segue aquela utilizada por Rufino *et al.* (2006) com poucas adaptações. Para a obtenção do reagente de FRAP foram misturados no momento das análises 500 mL de solução tampão acetato 0,3 mol/L com pH aproximado de 3,6; em seguida uma solução de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) (Sigma® 99,9%) 10 mmol/L em água ultrapura; e, por último, solução de cloreto férrico heptahidratado (Dinâmica® 98%) 20 mmol/L em etanol (F. Maia® 99%). Em tubos de ensaio foram adicionados 300 µL de EEG junto a 2700 µL do reagente de FRAP. A mistura foi homogeneizada utilizando-se agitação em vortex e na sequência mantida em banho termostático a 37°C durante 30 min. Após decorrido o tempo de reação, a absorvância foi medida em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu® UV-1800) em 593 nm. O reagente de FRAP foi utilizado como branco. Para a quantificação do poder de redução dos EEGs foi construída uma curva de calibração de sulfato ferroso, nas concentrações de: 0,41; 0,82; 1,64; 2,46; 4,10; 8,18; 12,26 e 16,35 mg/L de Fe^{2+} . Para a elaboração da curva foi preparada uma solução matriz de Fe^{2+} (Dinâmica® 98%) 0,556 g/L em etanol (F. Maia® 99%) e em balões volumétricos de 10 mL foram adicionados os volumes de: 0,25; 0,50; 1,0; 1,5; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mL da solução e, por fim, completou-se o volume com etanol. Em tubos de ensaio, utilizando micropipeta, foram depositados 90 µL das soluções de sulfato ferroso e, em seguida, 2700 µL do reagente de FRAP. O volume foi

ajustado para 3,0 mL e a mistura passou pelas etapas de agitação em vortex e aquecimento em banho termostático a 37 °C durante 30 min, sob abrigo da luz. Após o tempo reacional foi efetuada a medida de absorvância dos pontos da curva no espectrofotômetro, a 593 nm. Os resultados finais foram calculados em função das massas iniciais de geoprópolis, expressos em mg de Fe⁺² equivalente/g de geoprópolis *in natura*.

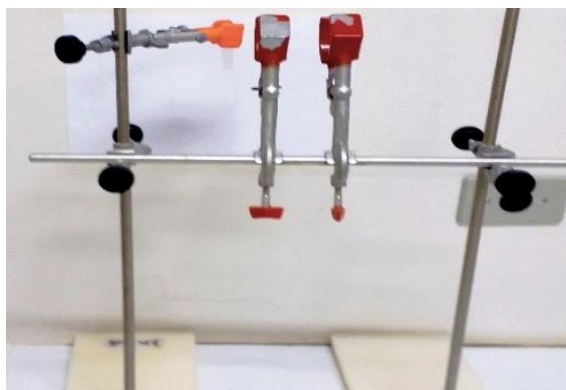
4.6 Obtenção dos espectros dos EEGs na região do infravermelho próximo

Os espectros de infravermelho próximo (NIR, do inglês: *Near Infrared*) dos EEGs foram obtidos utilizando um espectrômetro FT-NIR, Bruker® MPA, instalado na central de análises da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, em seu *campus* de Pato Branco – PR. O equipamento foi configurado para realizar 32 escaneamentos, na região espectral de 12450 até 4000 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹. Utilizaram-se 2 mL dos EEG, em cubeta de quartzo com bomba de sucção como suporte.

4.7 Obtenção das imagens digitais dos EEGs

Para obter as fotografias digitais foram utilizadas alíquotas de 2 mL de cada extrato etanólico de geoprópolis, que foram depositadas com micropipeta em frascos ependorf de material plástico transparente. Como câmera fotográfica, utilizou-se um celular Samsung® Galaxy On 7, com câmera de 13 megapixels e resolução de 4128 × 3096 pixels. Um suporte foi montado, utilizando-se garras e hastes de suporte (Figura 12), para auxiliar na fotografia dos extratos, mantendo a câmera e os frascos fixos, a uma distância de 10 cm entre si. Uma folha de papel branca foi utilizada como plano de fundo, a 5 cm de distância do frasco contendo o extrato (Figura 12). As fotografias foram feitas sob iluminação ambiente.

Figura 12 – Suporte utilizado para obtenção das fotografias dos EEGs. As garras presas verticalmente apoiam a câmera fotográfica enquanto a garra horizontal prende a amostra.

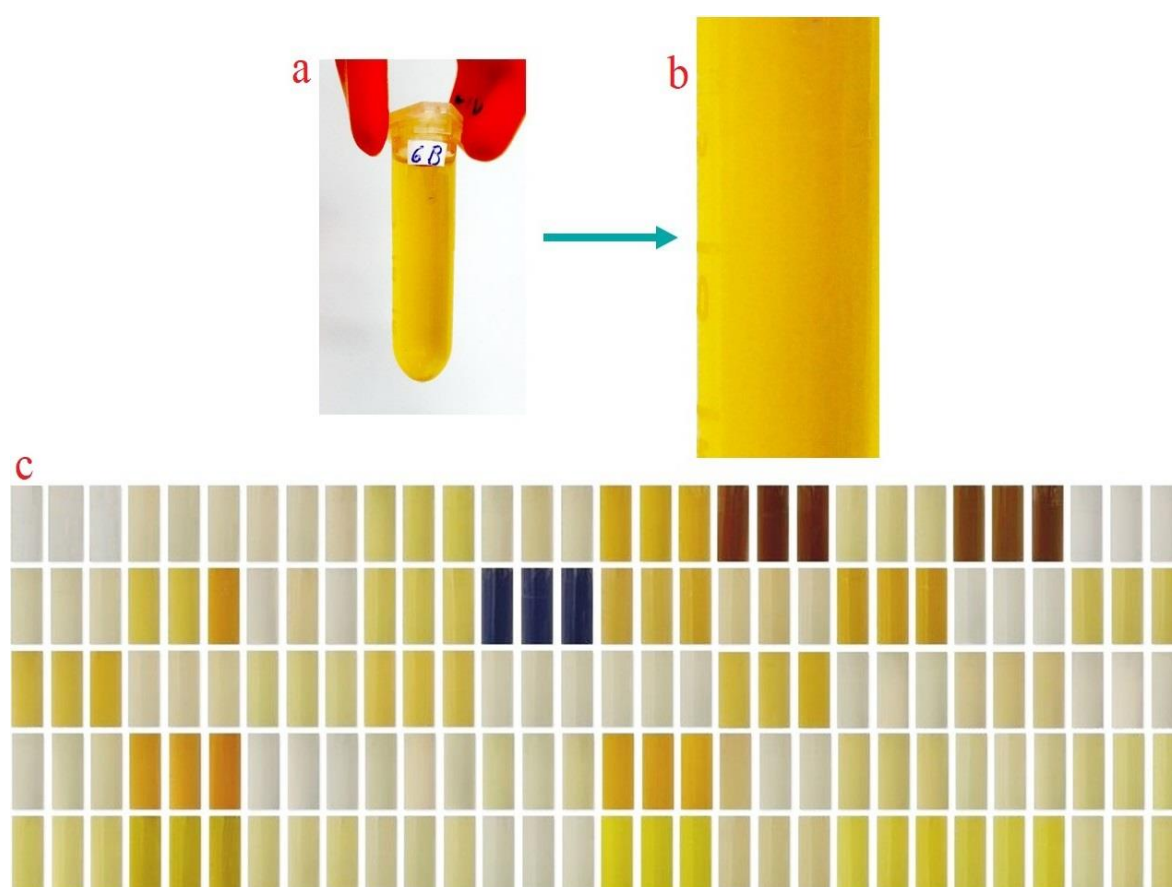


Fonte: O autor, 2018.

4.7.1 Processamento das fotografias digitais

Utilizou-se o software editor de imagens de licença livre Gimp® V.2.10.4 para recortar digitalmente as fotografias dos EEGs (Figura 13a), redimensionando-as para um tamanho padrão de 380 pixels de largura por 870 pixels de altura (Figura 13b), desta forma excluíram-se as bordas deixando somente a imagem do EEG (Figura 13b). O mesmo processo foi realizado para todas as fotografias de todos os EEGs (Figura 13c).

Figura 13 – Processamento das fotografias digitais dos EEGs: (13a) fotografia digital do EEG; (13b) recorte da imagem digital a partir da fotografia; (13c) o mesmo processo foi reproduzido para todos os EEGs.



Fonte: O autor, 2018.

A abordagem quimiométrica, a partir das imagens digitais dos EEGs, foi realizada por meio do programa ChesmoStat® V2 (Helfer, 2014). As imagens recortadas digitalmente foram importadas para o programa. A análise do padrão de cores das imagens de geoprópolis foi realizada extraindo-se os 256 tons de cinza para cada canal do espaço RGB; canais vermelho, verde e azul (Figura 8). Este conjunto de dados foi analisado pelo software de licença livre Weka® 3, que selecionou os tons relevantes para a construção dos modelos de regressão PLS. A partir deste conjunto de dados de cor selecionados, realizou-se a

modelagem por regressão PLS, associando características dessas matrizes de cores aos EEGs, e com os valores obtidos experimentalmente pelos métodos de referência (teor de flavonoides totais, DPPH e FRAP).

4.8 Análises Estatísticas

4.8.1 Análises dos dados de referência

Os dados obtidos para os teores de flavonoides totais e para os ensaios de capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP, foram analisados por modelo linear generalizado (MLG). Os dados foram ajustados a distribuição de probabilidade gama, com função de ligação log. O teste de Bonferroni foi utilizado como teste de contraste de média.

4.8.2 Análise de correlação de Pearson

O conjunto de dados obtido por meio das análises de referência (teor de flavonoides totais e capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP) foi submetido à estimativa dos coeficientes de correlação de Pearson (r), utilizando-se o software de licença livre Past®. Os resultados mais significativos foram desdobrados e foram obtidos os coeficientes em análise de trilha.

4.8.3 Análise por modelos lineares generalizados (MLG)

O conjunto de dados correspondentes às variáveis dependentes: teor de flavonoides totais e capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP, foi analisado por modelos lineares generalizados (MLG), devido a falta de normalidade dos resíduos.

Os parâmetros de mérito para as modelagens por MLG foram discutidos em termos dos testes de efeito de modelos por Wald. Pelo teste avaliou-se o modelo de regressão logística como um todo, com a finalidade aferir o grau de significância de cada coeficiente; a partir dos parâmetros de mérito obtidos no teste, verificou-se quais eram significativamente diferentes de zero ($p > 0,05$). Os modelos MLG foram construídos utilizando-se o programa IBM SPSS Statistics®.

4.8.4 Análises de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)

Para investigar as correlações entre os dados espectrais (NIR) e de imagem (MIA) com os valores obtidos durante os testes de referência (DPPH, FRAP e teores de flavonoides

totais), foi empregado um modelo de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês: *Partial Least Squares*), utilizando-se para tal, o software de licença livre ChemoStat® V2 (Helfer, 2014). Foram elaborados dois modelos por PLS, um com dados espectroscópicos e outro por análise de imagem. Foram construídos modelos de calibração e validação, associando os espectros de NIR e de imagem de todos os EEGs, com os dados de referência (Teores de flavonoides totais e capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP).

Desenvolvimento de modelos de calibração e validação

Para desenvolver os modelos de regressão PLS para teores de flavonoides totais, foram selecionados os dados de 123 EEGs. Os espectros de NIR e a MIA das imagens de 82 EEGs foram utilizadas para a construção dos modelos de calibração e, de 41 EEGs para a construção dos modelos de validação.

Os modelos de regressão PLS com dados de capacidade antioxidante pelo método DPPH, foram construídos separadamente a partir dos espectros NIR e dados MIA, obtidos de 120 EEGs. Para a construção dos modelos de calibração, foram empregados dados espectrais de NIR e a MIA das imagens de 80 EEGs, os dados dos 40 EEGs restantes foram empregados para a construção dos modelos de validação.

Os modelos de regressão PLS, desenvolvidos com dados da capacidade antioxidante obtidos pelo método FRAP, utilizaram dados de dados MIA e espectros NIR de 111 EEGs. Os dados de 74 EEGs foram utilizadas para a construção dos modelos de calibração, enquanto o restante das informações de 37 EEGs foi utilizada para a construção dos modelos de validação.

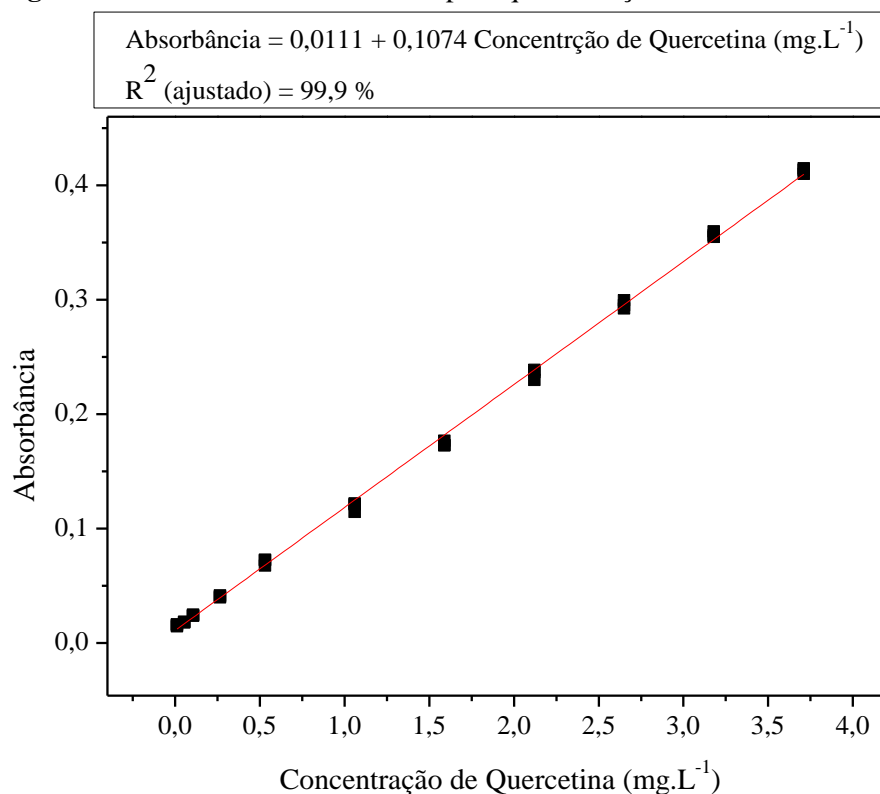
A exclusão de amostras em cada modelo, seguiu o critério de serem consideradas valores anômalos (extremos ou *outliers*), quando apresentavam valores mais de 10 vezes maiores ou menores, do que a média de todas as 150 respotas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teores de flavonoides totais em EEGs

Para a quantificação dos flavonoides totais nos EEGs, construiu-se uma curva analítica empregando-se quercetina, como flavonoide padrão, e cloreto de alumínio dissolvido em metanol. A curva analítica, representada na Figura 14, correlaciona cada diferente concentração do padrão quercetina com o seu respectivo valor de absorbância a 425 nm. Esta correlação apresenta-se adequada, segundo a literatura, para esta faixa de concentrações (Figura 14), deste modo os teores de flavonoides totais presentes nos extratos etanólicos de geoprópolis puderam ser calculados por meio da equação da reta, obtida a partir da regressão linear da curva do padrão quercetina.

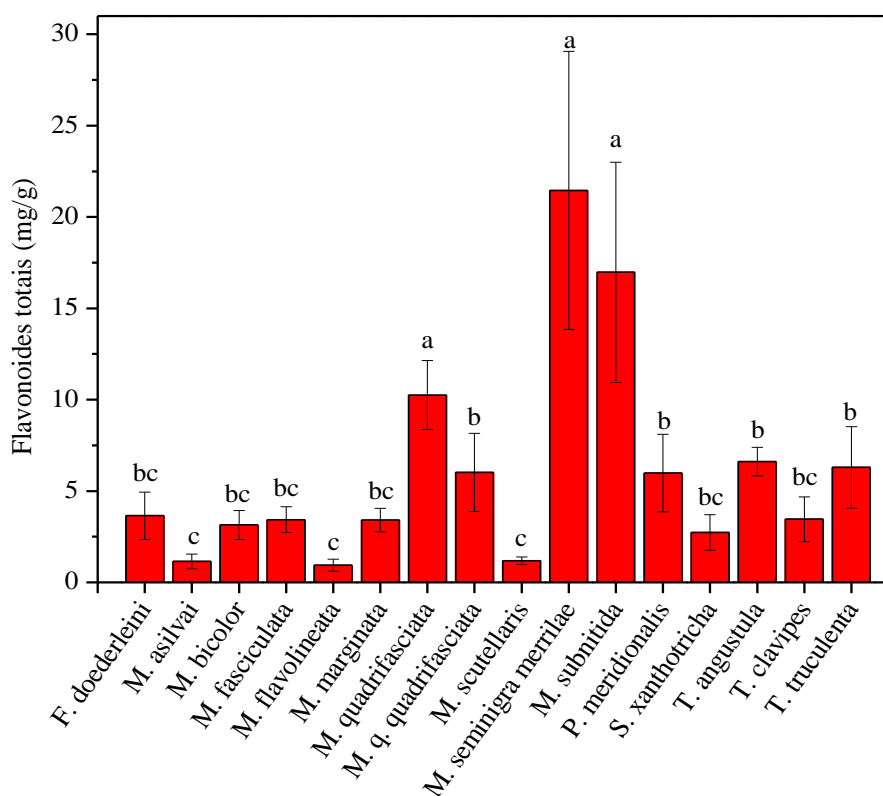
Figura 14 – Curva analítica utilizada para quantificação de flavonoides nos EEGs.



Fonte: O autor, 2018.

Os teores encontrados para cada uma das amostras encontram-se discriminados no Anexo 2, expressos em mg de quercetina equivalente/g de geoprópolis *in natura*. Os valores apresentados no Anexo 2 são a média dos valores das triplicatas de cada amostra, com seu respectivo desvio padrão. Na Figura 15 encontram-se as concentrações de flavonoides totais segundo a média, sendo os resultados agrupados por espécie de abelha.

Figura 15 – Concentração de flavonoides totais nos EEGs: média marginal por espécie de abelha produtora.



Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Bonferroni, ao intervalo de confiança de 95%. **Fonte:** O autor, 2018.

As barras verticais no gráfico (Figura 15) representam o erro padrão sobre os teores médios de flavonoides totais reunidos por espécies de abelha nativa. Observa-se que, em relação ao teor de flavonoides totais, as amostras de geoprópolis agruparam-se em quatro conjuntos distintos. Em média, as amostras pontuais de geoprópolis produzidas pelas espécies *M. seminigra merrillae* e *M. subnitida*, apresentam as maiores concentrações de flavonoides totais entre todas as amostras testadas. Entretanto, para essas amostras houve grande dispersão entre as replicatas preparadas, o que pode ser explicado pela presença de terra na geoprópolis levando a não homogeneidade da amostra *in natura* e, portanto, a proporções variáveis de compostos solúveis em etanol. As espécies *M. asilvai*, *M. flavolineata* e *M. scutellaris* forneceram as geoprópolis com os menores teores de flavonoides totais. Quando as amostras são analisadas pontualmente (anexo 2), observa-se que os teores de flavonoides variaram de 0,24 mg/g para *Melipona scutellaris* (amostra 10) a 26,30 mg/g para *Melipona quadrifasciata* (amostra 7) (anexo 2), o que denota grande variabilidade nos teores de flavonoides nos extratos de geoprópolis. Há variabilidade quando comparadas, tanto as geoprópolis da mesma espécie coletadas em regiões diferentes, quanto as geoprópolis de espécies diferentes e mesma origem geográfica. Para verificar a hipótese

de que tanto a espécie de abelha quanto a região de coleta da geoprópolis influenciam significativamente o teor de flavonoides, os dados foram avaliados por modelos lineares generalizados (MLG). A variável dependente “teor de flavonoides totais” não apresentou normalidade nos dados e por este motivo a análise de variância ANOVA não pode ser aplicada. Foi utilizada a distribuição de probabilidade gama, com função de ligação log. O teste qui-quadrado de Wald e sua significância é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Testes de efeitos do modelo: teores de flavonoides totais.

| Fonte de variação | Tipo III | | |
|--------------------|----------------------|--------------------|----------|
| | Qui-quadrado de Wald | Graus de liberdade | <i>p</i> |
| Interseção | 173,948 | 1 | 0,000 |
| Estados | 138,860 | 14 | 0,000 |
| Espécies | 8,985 | 3 | 0,029 |
| Espécies * Estados | 57,747 | 2 | 0,000 |

Fonte: O autor, 2018.

O teste de Wald (Tabela 1) confirmou que houve diferença estatística significativa nos teores de flavonoides totais entre, pelo menos, duas espécies de abelha sem ferrão e também entre as geoprópolis produzidas, no mínimo entre dois Estados brasileiros diferentes, ao nível de significância de 0,001%. O último pode ser explicado em função das diferentes fontes vegetais que abelhas tem disponíveis em regiões geográficas diferentes.

Bankova *et al.* (1998) analisaram a composição química de amostras de geoprópolis de *M. compressipes*, *M. quadrifasciata anthidioides* e *T. clavipes*, produzidas nos estados do Paraná e do Piauí, utilizando técnicas de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). No estudo foram identificados mais de 50 compostos, e entre eles dois flavonoides: dihidroximetilflavonona e pinobanksin. Bankova *et al.* (1998) sugerem que a composição química de uma geoprópolis pode sofrer influências da origem geográfica e da espécie de abelha.

Cardozo *et al.* (2015) realizaram estudos sobre a variabilidade química de geoprópolis produzidas pelas espécies *T. angustula*, *M. quadrifasciata quadrifasciata* e *M. marginata*, na região de Prudentópolis-PR. Os autores encontraram valores para teores de flavonoides totais entre 0,30 a 2,56 mg/g nas geoprópolis de *T. angustula*, entre 0,24 e 1,73 mg/g nas geoprópolis de *M. quadrifasciata quadrifasciata* e de 1,20 a 6,57 mg/g nas geoprópolis de *M. marginata*. Os resultados obtidos por Cardozo *et al.* (2015) para *T. angustula* e *M. quadrifasciata quadrifasciata* são menores que aqueles observados neste trabalho (*vide* Anexo 2), enquanto que os resultados para *M. marginata* são maiores, como

pode ser observado por meio da Figura 15. Os autores também apontam em seu trabalho que a espécie da abelha, a época de coleta e a região onde são produzidas as geoprópolis, influenciaram de modo significativo nos teores de fenóis totais, de flavonoides e na capacidade antioxidante do material (Cardozo *et al.*, 2015). Deste modo pode-se compreender que a grande complexidade dos biomas brasileiros e a ampla difusão de espécies de abelhas nativas por todo território do Brasil, torna extremamente difícil estabelecer padrões acerca da variabilidade química da geoprópolis entre as espécies (Bankova, 2005).

Dutra *et al.* (2008) estudaram os extratos hidroalcóolicos de geoprópolis de *M. fasciculata*, produzida na região da baixada maranhense, através da cromatografia em camada delgada (CCD). Os autores verificaram a presença de diversas classes de compostos: compostos fenólicos, terpenoides e saponinas. Dutra *et al.* (2008) encontraram variações nas concentrações de flavonoides totais, de 0,60% até 2,60% (m/m) nas geoprópolis de *M. fasciculata*, e explicam que a variação nas quantidades de flavonoides totais, dentre outros constituintes químicos em própolis e geoprópolis, é justificada por causa da variedade de biomas que são visitados pelas abelhas, visto que a região da Baixada maranhense é formada por ecossistemas heterogêneos (Dutra *et al.*, 2008).

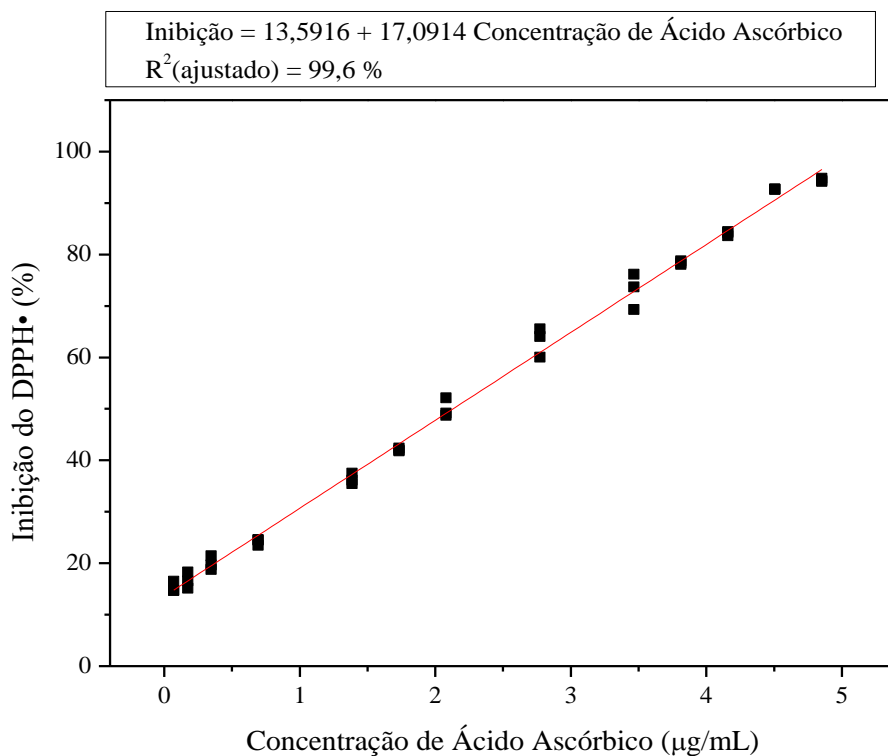
Souza *et al.* (2013) isolaram dois fenilpropanoides e sete flavonoides a partir da geoprópolis de *M. subnitida* e compostos fenólicos em geral foram encontrados em grande quantidade no material, com cerca de 64,0 mg/g (ácido gálico equivalente) em extratos etanólicos e 115,8 mg/g (ácido gálico equivalente) em extratos hidroalcóolicos. A geoprópolis de *M. seminigra merrillae* ainda carece de estudos acerca de sua composição química e propriedades farmacológicas, porém Da Silva *et al.* (2013) realizaram um estudo exploratório sobre a composição do mel produzido pela *M. seminigra merrillae*, e os autores encontraram cerca de 14 compostos fenólicos diferentes, e dentre eles foram destacados os flavonoides naringenina, luteolina e taxifolina (Souza *et al.*, 2013).

5.2 Capacidade antioxidante dos EEGs pelo método DPPH

A Figura 16 apresenta a curva analítica do padrão ácido ascórbico, construída para o estudo dos valores de VCEAC dos extratos de etanólicos de geoprópolis. Na curva estão correlacionados cada diferente concentração do padrão ácido ascórbico com o seu respectivo valor de inibição percentual do DPPH da solução de trabalho, obtido a partir do A_{final} , através da Equação 3. Para a faixa de concentrações escolhida, a correlação apresenta-se adequada ($R^2 = 99,6\%$ - Figura 16). Por meio da Equação 3 foi calculada a inibição percentual do DPPH, causada pelos antioxidantes presentes nos extratos de geoprópolis, a partir da sua

absorbância final (A_{final}) a 517 nm. Aplicando-se estes percentuais na equação da reta, obtida pela regressão linear da curva do padrão ácido ascórbico (Figura 16), calculou-se os potenciais antioxidantes de cada um dos extratos etanólicos de geoprópolis, em mg de vitamina C equivalente/g de geoprópolis *in natura*. Os resultados referentes a estes teores estão discriminados no Anexo 3.

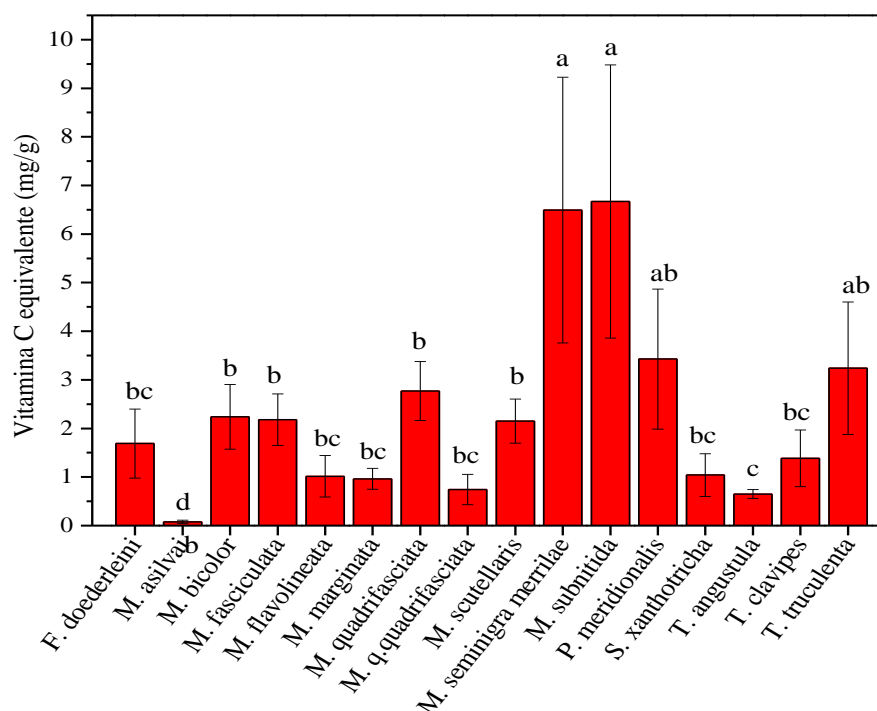
Figura 16 – Curva analítica para determinação do potencial antioxidante dos EEGs



Fonte: O autor, 2018.

Na Figura 17 está representada a capacidade antioxidante dos extratos em função das concentrações de vitamina C equivalente por grama de geoprópolis *in natura*. Os resultados para os extratos de geoprópolis foram reunidos por espécie de abelha produtora.

Figura 17 – Capacidade dos EEGs para a inibição do radical estável DPPH, expressa em vitamina C equivalente: média por espécie de abelha produtora.



*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Bonferroni, ao intervalo de confiança de 95%. **Fonte:** O autor, 2018.

As barras verticais sobre o gráfico (Figura 17) representam o erro padrão para os teores de vitamina C equivalente, encontrados pelo método de inibição do radical estável DPPH, entre as espécies estudadas. Observa-se que as espécies *M. seminigra merrillae* e *M. subnitida* apresentaram os maiores valores para capacidade antioxidante, porém apresentaram grande dispersão entre as replicatas verdadeiras dos extratos. No momento das análises, dispunha-se de apenas uma única amostra de geoprópolis destas espécies, e se entende que as variações observadas podem ser devidas à falta de homogeneidade natural da geoprópolis, que normalmente contém porções elevadas de partes de solo, naturalmente mais pobres em compostos orgânicos. Isto pode produzir extratos com quantidades variáveis de compostos bioativos, para uma mesma amostra de geoprópolis.

O conjunto de dados para capacidade antioxidante DPPH não apresentou normalidade dos dados, por este motivo foi analisada por MLG, assim como a variável teores de flavonoides totais. A distribuição de probabilidade utilizada foi a gama, com função de ligação log. O teste qui-quadrado de Wald e a significância do modelo são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Testes de efeitos de modelo: capacidade antioxidante pelo método DPPH.

| Fonte de variação | Tipo III | | |
|-------------------|----------------------|--------------------|----------|
| | Qui-quadrado de Wald | Graus de liberdade | <i>p</i> |
| Interseção | 5926,374 | 1 | 0,000 |
| Espécie | 132,607 | 14 | 0,000 |
| Estado | 10,915 | 3 | 0,012 |
| Espécie * Estado | 57,747 | 2 | 0,000 |

Fonte: O autor, 2018.

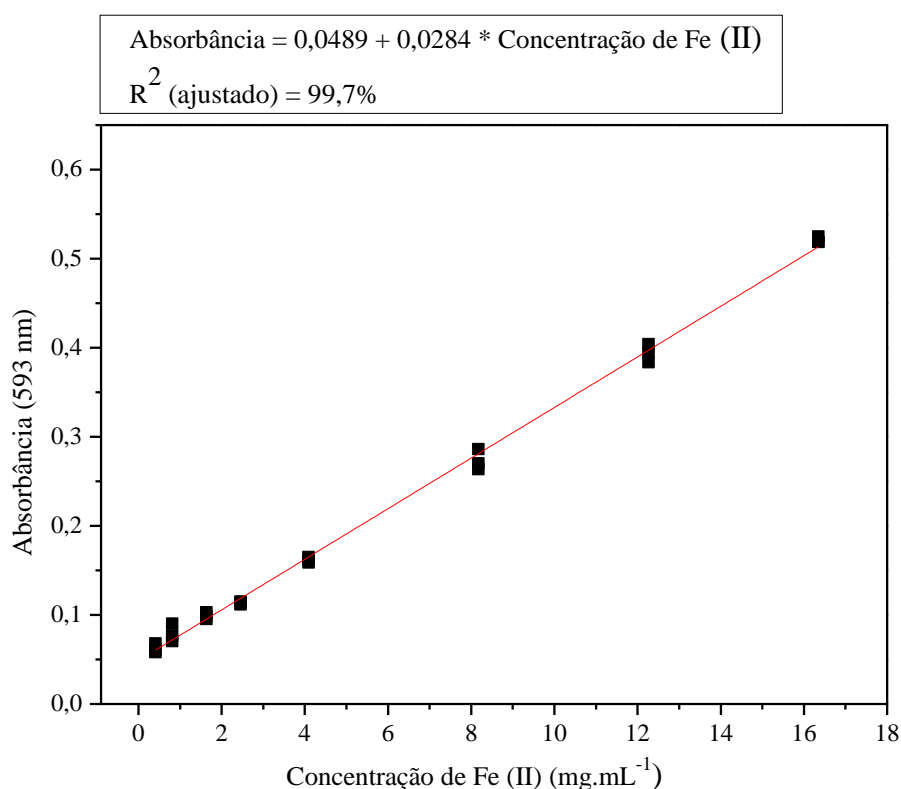
Da mesma forma como foi observado para o teor de flavonoides totais dos EEGs, o teste de Wald (Tabela 2) mostrou que houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) para a capacidade antioxidante por DPPH entre pelo menos duas espécies de abelha sem ferrão e entre pelos dois estados brasileiros. A influência desses fatores, espécie de abelha e origem geográfica, na capacidade antioxidante das geoprópolis está diretamente relacionada a seu efeito na composição química dos extratos. Ou seja, a coleta de resinas com origens botânicas diferentes afeta a variabilidade química qualitativa e quantitativa dos extratos e portanto, a potencia de suas atividades farmacológicas.

Entre os compostos isolados a partir da geoprópolis de *M. subnitida* por Souza *et al.* (2013), os autores destacaram que o flavonoide 3-*O*-metil-quercetina, um potente antioxidante (Yoo *et al.*, 2005), é encontrado em abundância na geoprópolis desta espécie (Souza *et al.*, 2013), além dos outros vários compostos fenólicos identificados (fenilpropanoides e flavonoides) que também apresentam capacidade antioxidante. Sousa *et al.* (2015) empregaram o ensaio DPPH, utilizando ácido ascórbico como padrão, na determinação das atividades antirradicalares da geoprópolis de *M. subnitida*. Os autores constataram uma forte capacidade antioxidante no extrato etanólico da geoprópolis de *M. subnitida*, que apresentou quase o dobro da eficiência antirradicalar, em valores de IC₅₀, quando comparada ao ácido ascórbico no mesmo estudo. Em estudo sobre as propriedades antioxidantes de amostras de méis produzidos pela *M. seminigra merrillae*, Da Silva *et al.* (2013) destacaram entre os compostos encontrados, o flavonoide taxifolina (*trans*-dihidroquercitina), que é potente agente antioxidante. Segundo os autores, esta é a primeira vez que este composto é reportado em méis produzidos por abelhas sem ferrão.

5.3 Capacidade antioxidante dos EEGs pelo método FRAP

A Figura 18 apresenta a curva analítica do complexo TPTZ- Fe^{2+} construída para quantificar o potencial redutivo dos EEGs em valores de Fe^{2+} equivalente. Para a faixa de concentrações escolhida, o coeficiente de correlação entre a concentração do padrão Fe^{2+} e a absorbância medida a 593 nm, apresenta-se adequado ($R^2 = 99,6\%$ - Figura 11).

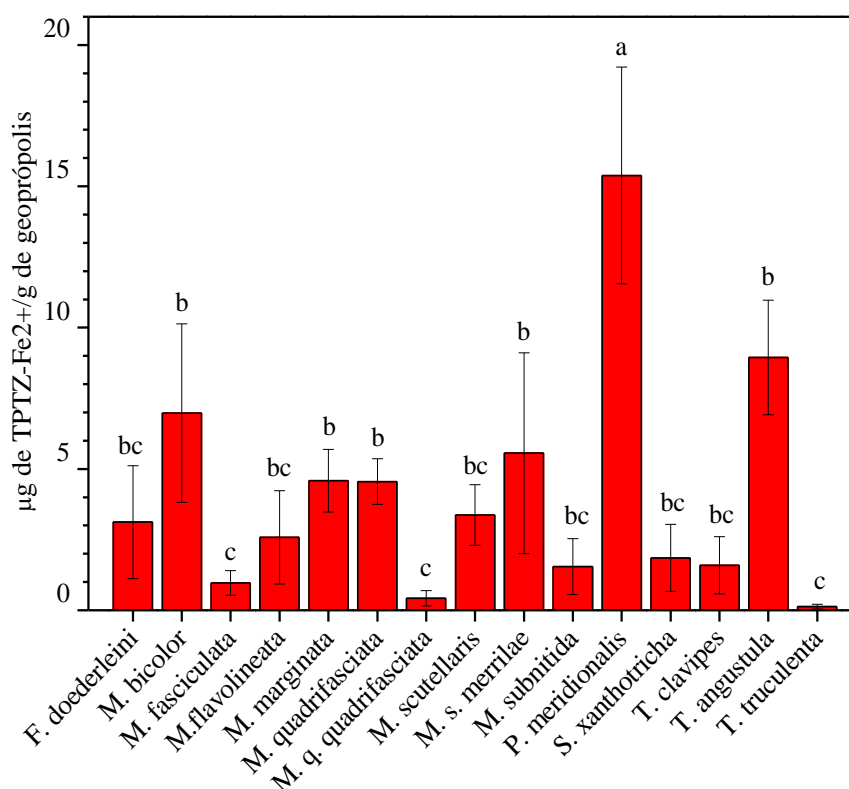
Figura 18 – Curva analítica para determinação da concentração do complexo $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ produzido pela redução de TPTZ- Fe^{3+} pelos antioxidantes presentes nos EEGs.



Fonte: O autor, 2018.

No Anexo 4 encontram-se os valores médios obtidos pelo ensaio FRAP, expressos em μg de Fe^{2+}/g de geoprópolis *in natura*. A figura 12 apresentas as médias marginais por espécie de abelha produtora.

Figura 19 – Capacidade antioxidante dos EEGs expressa em μg de Fe^{2+}/g de geoprópolis: média por espécie de abelha produtora.



*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Bonferroni, ao intervalo de confiança de 95%. **Fonte:** O autor, 2018.

As barras verticais sobre o gráfico (Figura 19) representam o erro padrão para os teores de Fe^{2+} equivalente, encontrados pelo método de redução do íon férrico (FRAP), entre as espécies estudadas. Observa-se que para algumas espécies os teores de Fe^{2+} equivalente foram altos, demonstrando algumas variações de resultados entre diferentes espécies. Por meio da Figura 19, pode-se observar que os resultados apresentados para o ensaio FRAP foram ligeiramente diferentes daqueles apresentados até agora. Desta vez a geoprópolis produzida pela espécie *Plebeia meridionalis*, se destacou das demais, apresentando o maior potencial antioxidante pelo método FRAP. A geoprópolis de *M. asilvai* apresentou resultados abaixo do detectável e por isso não foi representada na Figura 19. As geoprópolis que apresentaram os menores potenciais antioxidantes através do método FRAP foram a *M. fasciculata*, *T. truculenta* e *M. quadrifasciata quadrifasciata*, sendo que esta última é uma subespécie da *M. quadrifasciata*, porém as duas espécies distinguem-se em muito para este ensaio antioxidante, mas seguindo uma tendência já observada no ensaio DPPH.

A geoprópolis da espécie *M. asilvai* foi a única, entre todas as espécies testadas durante o ensaio FRAP, que não apresentou resultados acima do limite de detecção da curva

de Fe^{2+} , para determinação da capacidade antioxidante. Esta espécie ainda necessita de mais estudos prospectivos sobre a composição e atividade da sua geoprópolis. Duarte *et al.* (2008) estudaram aspectos da composição química e capacidade antioxidante de méis e pólen produzidas por várias espécies de abelhas sem ferrão: *Frieseomelitta varia*, *M. asilvai*, *M. quadrifasciata anthidioides*, *M. scutellaris*, *M. subnitida*, *Plebeia* sp. e *T. clavipes*. Os autores observaram que os menores teores de fenólicos e flavonoides totais pertenciam ao mel e ao pólen da *M. asilvai*: 32,0 mg/g (ácido gálico equivalente) e 8,0 mg/g (quercetina equivalente) respectivamente para o mel; 6,9 mg/g (ácido gálico equivalente) e 0,3 mg/g (quercetina equivalente) para o pólen. O mel e o pólen de *M. asilvai* também apresentou os menores resultados, quando foram testados os seus poderes antioxidantes, pelos métodos FRAP e DPPH. Os produtos das espécies *Plebeia* sp. e *T. clavipes*, apresentaram os maiores potenciais para atividades antioxidantes, pelos métodos FRAP e DPPH, também apresentaram os maiores valores para fenólicos e flavonoides totais: acima de 100 mg/g (ácido gálico equivalente) e 50 mg/g (quercetina equivalente) respectivamente para o mel e, acima de 20 mg/g (ácido gálico equivalente) e 12 mg/g (quercetina equivalente) respectivamente para pólen (Duarte *et al.*, 2008).

A capacidade antioxidante, pelo método FRAP, não apresentou normalidade nos dados e por este motivo foi analisada por modelos lineares generalizados (MLG). A distribuição de probabilidade utilizada foi gama com função de ligação log. O teste qui-quadrado de Wald e a significância do modelo são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Testes de efeitos do modelo: capacidade antioxidante pelo método FRAP.

| Fonte de variação | Tipo III | | |
|-------------------|----------------------|--------------------|----------|
| | Qui-quadrado de Wald | Graus de liberdade | <i>p</i> |
| Interseção | 0,396 | 1 | 0,529 |
| Espécie | 138,205 | 14 | 0,000 |
| Estado | 46,002 | 3 | 0,000 |
| Espécie * Estado | 9,726 | 2 | 0,008 |

Fonte: O autor, 2018.

O teste de Wald (Tabela 3) para a variável FRAP mostrou que houve diferença estatística significativa entre pelos menos duas espécies de abelhas sem ferrão, bem como, entre pelo menos dois estados brasileiros ($p < 0,05$). Esse resultado confirma que a composição química e capacidade antioxidante de geoprópolis são influenciadas pelos fatores espécie de abelha e origem geográfica das amostras.

No entanto essas variáveis não são as únicas a influenciar a composição química e atividade farmacológica de geoprópolis. Uma vez que a geoprópolis é elaborada pelas abelhas a partir de resinas coletadas de plantas que circundam as colmeias, qualquer fator que afete a produção de metabólitos secundários nas plantas pode indiretamente afetar a composição química da geoprópolis. Podem-se mencionar, por exemplo, etapa de desenvolvimento da planta, tipo e nutrientes no solo, sazonalidade, condições meteorológicas específicas, como índice pluviométrico, incidência de radiação ultravioleta, etc (Gobbo-Neto e Lopes, 2007).

5.4 Correlações entre os teores de flavonoides e capacidade antioxidante de geoprópolis de abelhas sem ferrão

Pode-se observar uma correlação linear significativa moderada entre os teores de flavonoides totais e a capacidade antioxidante de geoprópolis, determinada pelo método DPPH, com $r > 0,6$ ($p = 2,38 \times 10^{-17}$). No entanto, não foi encontrada correlação entre os teores de flavonoides totais e capacidade antioxidante por meio da redução do íon férrico (FRAP) ($r < 0,3$ e $p = 0,052$) ou entre os resultados dos testes antioxidantes FRAP e DPPH ($r < 0,1$ e $p = 0,22$). Segundo Appolinario (2006), valores para o coeficiente de correlação de Pearson (r) entre 0,01 até 0,10 demonstram uma correlação fraquíssima ou mesmo nula; valores entre 0,11 até 0,30, correlação fraca; entre 0,31 até 0,59, correlação moderada; e de 0,60 até 0,80, uma correlação forte (Appolinário, 2006).

A correlação linear moderada entre os resultados de teores de flavonoides totais e a capacidade antioxidante pelo método do DPPH, indica que a concentração e o tipo de flavonoides nos extratos de geoprópolis contribuem, ao menos em parte, para a capacidade antioxidante dos extratos. Outras classes de compostos químicos naturalmente presentes em geoprópolis tem sido relatada como compostos antirradicais: Dutra *et al.* (2014) destacam os compostos da classe dos elagitaninos entre os principais promotores da capacidade antioxidante da geoprópolis de *Melipona fasciculata*. Estes compostos fenólicos de alta massa molecular, caracterizados pela presença de muitos grupos de hidroxilas catecólicas, demonstram grande capacidade antioxidante (Dutra *et al.*, 2014). Batista *et al.* (2016) sugerem que as geoprópolis com a presença de ácidos fenólicos (ácido gálico e ácido elágico) em sua composição, tem uma maior capacidade antioxidante.

O fato de não existir correlação entre os resultados dos ensaios antioxidantes FRAP e DPPH pode ser explicado pela ação de diversos fatores. Em primeiro lugar, o fato dos ensaios se basearem em mecanismos de reação distintos, logo que utilizam oxidantes

diferentes: o radical estável DPPH e o íon férrico (Fe^{3+}). O ensaio utilizando DPPH é realizado em meio a solvente orgânico, em condições de pH neutro e temperatura ambiente, enquanto o ensaio FRAP ocorre em solução hidroalcoólica, em pH 3,6 e sob o aquecimento moderado da mistura reacional. Deve-se ressaltar que a presença de ácidos ou bases na mistura reacional altera o equilíbrio de dissociação de substâncias de natureza fenólica e com isso podem haver alterações no poder antioxidante dos mesmos (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006). Adicionalmente, os ensaios utilizando DPPH são mais adequados para avaliar a capacidade antioxidante de compostos lipofílicos, enquanto o ensaio FRAP funciona melhor para compostos hidrofílicos. Para expressar a capacidade antioxidante total de extratos naturais é importante que a mesma seja avaliada através de métodos aplicáveis tanto para antioxidantes lipofílicos quanto hidrofílicos, uma vez que extratos naturais são constituídos por misturas complexas de substâncias de variadas propriedades físico-químicas (Karadag *et al.*, 2009).

A redução do radical estável DPPH ocorre preferencialmente pela transferência de um átomo de hidrogênio (Brand-Williams *et al.*, 1995), embora já tenham surgido evidências de que pode ocorrer, primeiramente, uma transferência rápida de um elétron, seguido da transferência de um próton, a partir das substâncias antioxidantes (Huang *et al.*, 2005; MacDonald-Wicks *et al.*, 2006). De outro modo, a redução do complexo $[\text{Fe(III)-TPTZ}_2]^{3+}$, no ensaio FRAP, ocorre por meio da ação de antioxidantes doadores de elétrons e não detecta compostos antioxidantes que atuem por meio do sequestro de radicais livres, através da transferência de hidrogênio. Também é válido ressaltar que qualquer substância doadora de elétrons, mesmo que não possua propriedades antioxidantes e com potencial redox menor que o do par $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, pode contribuir para os valores obtidos pelo ensaio FRAP (Nilsson *et al.*, 2005). Dessa forma, a não correspondência entre os resultados dos ensaios DPPH e FRAP pode ser explicada diante de tais proposições.

Em adição aos aspectos supracitados, deve-se também considerar que a geoprópolis é um produto natural, que contém compostos orgânicos de várias classes químicas tais como flavonoides (Souza *et al.*, 2013), ácidos fenólicos (Silva *et al.*, 2013), taninos (Dutra *et al.*, 2014), terpenoides (Torres-González *et al.*, 2016), saponinas (Dutra *et al.*, 2008), ácidos aromáticos (Santos *et al.*, 2017), esteroides e ácidos graxos (Batista *et al.*, 2016). Assim sendo, sua capacidade antioxidante pode ser devida à ação individual de alguns componentes destas classes, que podem ser mais ou menos ativos a depender do tipo de ensaio antioxidante, bem como também das condições em que é realizado (solvente, temperatura,

pH, etc) ou ainda a atividade pode ser resultado de um efeito sinérgico entre os vários compostos bioativos presentes naturalmente na geoprópolis.

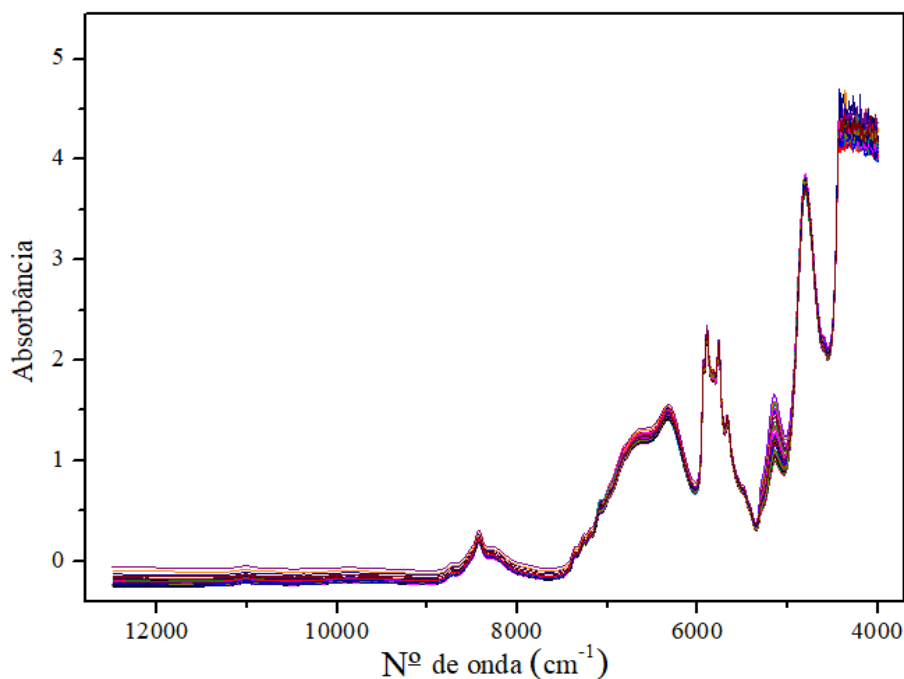
Rácz *et al.* (2015) avaliaram sete ensaios antioxidantes diferentes, aplicados a diferentes formas de extratos de frutas, com o objetivo de compará-los e classificá-los utilizando vários métodos estatísticos para isso. Os autores concluíram que existem diferenças fundamentais entre os ensaios antirradicais realizados em meios hidroalcológicos (dentre os testados, FRAP) e os ensaios realizados em meios orgânicos (método por inibição do radical estável DPPH). O ensaio FRAP foi o que obteve melhores resultados para amostras com maior caráter hidrofílico, enquanto que ensaios envolvendo DPPH foram mais bem-sucedidos para amostras solúveis em álcool. Segundo Rácz *et al.* (2015), isto pode estar baseado nas diferenças entre os mecanismos de reação, pelos quais normalmente acredita-se que funcionam estes métodos.

Ainda o fato de não haver correlação entre os teores de flavonoides totais e o ensaio FRAP, indica que os compostos redutores de ferro, presentes na geoprópolis, possivelmente não sejam necessariamente da classe dos flavonoides.

5.5 Espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) para os EEGs

Na região do infravermelho próximo ocorre a absorção de *overtones* (vibrações fundamentais de estiramento entre os átomos das moléculas) e os espectros dependem das características físicas e composição química das substâncias presentes nas amostras. (Skoog *et al.*, 2007). Os *overtones* no NIRS são formados por bandas de combinação, que são excitações dos elétrons aos níveis de energia maiores (Siesler *et al.*, 2008).

Figura 20 – Sobreposição dos espectros NIR dos EEGs.



Fonte: O autor, 2018.

Observando a sobreposição dos espectros de NIR dos EEGs (Figura 20), é possível observar que há um perfil espectral similar entre as amostras, com bandas de absorção nas faixas de 8000 – 9000; 6000 – 7500; 5400 – 6000; 5000 – 5400; 4500 – 5000; cm^{-1} , diferindo apenas em suas intensidades. As bandas entre 5400 até 6000 cm^{-1} provavelmente correspondem a 1ª *overtone* da ligação C-H, enquanto a banda que compreende a faixa entre 8000 a 9000 cm^{-1} representa caracteristicamente a 2ª *overtone* de C-H. A faixa entre 5000 cm^{-1} e 5400 cm^{-1} apresenta as combinações de O-H (Stuart, 2005).

5.6 Desenvolvimento de modelos de calibração e validação

Para o desenvolvimento dos modelos foi utilizado o software Chemostat® V2, alimentado com o conjunto de dados obtidos por meio das análises dos métodos de referência: teores de flavonoides totais e capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP. Dois modelos de regressão PLS foram construídos para cada um dos métodos de referência, um associando as respostas aos espectros NIR e o outro aos dados de MIA, totalizando assim seis modelos. Na construção dos modelos alguns valores extremos foram observados e indicados através do software. Em geral todos os modelos apresentaram valores extremos, porém nem todos foram descartados, pois em alguns casos os elevados números de descarte geram modelos tendenciosos com pouca validade.

5.6.1 Desenvolvimento de modelos de regressão por PLS para NIR

Nesse trabalho foi investigado se é possível estimar o teor de flavonoides totais e a capacidade antioxidante dos EEGs a partir da simples obtenção de espectros NIR associados a ferramentas de regressão por PLS. Para elaboração dos primeiros modelos de regressão por PLS utilizou-se por padrão o sinal de absorvância do espectro de NIR na faixa entre 7618 – 4444 cm^{-1} . O número de variáveis latentes foi escolhido visando sempre diminuir ao máximo os valores apresentados para RMSEC, RMSECV e RMSEP, porém sem comprometer os coeficientes de determinação (R^2), dos modelos de predição e validação.

Modelos gerados para investigar a aplicação dos espectros NIR na estimativa do teor de flavonoides totais dos EEGs

O modelo de regressão PLS para predição de valores de flavonoides totais, utilizando NIR, foi construído com cinco variáveis latentes. A Tabela 4 apresenta os principais dados obtidos para o modelo de calibração, para a estimativa de teores de flavonoides totais, utilizando dados espectrais de NIR:

Tabela 4 – Parâmetros de correlação do modelo NIR-Flavonoides.

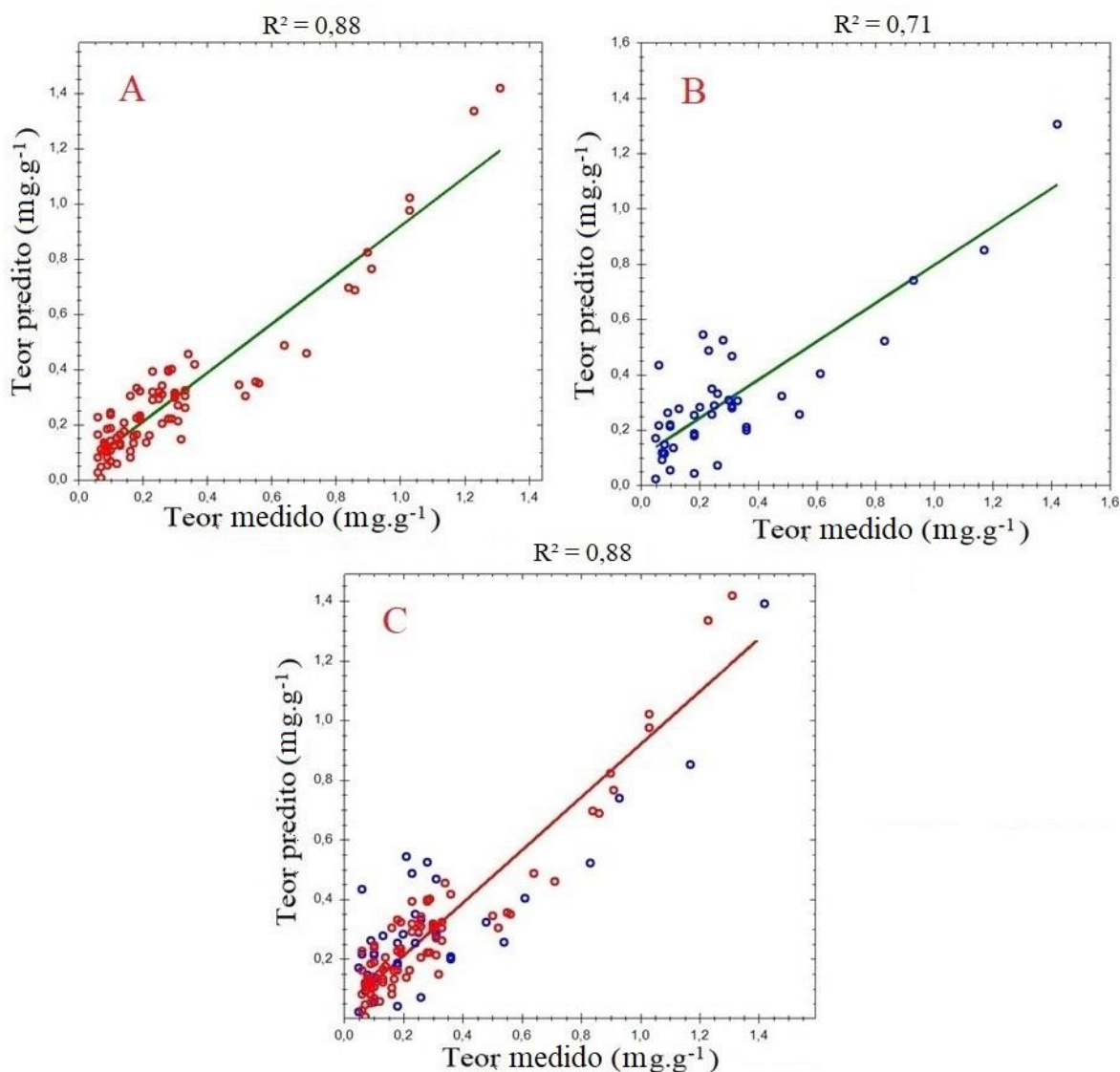
| Calibração | | | Validação | |
|------------|---------------------------|----------------------------|-----------|---------------------------|
| R^2 | RMSEC ($\mu\text{g/g}$) | RMSECV ($\mu\text{g/g}$) | R^2 | RMSEP ($\mu\text{g/g}$) |
| 0,8845 | 0,09 | 0,20 | 0,7068 | 0,16 |

Fonte: O autor, 2018.

Pode-se observar que o coeficiente de determinação (R^2), para a modelagem de flavonoides totais por PLS pode ser considerado adequado, quando comparado com dados da literatura e pelos valores de RMSECV e RMSEP apresentados na Tabela 4. Segundo Elfadl *et al.* (2010), modelos de regressão por PLS associado a dados espectrais de NIR, com valores de R^2 maiores que 0,83, podem ser considerados como tendo boa capacidade de predição. Logo, o modelo gerado para os teores de flavonoides totais em geoprópolis possui boa capacidade preditiva. Ainda, para calibração multivariada ideal, deve-se buscar principalmente a minimização do valor do erro REMSECV (Sinelli *et al.*, 2008).

A Figura 21 traz a representação da curva obtida pela regressão linear entre os teores de flavonoides totais medidos experimentalmente e os teores previstos por meio dos espectros de NIR dos EEGs.

Figura 21 – Modelos NIR-flavonoides; modelo de calibração (18a); modelo de validação (18b); calibração + validação (18c).



Fonte: O autor, 2018.

Modelos gerados para avaliar a correlação entre a espectroscopia NIR e a capacidade antioxidante dos EEGs determinada pelo método do DPPH

A tabela 5 apresenta os parâmetros de mérito para modelos de calibração e validação, da capacidade antioxidante pela metodologia de redução do radical estável DPPH, com dados dos espectros NIR.

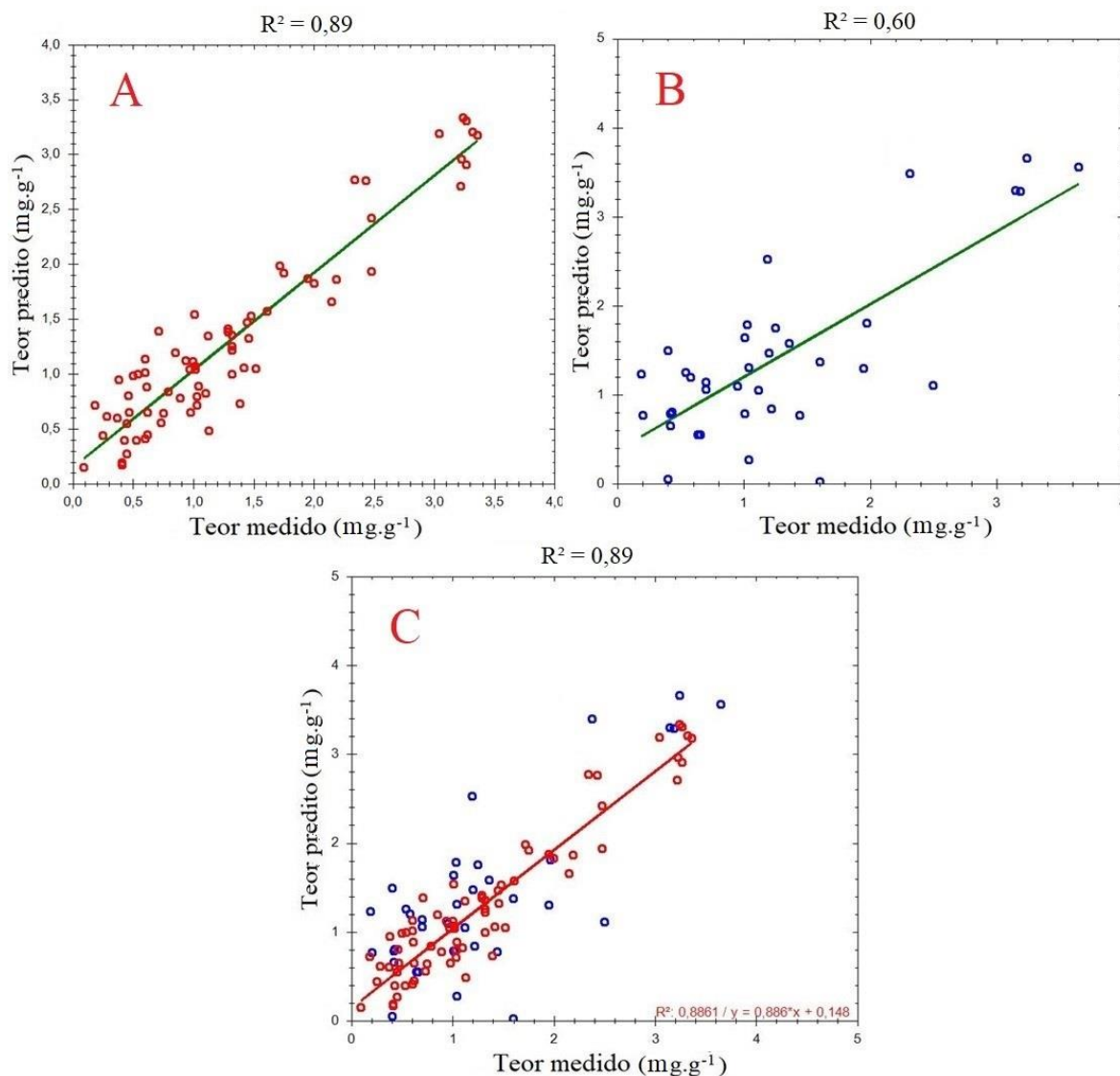
Tabela 5 – Parâmetros de correlação do modelo NIR-DPPH.

| Calibração | | | Validação | |
|----------------|--------------|---------------|----------------|--------------|
| R ² | RMSEC (µg/g) | RMSECV (µg/g) | R ² | RMSEP (µg/g) |
| 0,8923 | 0,30 | 0,82 | 0,6011 | 0,67 |

Fonte: O autor, 2018.

Os modelos NIR-DPPH foram construídos com 14 variáveis latentes. Na figura 22 está representada a curva obtida pela regressão linear entre os teores de flavonoides totais medidos experimentalmente e os teores previstos por meio dos espectros de NIR dos EEGs.

Figura 22 – Modelos NIR-DPPH: modelo de calibração (19a); modelo de validação (19b); calibração + validação (19c).



Fonte: O autor, 2018.

Para este modelo observa-se uma boa correlação entre os valores preditos e os medidos experimentalmente. Quando comparados com os dados do modelo anterior (NIR-flavonoides), os valores de R^2 (calibração), R^2 (validação), RMSEC, RMSECV e RMSEP apresentam-se um pouco elevados, entretanto podem ser considerados como sendo ótimos, revelando um modelo capaz de prever, com elevada exatidão, os valores de capacidade antioxidante dos EEGs.

Modelos gerados para avaliar a correlação entre a espectroscopia NIR e a estimativa da capacidade antioxidante dos EEGs determinada pelo ensaio FRAP

Na tabela 6 são apresentados os parâmetros de mérito para a modelagem de regressão PLS desenvolvido com os valores das capacidades antioxidantes dos EEGs, pelo método FRAP, construído com 12 variáveis latentes:

Tabela 6 – Parâmetros de correlação do modelo NIR-FRAP.

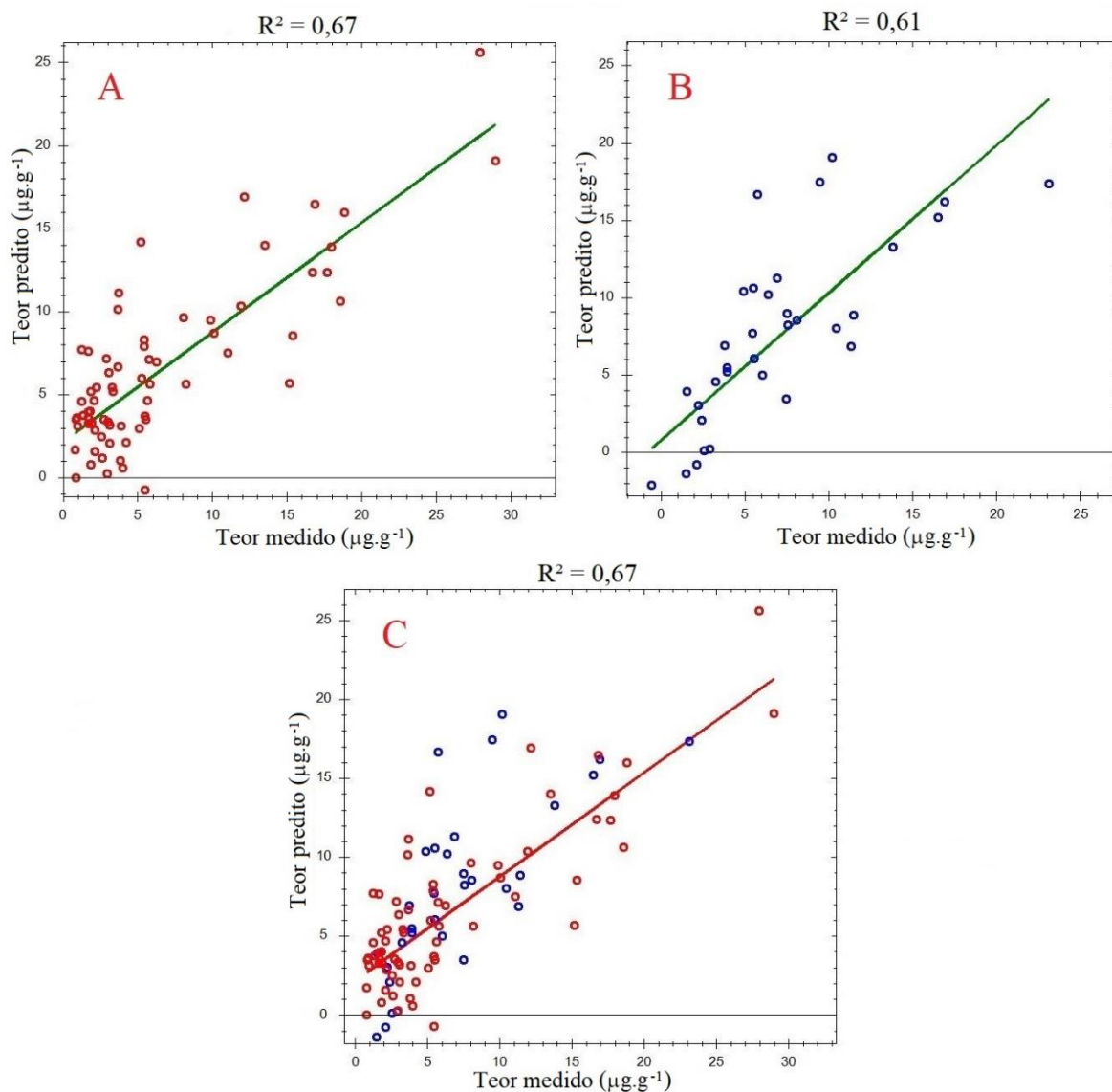
| Calibração | | | Validação | |
|----------------|--------------|---------------|----------------|--------------|
| R ² | RMSEC (µg/g) | RMSECV (µg/g) | R ² | RMSEP (µg/g) |
| 0,6794 | 3,68 | 8,56 | 0,6153 | 3,97 |

Fonte: O autor, 2018.

Embora os modelos de regressão PLS NIR-FRAP apresentem valores de **R²** menores, quando comparado aos outros modelos elaborados, o **R²** ainda pode ser considerado adequado (Wang *et al.*, 2017), indicando que pode haver correlação positiva entre os resultados experimentais e os dados preditos pelo modelo de regressão. O modelo mesmo apresentando-se com coeficientes de determinação menores que os outros modelos anteriores (flavonoides totais e DPPH), ainda assim apresenta valores para RMSEC, RMSECV e RMSEP dentro da faixa considerada regular, segundo dados da literatura.

Na figura 23 está representada a curva obtida pela regressão linear entre os valores medidos experimentalmente para capacidade antioxidante (método DPPH) e os teores previstos, por meio dos espectros de NIR dos EEGs.

Figura 23 – Modelos NIR-FRAP: modelo de calibração (20a); modelo de validação (20b); calibração + validação (20c).



Fonte: O autor, 2018.

O que pode ter contribuído para esse resultado, é o fato de que o ensaio FRAP é mais eficiente para medir a capacidade antioxidante de compostos hidrossolúveis, e sendo que os extratos de geoprópolis em sua maioria apresentam baixa solubilidade em água, estes por sua vez não puderam ser detectados com tanta proeminência como fora observado nos outros ensaios.

5.6.2 MIA dos EEGs aplicada na regressão PLS

Por meio da ferramenta de regressão por PLS (descrita no item 4.8.4), as cores dos extratos foram correlacionadas às variáveis de interesse: teor de flavonoides totais e capacidade antioxidante pelo método DPPH e poder de redução do Fe^{3+} (FRAP).

Foram empregados os mesmos parâmetros de qualidade utilizados para os modelos com NIR.

Modelos gerados para correlacionar o padrão de imagens e o teor de flavonoides totais dos extratos EEGs

Para o modelo de regressão por PLS para teores de flavonoides totais associado aos dados de MIA das imagens dos EEGs, obteve-se o valor de $R^2 = 0,91$ (Tabela 7), com 4 variáveis latentes, o que indica tratar-se de um modelo robusto, com alta correlação entre os valores medidos e os preditos. Os valores encontrados para RMSEC e RMSECV do modelo apresentam-se de acordo com o que a literatura cita como adequados segundo Elfadl *et al.* (2010) e Kumar *et al.* (2015).

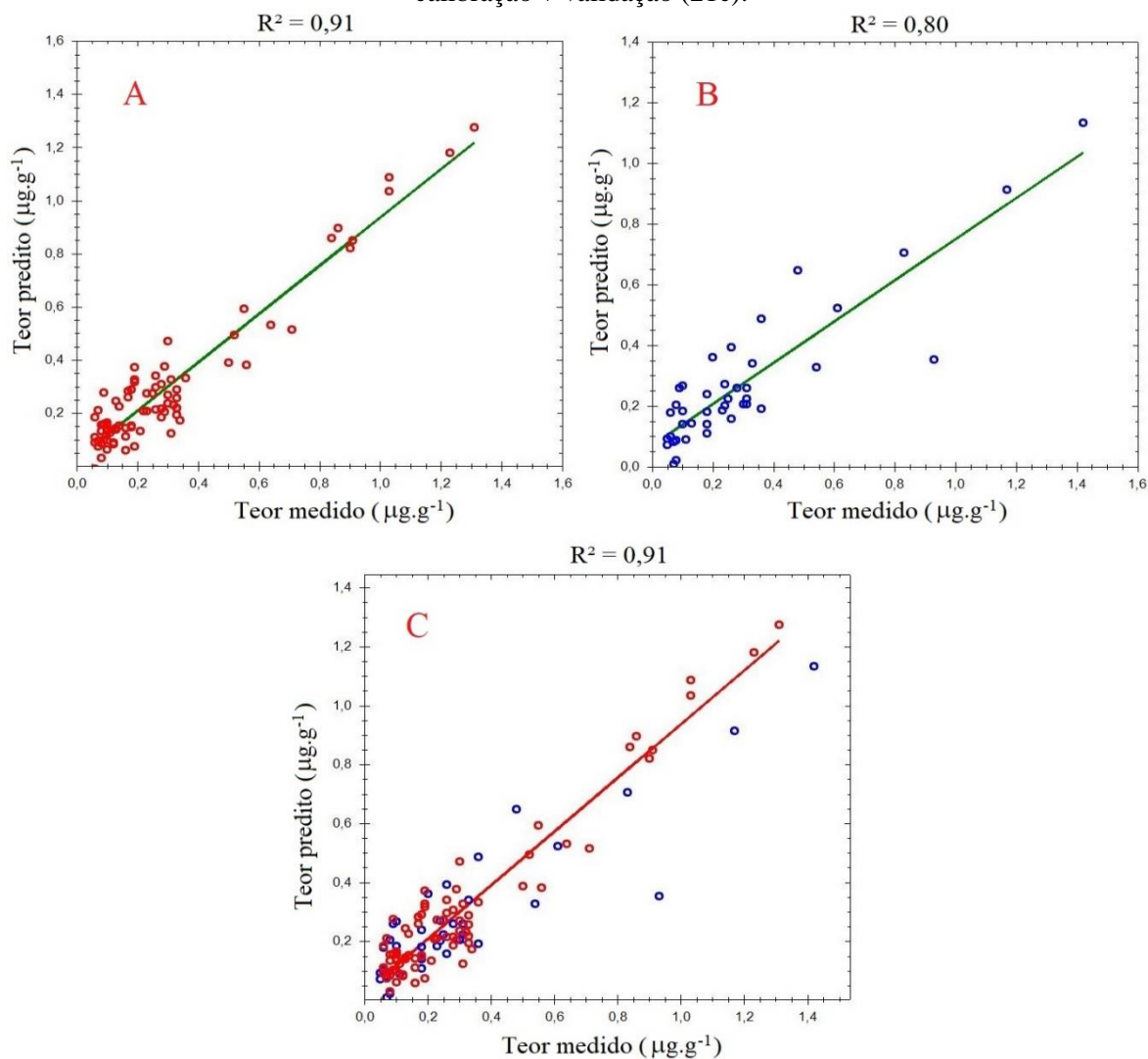
Tabela 7 – Parâmetros de correlação do modelo MIA-Flavonoides.

| Calibração | | | Validação | |
|------------|---------------------------|----------------------------|-----------|---------------------------|
| R^2 | RMSEC ($\mu\text{g/g}$) | RMSECV ($\mu\text{g/g}$) | R^2 | RMSEP ($\mu\text{g/g}$) |
| 0,9105 | 0,08 | 0,14 | 0,8011 | 0,14 |

Fonte: O autor, 2018.

A curva de calibração estabelecida pelo modelo (Figura 24) demonstra um aspecto de baixa dispersão dos valores, o que reforça a capacidade do modelo em prever valores para teores de flavonoides totais nos extratos de geoprópolis a partir da análise de sua cor.

Figura 24 – Modelos MIA-flavonoides: modelo de calibração (21a); modelo de validação (21b); calibração + validação (21c).



Fonte: O autor, 2018.

Modelos gerados para avaliar a correlação entre MIA das imagens e a capacidade antioxidante dos EEGs determinada pelo método do DPPH

O modelo de regressão por PLS para capacidade antioxidante, medida em teores de vitamina C equivalente, através do método DPPH, apresentou parâmetros característicos de modelos que possuem robustez e boa capacidade de predição (Tabela 8): R^2 acima de 0,85 e valor para o RMSECV abaixo de 1,20 unidades de medida. O modelo foi construído a partir de 6 variáveis latentes.

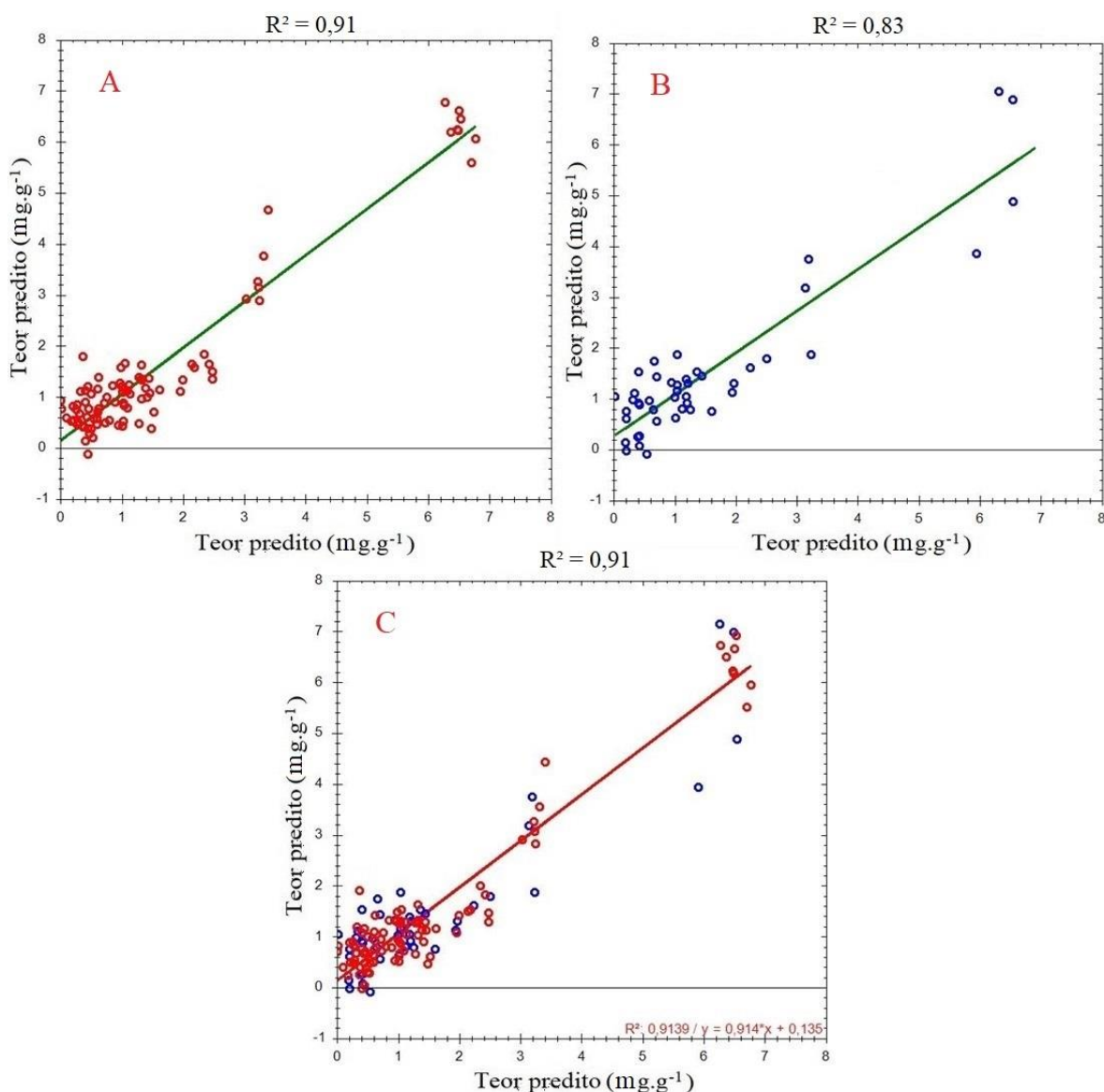
Tabela 8 – Parâmetros de correlação do modelo MIA-DPPH

| Calibração | | | Validação | |
|----------------|--------------|---------------|----------------|--------------|
| R ² | RMSEC (µg/g) | RMSECV (µg/g) | R ² | RMSEP (µg/g) |
| 0,9085 | 0,53 | 1,05 | 0,8252 | 0,71 |

Fonte: O autor, 2018.

Observando-se os modelos de validação e calibração (Figura 25), pode-se notar alguns poucos pontos de valores preditos dispersos. Foram removidos do modelo algumas amostras que se apresentaram valores identificados como extremos, o que reduziu principalmente os valores do RMSECV e RMSEP, melhorando os modelos.

Figura 25 – Modelos MIA-DPPH: modelo de calibração (22a); modelo de validação (22b); calibração + validação (22c).



Fonte: O autor, 2018.

Modelos gerados para avaliar a correlação entre MIA das imagens e a capacidade antioxidante dos EEGs determinada pelo ensaio FRAP

O modelo construído com as imagens para o ensaio FRAP apresenta R^2 (calibração) = 0,74 e R^2 (validação) = 0,69, que podem ser considerados adequados para este tipo de matriz. O modelo foi elaborado com 8 variáveis latentes. Apresenta erros de calibração (RMSEC) e validação cruzada (RMSECV) ligeiramente altos, como mostra a Tabela 9, demonstrando assim uma certa debilidade na capacidade de predição do modelo, quando é comparado aos outros modelos anteriormente desenvolvidos. Este modelo, porém, não deve ser descartado, pois ainda apresenta valores para erros que podem ser considerados intermediários ou mesmo medianos.

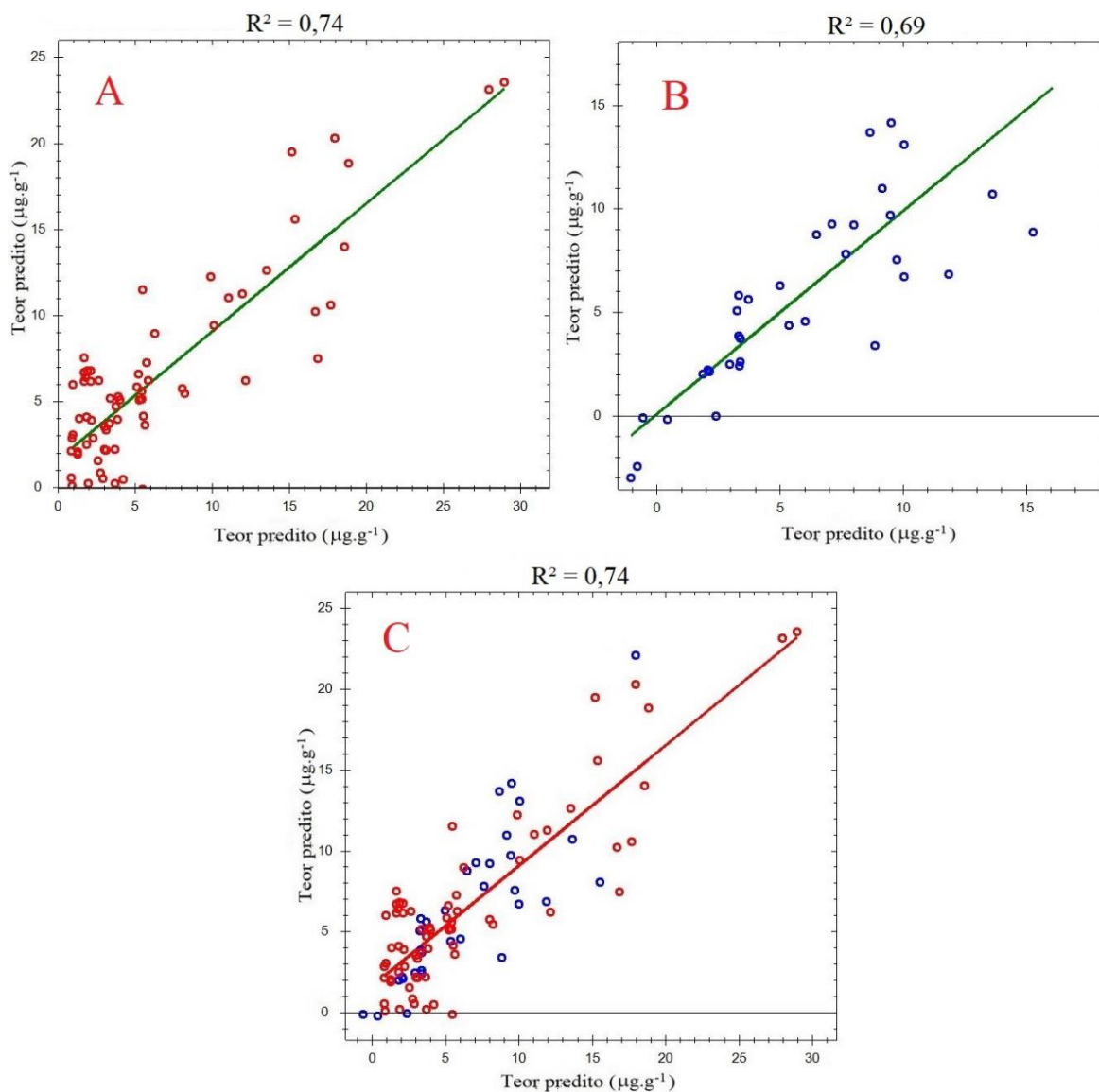
Tabela 9 – Parâmetros de correlação do modelo MIA-FRAP

| Calibração | | | Validação | |
|------------|---------------------------|----------------------------|-----------|---------------------------|
| R^2 | RMSEC ($\mu\text{g/g}$) | RMSECV ($\mu\text{g/g}$) | R^2 | RMSEP ($\mu\text{g/g}$) |
| 0,7438 | 3,19 | 8,55 | 0,6906 | 2,88 |

Fonte: O autor, 2018.

Ainda que o modelo de regressão por PLS para teores de Fe^{2+} equivalente nos EEGs aparentemente não apresente uma boa robustez, pode-se observar pela Figura 26 uma tendência linear do modelo, com pouca dispersão de valores, porém é necessário identificar e descartar mais valores extremos e testar pré-tratamentos de dados no conjunto, visando diminuir os erros do modelo.

Figura 26 – Modelos MIA-FRAP. Modelo de calibração (23a). Modelo de validação (23b). Calibração + validação (23c).



Fonte: O autor, 2018.

5.6.3 Considerações sobre os modelos construídos

Segundo os parâmetros encontrados na literatura, pode-se observar que os modelos de calibração desenvolvidos, exibidos nos itens 5.6.1 e 5.6.2, apresentam valores adequados para R^2 (validação) e R^2 (calibração) e para os erros residuais dos dados de calibração (RMSEC) e validação cruzada (RMSEV). Apenas os modelos NIR-FRAP e MIA-FRAP apresentaram valores de RMSECV ligeiramente mais elevados que os demais e valores de R^2 abaixo do esperado. Os demais modelos têm seus parâmetros de qualidade dentro dos limites descritos pela literatura.

6. CONCLUSÃO

Partindo das análises de referência foi possível construir bons modelos de calibração com os extratos etanólicos de geoprópolis, por meio da regressão de mínimos quadrados parciais. Pode-se concluir que a espectroscopia NIR e a análise de imagens de uma amostra, quando associados à quimiometria, podem ser utilizadas para a caracterização de amostras de geoprópolis. Os modelos de regressão por PLS construídos destacaram-se por apresentar robustez e capacidade de predição, podendo ser empregados em análises preliminares de amostras desconhecidas, indicando propriedades como teores de flavonoides totais, e capacidade antioxidante dos extratos de geoprópolis, em termos de vitamina C e Fe^{2+} equivalentes.

Em outras palavras, é possível estimar os teores de flavonoides totais e a capacidade antioxidante de amostras de geoprópolis, por meio de análises espectroscópicas NIR e de imagem. Assim, a simples aquisição de um espectro NIR ou fotografia dos extratos de geoprópolis nas condições descritas e utilizando os modelos gerados nos permite estimar de maneira rápida, precisa e confiável os teores de flavonoides e a capacidade antioxidante dos extratos. A vantagem desse método é a não necessidade de realização de ensaios clássicos que envolvem um maior tempo de análise, uso de solventes orgânicos, reagentes químicos e exposição do analista às possíveis contaminações. Essa metodologia se mostra promissora para automação e, portanto, para o controle de qualidade dos extratos a serem comercializados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, G. R., Lemos, T. L. G., Dornelas, C. A., Silva, A. M., Almeida, M. C. S., Ferreira, D. A., Monte, F. J. Q., Braz-Filho, R., Oliveira, I. R., Nascimento, P. G. G. **Estudo Químico e Avaliação Biológica da Própolis Vermelha de Alagoas**. *Revista Virtual de Química*, Vol. 10, No. 1, p. 2-12, 2018
- ALVES, R. M. O., Carvalho, C. A. L., Souza, B. A., Sodré, G. S., Marchini, L. C. **Características Físico-químicas de Amostras de Mel de *Melipona mandacaia* Smith (Hymenoptera: Apidae)**. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Vol. 25, No. 4, p. 644-650, 2005
- ANTOLOVICH, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K. **Methods for Testing Antioxidant Activity**. *The Analyst*, Vol. 127, No. 1, p. 183-198, 2002
- APPOLINÁRIO, F. **Metodologia da Ciência: Filosofia e Prática da Pesquisa**. 1ª Ed., 2006, Editora Thomson, São Paulo – SP, 240 p.
- ARAÚJO, M. J. A. M., Búfalo, M. C., Conti, B. J. **The Chemical Composition and Pharmacological Activities of Geopropolis Produced by *Melipona fasciculata* Smith in Northeast Brazil**. *Journal of Molecular Pathophysiology*, Vol. 4, p.12-20, 2015
- ARAÚJO, K. S. S., Júnior, J. F. S., Sato, M. O., Finco, F. D. B. A., Soares, I. M., Barbosa, R. S., Alvim, T. C., Ascênio, S. D., Mariano, S. M. B. **Physicochemical Properties and Antioxidant Capacity of Propolis of Stingless Bees (*Meliponinae*) and *Apis* from Two Regions of Tocantins, Brazil**. *Acta Amazonica*, Vol. 46, No. 1, p. 61-68, 2016
- ASSUNÇÃO, A. K. M. **Efeito Antitumoral do Tratamento com Extrato Hidroalcolóico de Geoprópolis de *Melipona Fasciculata* Smith em Modelo Experimental de Tumor de Ehrlich**. São Luís, 2011. *Dissertação (Mestrado)* – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão.
- BANKOVA, V. S., Christov, R., Marcucci, C., Popov, S. **Constituents of Brazilian Geopropolis**. *Zeitschrift für Naturforschung*, Vol. 53c, No. 5-6, p. 402-406, 1998
- BANKOVA, V. S., de Castro, S. L., Marcucci, M. C. **Propolis: Recent Advances in Chemistry and Plant Origin**. *Apidologie*, Vol. 31, No. 1, p. 3-15, 2000

- BANKOVA, V. S. **Chemical Diversity of Propolis and the Problem of Standardization.** *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 100, No. 1-2, p. 114-117, 2005
- BANKOVA, V. S., Christov, R., Marcucci, C., Popov, S. **Constituents of Brazilian Geopropolis.** *Zeitschrift für Naturforschung*, Vol. 53, No. 5-6, p. 402-406, 2014
- BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no Infravermelho: Na Caracterização de Compostos Orgânicos.** 1ª Ed., 2013, *Editora UFV*, Viçosa – MG, Brasil, 189 p.
- BARTOLOMEU, A. R., Frión-Herrera, Y., Silva, L. M., Romagnoli, G. G., Oliveira, D. E., Sforcin, J. M. **Combinatorial Effects of Geopropolis Produced by *Melipona fasciculata* Smith with Anticancer Drugs against Human Laryngeal Epidermoid Carcinoma (HEp-2) Cells.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Vol. 81, p. 48-55, 2016
- BATISTA, M. C. A., Abreu, B. V. B., Dutra, R. P., Cunha, M. S., Amaral, F. M. M., Torres, L. M. B., Ribeiro, M. N. S. **Composição Química e Atividade Antioxidante da Geopropolis de *Melipona fasciculata* (*Meliponinae*) Produzida em Áreas de Campos Alagados e de Cerrado no Estado do Maranhão, Nordeste do Brasil.** Vol. 46, No. 3, p. 315-322, 2016
- BENZIE, I. F. F. e STRAIN, J. J. **Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration.** *Methods in Enzymology*, Vol. 299, p. 15-27, 1999
- BEHRENDORFF, J. B. Y. H., Vickers, C. E., Chrysanthopoulos, P., Nielsen, L. K. **2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl as a Screening Tool for Recombinant Monoterpene Biosynthesis.** *Microbial Cell Factories*, Vol. 12, No. 1, p. 76-87, 2013
- BONSUCCESSO, J. S., Gloaguen, T. V., Nascimento, A. S., Carvalho, C. A. L., Dias, S. F. **Metals in Geopropolis from Beehive of *Melipona scutellaris* in Urban Environments.** *Science of The Total Environment*, Vol. 634, p. 687-694, 2018
- BOULANOUAR, B., Mounir, H., Ahmed, B., Abdelaziz, G. **Total Phenolic, Flavonoid Contents and Antioxidant Activities of Honey and Propolis Collected from the Region of Laghouat (South of Algeria).** *International Journal of Pharmacognosy and Chinese Medicine*, Vol 1, No. 2, p. 1-5, 2017

BRAND-WILLIAMS, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. **Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity.** *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, Vol. 28, No. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério de Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa Nº 3 – Anexo VI – **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Própolis.** 2001. Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil. Brasília - DF, Brasil. Disponível em: <http://www.engetecno.com.br/port/legislacao/melpropolis.htm>, acessado em: 25 de novembro de 2018

BURDOCK, G. A. **Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis).** *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 36, No. 4, p. 347-363, 1998

CAMARGO, R. C. R., Oliveira, K. L., Berto, M. I. **Mel de Abelhas sem Ferrão: Proposta de Regulamentação.** *Brazilian Journal of Food Technology*, Vol. 20, e2016157, p. 1-7, 2017

CAMPOS, J. F., Santos, U. P., Macorini, L. F., Melo, A. M., Balestieri, J. B., Paredes-Gamero, E. J., Cardoso, C. A., Souza K. P., dos Santos, E. L. **Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae).** *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 65, p. 374-380, 2014

CAMPOS, J. F., Santos, U. P., Rocha, P. S., Damião, M. J., Balestieri, J. B. P., Cardoso, C. A. L., Paredes-Gamero, E. J., Estevinho, L. M., Souza, K. P., Santos, E. L. **Antimicrobial, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Cytotoxic Activities of Propolis from the Stingless Bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí).** *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Vol. 2015, p. 1-11, 2015

CARDOZO, D. V. Mokochinski, J. B., Machado, C. S., Sawaya, A. C. H. F., Caetano, I. K., Felsner, M. L., Torres, Y. R., **Variabilidade Química de Geoprópolis Produzida pelas Abelhas sem Ferrão Jataí, Mandaçaia e Mandurí.** *Revista Virtual de Química*, Vol. 7 No. 6, p. 2457-2474, 2015

CARVALHO, R. M. A., Martins, C. F., Mourão, J. S. **Meliponiculture in Quilombola Communities of Ipiranga and Gurugi, Paraíba State, Brazil: An Ethnoecological Approach.** *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, Vol. 10, p. 1-12, 2014

CASTALDO, S. e CAPASSO, F. **Propolis, an Old Remedy used in Modern Medicine.** *Fitoterapia*, Vol. 73, Supl. 1, p. S1-S6, 2002

CHRISTIAN, G. D., Dasgupta, P. K., Schug, K. A. **Analytical Chemistry**. 7^a Ed., 2014, Wiley, New York, U. S. A., 850 p.

CHOUDHARI, M. K., Haghniaz, R., Rajwade, J. M., Paknikar, K. M., **Anticancer Activity of Indian Stingless Bee Propolis: An In Vitro Study**. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Vol. 2013, p. 1-10, 2013

CORTOPASSI-LAURINO, M., Imperatriz-Fonseca, V., Roubik, D., Dollin, A., Heard, T., Ingrid Aguilarf, I., Venturieri, G. C., Eardley, C., Nogueira-Neto, P. **Global Meliponiculture: Challenges and Opportunities**. *Apidologie*, Vol. 37, No. 2, p. 275-292, 2006

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*, Vol. 80, p. 76-83, 2017

CUNHA, M. S., Dutras, R. P., Batista, M. C. A., Abreu, B. V. B., Santos, J. R., Neiva, V. A., Amaral, F. M. M., Ribeiro, M. N. S. **Padronização de Extrativos de Geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (túbu)**. *Cadernos de Pesquisa – Universidade Federal do Maranhão*, Vol. 6, No. 3, p. 31-38, 2009

DA CUNHA, M. G., Franchin, M., Galvão, L. C. C., Ruiz, A. L. T. G., Carvalho, J. E., Ikegaki, M., Alencar, S. M., Koo, H., Rosalen, P. L. **Antimicrobial and Antiproliferative Activities of Stingless Bee *Melipona scutellaris* Geopropolis**. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, Vol. 13, No. 23, p. 1-9, 2013

DA CUNHA, M. G., Franchin, M., Paula-Eduardo, L. F., Freires, I. A., Beutler, J. A., Alencar, S. M. de, Ikegaki, M., Tabchoury, C. P. M., Cunha, T. M., Rosalen, P. L. **Anti-inflammatory and Anti-biofilm Properties of *ent-Nemorosone* from Brazilian Geopropolis**. *Journal of Functional Foods*, No. 26, p. 27-35, 2016

DAMASCENO, D., Toledo, T. G., Godinho, M. S., Silva, C. P., Oliveira, S. B. de Oliveira, A. E. **Análise Multivariada de Imagens na Química: Um Experimento para Determinação do pH de Águas Potáveis**. *Química Nova*, Vol. 38, No. 6, p. 836-841, 2015

DA SILVA, E. C. C., Muniz, M. P., Nunomura, R. C. S., Nunomura, S. M. **Constituintes Fenólicos e Atividade Antioxidante da Geoprópolis de duas Espécies de Abelhas sem Ferrão Amazônicas**. *Química Nova*, Vol. 36, No. 5, p. 628-633, 2013

DE CARVALHO, C. A. L., Alves, R. M. O., Souza, B. A. **Criação de Abelhas Sem Ferrão: Aspectos Práticos.** (Série Meliponicultura - 01), 2003, *Universidade Federal da Bahia/SEAGRI*, Salvador – BA, Brasil, 42 p.

DE SOUZA, A. M. D., Breitzkreitz, 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*, Vol. 36, No. 7, p. 1057-1065, 2013

DOS SANTOS, G. M. e ANTONINI, Y. **The Traditional Knowledge on Stingless Bees (*Apidae: Meliponina*) used by the Enawene-Nawe Tribe in Western Brazil.** *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, Vol. 4, No. 19, p.1-9, 2008

DUAILIBE, S. A. C., Gonçalves, A. G., Mendes, F. J. **Effect of a Propolis Extract on *Streptococcus Mutans* counts in Vivo.** *Journal of Applied Oral Science*, Vol. 15, No. 5, p. 420-423, 2007

DUARTE, A. W. F., Vasconcelos, M. R. S., Oda-Souza, M., Oliveira, F. F., López, A. M. Q. **Honey and Bee Pollen Produced by Meliponini (*Apidae*) in Alagoas, Brazil: Multivariate Analysis of Physicochemical and Antioxidant Profiles.** *Food Science and Technology*, Vol. 38, No. 3, p. 493-503, 2018

DUTRA, R. P., Nogueira, A. M. C., Marques, R. R. O., Costa, M. C. P., Ribeiro, M. N. S. **Avaliação Farmacognóstica de Geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada Maranhense, Brasil.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Vol. 18, No. 4, p. 557-562, 2008

DUTRA, R. P., Abreu, B. V. B., Cunha, M. S., Batista, M. C. A., Torres, L. M. B. Nascimento, F. R. F., Ribeiro, M. N. S., Guerra, R. N. M. **Phenolic acids, Hydrolyzable Tannins, and antioxidant Activity of Geopropolis from the Stingless Bee *Melipona fasciculata* Smith.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 62, No. 12, p. 2549–2557, 2014

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*, Vol. 4, p. 259-270, 2010

- FERNANDEZ-OLIVERAS, A., POZO, A. M., RUBIÑO, M., **Analysis of the Modulation Transfer Function Spectral Variation in Different Detector Arrays by Means of Speckle Patterns.** *Journal of Imaging Science and Technology*. Vol. 53, No. 3, p. 031101-1–031101-6, 2009
- FERREIRA, A. L. A. e MATSUBARA, L. S. **Radicais Livres: Conceitos, Doenças Relacionadas, Sistema de Defesa e Estresse Oxidativo.** *Revista da Associação Médica Brasileira*, Vol. 43, No. 1, p. 61-68, 1997
- FRANCHIN, M., da Cunha, M. G., Denny, C., Napimoga, M. H., Cunha, T. M., Bueno-Silva, B., Alencar, S. M., Ikegaki, M., Rosalen, P. L. **Bioactive Fraction of Geopropolis from *Melipona scutellaris* Decreases Neutrophils Migration in the Inflammatory Process: Involvement of Nitric Oxide Pathway.** *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Vol. 2013, p. 1-9, 2013
- FREITAS, B. M. **A Vida das Abelhas – Meliponíneos.** 2003, *Universidade Federal do Ceará*, Fortaleza – CE, Brasil, 9 p.
- GELADI, P. e KOWALSKI, B. R. **Partial Least-Squares Regression: A Tutorial.** *Analytica Chimica Acta*, Vol. 185, p. 1-17, 1986
- GELADI, P., Wold, S., Esbensen, K. H., **Image Analysis and Chemical Information in Images.** *Analytica Chimica Acta*, Vol. 191, p. 473-480, 1986
- GHISALBERTI, E. L. **Poropolis: A Review.** *Bee World*, Vol. 60, No. 2, p. 59-84, 1979
- GOBBO-NETO, L. e LOPESL, N. P. **Plantas Medicinais: Fatores de Influencia no Conteúdo de Metabólitos Secundários.** *Quimica Nova*, Vol. 30, No. 2, p. 374-381, 2007
- GONZÁLEZ-MARTÍN, 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*, Vol. 165, p. 533-539, 2017
- GONZALEZ, R. C. e WOODS, R. E. **Digital Image Processing.** 3ª Ed., 2008, *Prentice Hall*, Upper Saddle River, New Jersey, U. S. A., 797 p.
- HELPER, G. A. **ChemoStat: Desenvolvimento de Software para Análise Exploratória de Dados Multivariados.** Santa Cruz do Sul, 2014. *Dissertação*. Programa de Pós-Graduação em Sistemas e Processos Industriais. Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul – RS, Brasil, 137 p.

- HOLANDA, C. A., Oliveira, A. R., Costa, M. C. P. **Qualidade dos Méis Produzidos por *Melipona fasciculata* Smith da Região do Cerrado Maranhense.** *Química Nova*, Vol. 35, p. 55-58, 2012
- HUANG, D., Ou, B., Prior, R. L. **The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 53, No. 6, p. 1841-1856, 2005
- KARADAG, A., Ozcelik, B., Saner, S. **Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities.** *Food Analytical Methods*, Vol. 2, No. 1, p. 41-60, 2009
- KERR, W. E. **Abelhas Indígenas Brasileiras (Meliponíneos) na Polinização, na Produção de Mel, Pólen, Geoprópolis e Cera.** *Informe Agropecuário*, Vol. 13, No. 149, p. 15-22, 1987
- KIM, D-O., Lee, K. W., Lee, H. J., Lee, C. Y. **Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 50, No. 13, p. 3713-3717, 2002
- KUJUMGIEV, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., Popov, S. **Antibacterial, Antifungal and Antiviral Activity of Propolis of Different Geographic Origin.** *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 64, No. 3, p. 235-240, 1999
- KUMAR, S. **Analytical Techniques for Natural Product Research.** 1ª Ed., 2015, *Centre for Agriculture and Bioscience International*, Boston, Massachusetts, U. S. A., 204 p.
- LIBÉRIO, S. A., Pereira, A. L., Dutra, R. P. Reis, A. S., Araújo, M. J. A. M., Mattar, N. S., Silva, L. A., Ribeiro, M. N. S., Nascimento, F. R. F., Guerra, R. N. M., Monteiro-Neto, V. **Antimicrobial Activity Against Oral Pathogens and Immunomodulatory Effects and Toxicity of Geopropolis Produced by the Stingless Bee *Melipona fasciculata* Smith.** *BMC Complementary and Alternative Medicine*, Vol.11, p. 1-10, 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*, Vol. 14, No. 2, 2016
- LOUREIRO, R. J., Roque, F., Rodrigues, A. T., Herdeiro, M. T., Ramalheira, E. **O uso de Antibióticos e as Resistências Bacterianas: Breves Notas Sobre a sua Evolução.** *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, Vol. 34, No. 1, p. 77-84, 2016

MABRY, T. J., Markham, K. R., Thomas, M. B. **The Systematic Identification of Flavonoids**. 1ª Ed., 1970, *Springer*, Berlim, Germany, 354 p.

MACDONALD-WICKS, L. K., Wood, L. G., Garg, M. L. **Methodology for the Determination of Biological Antioxidant Capacity *in vitro*: a review**. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 86, No. 13, p. 2046–2056, 2006

MACHADO, J. L. **Bioprospecção da Geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (tiúba)**. São Luís, 2008. *Dissertação* – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luis – MA, Brasil, 82 p.

MARASCHIN, M., Zeggio, A. R. S., Tomazzoli, M. M., Oliveira, S. K., Ramlov, F., Veleirinho, M. B., Rocha, M. **Metabolômica e Quimiometria como Ferramentas para Análises Químico(Bio) Diversas**. *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria*, Vol. 4, p. 17-50, 2017

MARCHINI, L. C., Sodré, G. S., Moreti, A. C. C. C. **Mel Brasileiro: Composição e Normas**. 2004, A.S. Pinto, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 111 p.

MARCUCCI, M. C. **Propolis: Chemical Composition, Biological Properties and Therapeutic Activity**. *Apidologie*, Vol. 26, No. 2, p. 83-99, 1995

MARCUCCI, M. C. **Propriedades Biológicas e Terapêuticas dos Constituintes Químicos da Própolis**. *Química Nova*, Vol. 19, No. 5, p. 529-536, 1996

MARCUCCI, M. C. Woisky, R. G., Salatino, A. **Uso do Cloreto de Alumínio na Quantificação de Flavonoides em Amostras de Própolis**. *Apacame - Mensagem Doce*, No. 46, 1998. Disponível em: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/46/artigo.htm>, acesso em: 28 de agosto de 2018

MARTIN, G., Kargar, N., Buyukisik, H. B. **Bio-Monitoring of Cadmium, Lead, Arsenic and Mercury in Industrial Districts of Izmir, Turkey by using Honey Bees, Propolis and Pine Tree Leaves**. *Ecological Engineering*, Vol. 90, Public. C, p. 331–335, 2016

MURRIETA, R. S., Bakri, M. S., Adams, C., Oliveira, P. S. S., Strumpf, R. **Consumo Alimentar e Ecologia de Populações Ribeirinhas em dois Ecossistemas Amazônicos: Um Estudo Comparativo**. *Revista Nutrição*, Vol., 21, (Suplemento), p. 123s-133s, 2008

NAGAI, T., Inoue, R., Inoue, H., Suzuki, N. **Preparation and Antioxidant Properties of Water Extract of Propolis.** *Food Chemistry*, Vol, 80, No. 1, p. 29-33, 2003

NILSSON, J., Pillai, D., Onning, G., Persson, C., Nilsson, A., Akesson, B. **Comparison of the 2,2'-azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Methods to Assess the Total Antioxidant Capacity in Extracts of Fruit and Vegetables.** *Mol Nutr Food Res*, Vol. 49, No. 3, p. 239-246, 2005

OLIVEIRA, F. F., Richers, B. T. T., Silva, J. R., Farias, R. C., Matos, T. A .L. **Guia Ilustrado das Abelhas "Sem-Ferrão" das Reservas Amanã e Mamirauá, Amazonas, Brasil (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).** 1ª Ed., 2013, *Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá – IDSM, Ministerio da Ciência, Tecnologia e Inovação – MCTI*, 270 p. Disponível em: https://www.mamiraua.org.br/cms/content/public/documents/publicacao/40744baa-4beb-4c79-b9f6-d941b7bd80c9_guia-abelhas-pdf-reduzido.pdf, acesso: 2 de janeiro de 2019

PALUMBO, H. N. **Perspectivas da Meliponicultura no Brasil in: Nossas Brasileirinhas – As Abelhas Aativas.** 1ª Ed., 2015, *Centro Paranaense de Referência em Agroecologia – CPRA*, Curitiba – PR, Brasil, 69 p. Disponível em: <http://www.cpra.pr.gov.br/arquivos/File/cartilhameliponideos.pdf>, acesso: 17 de dezembro de 2018

PARK, Y. K., Alencar, S. M., Scamparini, A. M. R. P., Aguiar, C. L. **Própolis Produzida no Sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências Fitoquímicas de sua Origem Vegetal.** *Ciência Rural*, Vol. 32, No. 6, p. 997-1003, 2002

PEDRINI, H. e SCHWARTZ, W. R. **Análise de Imagens Digitais - Princípios, Algoritmos e Aplicações.** 2007, *Thomson Learning*, São Paulo – SP, Brasil, 528 p.

PEREIRA, A. S., Seixas, F. R. M. S., Neto, F. R. A. **Própolis: 100 Anos de Pesquisa e suas Perspectivas Futuras.** *Química Nova*, Vol. 25, No. 2, p. 321-326, 2002

PEREIRA, F. M., Souza, B. A., Lopes, M. T. R. **Criação de Abelhas-sem-ferrão.** 1ª Ed., 2017, *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA*, Teresina – PI, Brasil, 32 p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/166288/1/CriacaoAbelhaSemFerraao.pdf>, acesso: 1 de janeiro de 2019

PERUGINI, M., Manera, M., Grotta, L., Abete, M.C., Tarasco, R., Amorena, M. **Heavy Metal (Hg, Cr, Cd, and Pb) Contamination in Urban Areas and Wildlife Reserves:**

Honeybees as Bioindicators. *Biological Trace Elements Research*, Vol. 140, No. 2, p. 170-176, 2011

PIMENTEL, M. F. e BARROS NETO, B. **Calibração: Uma Revisão para Químicos Analíticos.** *Química Nova*, Vol. 19, p. 268-277, 1996

POPOVA, M. P., Bankova, V. S., Bogdanov, S., Tsvetkova, I., Naydenski, C., Marcazzan, G. L., Sabatini, A-G. **Chemical Characteristics of Poplar Type Propolis of Different Geographic Origin.** *Apidologie*, Vol. 38, No. 3, p. 306-311, 2007

RÁCZ, A., Papp, N., Balogh, E., Fodora, M., Héberger, K. **Comparison of Antioxidant Capacity Assays with Chemometric Methods.** *Analytical Methods*, Vol. 7, No. 10, p. 4216-4224, 2015

RAMNATH, S. e VENKATARAMEGOWDA, S. **Antioxidant Activity of Indian Propolis - An In Vitro Evaluation.** *International Journal of Pharmacology, Phytochemistry and Ethnomedicine*, Vol. 5, p. 75-89, 2016

RIBEIRO-JUNIOR, J. A., Franchin, M., Cavallini, M. E., Denny, C. Alencar, S. M., Ikegaki, M., Rosalen, P. L. **Gastroprotective Effect of Geopropolis from *Melipona scutellaris* is Dependent on Production of Nitric Oxide and Prostaglandin.** *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Vol. 2015, p.1-5, 2015

ROUBIK, D. W. **Ecology and Natural History of Tropical Bees.** 1ª Ed., 1992, *Cambridge University Press*, U. K., 514 p.

RUFINO, M. D. S. M., Alves, R. E., De Brito, E. S., De Moraes, 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*, p. 1-4, 2006

SANTOS, A. B. **Abelhas Nativas: Polinizadores em Declínio.** *Natureza on line*, Vol. 8, No. 3, p.103-106, 2010

SANTOS, T. L. A., Queiroz, R. F., Sawaya, A. C. H. F., Lopez, B. G.-C., M. B. P. Soares, M. B. P., Bezerra, D. P., Rodrigues, A. C. B.C., Paula, V., Waldschmidt, A. M. ***Melipona mondury* Produces a Geopropolis with Antioxidant, Antibacterial and Antiproliferative Activities.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, Vol. 89, No. 3, p. 2247-2259, 2017

SAWAYA, A. C. H. F., Calado, J. C. P., Santos, L. C., Marcucci, M. C., Akatsu, I. P., Soares, A. E. E., Abdelnur, P. V., Cunha, I. B. S., Eberlin, M. N. **Composition and Antioxidant Activity of Propolis from Three Species of *Scaptotrigona* Stingless Bees.** *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, Vol. 1, No. 2, p. 37-42, 2009

SEBRAE. **Agroegócios: Produção de Própolis – Estudo de Mercado.** 2017. Disponível em: <https://m.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/UFs/BA/Anexos/Produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20pr%C3%B3polis%20na%20Bahia.pdf>, acesso: 2 de janeiro de 2019

SFORCIN, J. M. **Própolis and the Immune System: a Review.** *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 113, p. 1-14, 2007

SFORCIN, J. M., Conti, B. J., Santiago, B. K., Cardoso, E. O., Conte, F. L., Oliveira, L. P. G., Araújo, M. J. A. M. **Própolis e Geoprópolis: Uma Herança das Abelhas.** 1ª Ed., 2017, *Editora Unesp*, São Paulo – SP, Brasil, 100 p.

SHARMA, B. K. **Instrumental Methods of Chemical Analysis.** 24ª Ed., 2000, *Krishna Prakashan Media*, Meerut, Uttar Pradesh, India, 308 p.

SHELDON JR., A. T. **Antibiotic Resistance: Who Is Winning The War? Introductory Remarks.** *International Journal of Toxicology*, Vol. 22, p. 129-30, 2003

SIESLER, H. W., Ozaki, Y., Kawata, S., Heise, H. M. **Near-infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications.** 1ª Ed. 2008, *John Wiley & Sons*, Weinheim, Baden-Württemberg, Germany, 361 p.

SILVA, I. A. A., Silva, T. M. S., Camara, C. A., Queiroz, N. Magnani, M., Novais, J. S., Soledade, L. E. B., Lima, E. O., Souza, A. L., Souzac, A. G. **Phenolic Profile, Antioxidant Activity and Palynological Analysis of Stingless Bee Honey From Amazonas, Northern Brazil.** *Food Chemistry*, Vol. 141, No. 4, p. 3552-3558, 2013

SILVA, J. B., Costa, K. M. F. M., Coelho, W. A. C., Paiva K. A. R., Costa, G. A. V., Antonio Salatino, A., Carlos, I. A., Freitas, C. I. A., Batista, J. S. **Quantificação de Fenóis, Flavonoides Totais e Atividades Farmacológicas de Geoprópolis de *Plebeia* aff. *Flavocincta* do Rio Grande do Norte.** *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Vol. 36, No. 9, p. 874-880, 2016

SILVA, W. J. M. e FERRARI, C. K. B. Metabolismo Mitocondrial, Radicais Livres e Envelhecimento. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia*, Vol. 14, No. 3, p. 441-451, 2011

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*, Vol. 50, No. 1, p. 31-36, 2008

SIMONE-FINSTROM, M. e SPIVAK, M. **Propolis and Bee Health: The Natural History and Significance of Resin use by Honey Bees.** *Apidologie*, Vol. 41, No. 3, p. 295-311, 2010

SKOOG, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R. **Principles of Instrumental Analysis.** 6^a Ed., 2007. *Thomson Brooks*, Belmont, California, U. S. A., 1056 p.

SOUSA, D. M. N., Olinda, R. G., Martins, C. G., Abrantes, R. M., Coelho, W. A. C., Silva, J. B. A., Morais, S. M., Batista, J. S. **Prospecção Fitoquímica, Toxicidade *In Vitro* e Avaliação das Atividades Antirradicalares e Antibacteriana da Geoprópolis da Abelha Jandaíra.** *Acta Veterinaria Brasilica*, Vol. 9, No. 2, p. 134-140, 2015

SOUZA, S. A., Camara, C. A., Silva, E. M. S., Silva, T. M. S. **Composition and Antioxidant Activity of Geopropolis Collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) Bees.** *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v.2013, p.1-5, 2013.

SRIDHAR, S. **Digital Image Processing.** 2^o Ed., 2013, *Oxford University Press*, New Delhi, India, 736 p.

STUART, B. **Infrared Spectroscopy.** 1^a Ed., 2005, *John Wiley & Sons*, Chichester, U.K., 244 p.

SUN, D.-W. (Ed.). **Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control.** 1^a Ed., 2009, *Academic Press/Elsevier*, 448 p.

TORRES-GONZÁLEZ, A., López-Rivera, P., Duarte-Lisci, G., López-Ramírez, Á., Correa-Benítez, A., Rivero-Cruz, J. F. **Analysis of Volatile Components from *Melipona beecheii* Geopropolis from Southeast Mexico by Headspace Solid-Phase Microextraction.** *Natural Product Research*, Vol. 30, No. 2, p. 237-240, 2016

UMTHONG, S., Phuwapraisirisan, P., Puthong, S., Chanchao, C. ***In Vitro* Antiproliferative Activity of Partially Purified *Trigona laeviceps* Propolis from Thailand on Human Cancer Cell Lines.** *BMC Complementary and Alternative Medicine*, Vol. 11, No. 37, p. 1-8, 2011

VALDERRAMA, L., Paiva, V. B., Março, P. H., Valderrama, P. **Proposta Experimental Didática para o Ensino de Análise de Componentes Principais.** *Química Nova*, Vol. 39, No. 2, p. S1-S2, 2016

VILLAS-BÔAS, J. **Manual Tecnológico Mel de Abelhas Sem Ferrão.** 2ª Ed., 2018, *Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN)*, Brasília – DF, Brasil, 216 p.

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*, Vol. 12, No. 7, p. e0182161, 2017

WOISKY, R. G. e SALATINO, A. **Analysis of Propolis: Some Parameters and Prodecure for Chemical Fuality Control.** *Journal of Apicultural Research*, Vol. 37, No. 2, p. 99-105, 1998

WOLD, S., Ruhe, A., Wold, H., Dunn, III, W. J. **The Collinearity Problem in Linear Regression. The Partial Least Squares (PLS) Approach to Generalized Inverses.** *SIAM Journal on Scientific and Statistical Computing*. Vol. 5, No. 3, p. 735-743, 1984

WOLLENWEBER, E. e JAY, M. **Flavones and Flavonols in:** HARBORNE, J. B. **The Flavonoids: Advances in Research Since 1980.** 1ª Ed., London. *Chapman and Hall*, p. 233-302, 1988

YOO, H., Kim, S. H., Lee, J., Kim, H. J., Seo, S. H., Chung, B. Y., Jin, C., Lee, Y. S. **Synthesis and Antioxidant Activity of 3-methoxyflavones.** *Bulletin of the Korean Chemical Society*, Vol. 26, No. 12, p. 2057-2060, 2005

7.1 Referências complementares

ATKINS, P. e JONES, L. **Princípios de Química**. 3ª Ed., 2006, *Bookman*, Porto Alegre – RS, Brasil, 965 p.

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*, Vol. 114, p. 441-448, 2013.

BERNARDINO P. N., Bersano, P. R. O., Neto, J. F. L. José Maurício Sforcin, J. M., Negri, P. **Positive Effects of Antitumor Drugs in Combination with Propolis on Canine Osteosarcoma Cells (spOS-2) and Mesenchymal Stem Cells**. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Vol. 104, p. 268- 274, 2018

CALEGARI, M. A., Pransniwski, 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*, No. AHEAD, p. 1-10, 2017

FARIA, M. R. G., Sousa, L. H., Neto, C. M. S., Silva, G. A., Prado, R. S. **Avaliação da Capacidade Antifúngica de Mel e Geoprópolis de *Melipona quadrifasciata* sobre *Candida albicans***. *Revista Eletrônica da Faculdade Evangélica de Ceres – REFACER*, Vol. 6, No. 1, p. 1-16, 2017

GÜLÇİN, I. **Antioxidant Activity of Food Constituents: An Overview**. *Archives of Toxicology*, Vol. 86, No. 3, p. 345-391, 2012

HAALAND, D., Thomas, E. **Partial Least-Squares Methods for Spectral Analyses. 1. Relation to Other Quantitative Calibration Methods and the Extraction of Qualitative Information**. *Analytical Chemistry*, Vol. 60, No. 11, p. 1193-1202, 1988

MICHENER, C. D. **The Bees of the World**. 2ª Ed., 2000, *The John Hopkins University Press*. Cambridge, Massachusetts – U. S. A., 953 p.

SCHMIDT, E. M., Stock, D., Chada, F. J. G., Finger, D., Sawaya, A. C. H. F., Eberlin, M. N., Felsner, M. L., Quináia. S. P., Monteiro, M. C., Torres, Y. R. A. **Comparison Between Characterization and Biological Properties of Brazilian Fresh and Aged Propolis**. *BioMed Research International*, Vol. 2014, p. 1-10, 2014

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*, Vol. 40, No. 4, p. 418-426, 2017

THAIPONG, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Byrne, D. H. **Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC Assays for Estimating Antioxidant Activity from Guava Fruit Extracts.** *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol. 19, No. 6-7, p: 669-675, 2006

VERMERRIS, W. e NICHOLSON, R. **Isolation and Identification of Phenolic Compounds in: Phenolic compound biochemistry.** 1^a Ed., 2008, *Springer*, Netherlands, p. 151- 196

WILLIAMS, P. e NORRIS, K. **Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries.** 2^a Ed., 2002, *American Association of Cereal Chemist*, St. Paul, Minnesota, U. S. A., 296 p.

Anexo 1 – Dados das amostras de geoprópolis utilizadas no presente estudo.

| Nº | Nome científico da abelha produtora | Município de coleta | Estado | Bioma |
|-----------|---|----------------------------|---------------|----------------|
| 1 | <i>Melipona asilvai</i> | Pilar do Sul | SP | Mata Atlântica |
| 2 | <i>Melipona flavolineata</i> | Barra do Corda | MA | Cerrado |
| 3 | <i>Melipona fasciculata</i> | Pilar do Sul | SP | Cerrado |
| 4 | <i>Tetrágonia clavipes</i> | Pilar do Sul | SP | Cerrado |
| 5 | <i>Melipona scutellaris</i> | Pilar do Sul | SP | Cerrado |
| 6 | <i>Trigona truculenta</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 7 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | Pilar do Sul | SP | Cerrado |
| 8 | <i>Melipona fasciculata</i> | Barra do Corda | MA | Cerrado |
| 9 | <i>Melipona seminigra merrillae</i> | Pilar do Sul | SP | Cerrado |
| 10 | <i>Melipona scutellaris</i> | Mogi Mirim | SP | Cerrado |
| 11 | <i>Melipona bicolor</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 12 | <i>Frieseomelitta doederleini</i> | Petrolina | PE | Caatinga |
| 13 | <i>Melipona marginata</i> | Carira | SE | Caatinga |
| 14 | <i>Scaptotrigona xanthotricha</i> | Pilar do Sul | SP | Cerrado |
| 15 | <i>Melipona quadrifasciata quadrifasciata</i> | Paranaguá | PR | Mata Atlântica |
| 16 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 17 | <i>Melipona scutellaris</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 18 | <i>Melipona subnitida</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 19 | <i>Melipona marginata</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 20 | <i>Melipona fasciculata</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 21 | <i>Melipona marginata</i> | Curitiba | PR | Mata Atlântica |
| 22 | <i>Melipona scutellaris</i> | Curitiba | PR | Mata Atlântica |
| 23 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | Curitiba | PR | Mata Atlântica |
| 24 | <i>Tetragonisca angustula</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 25 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 26 | <i>Melipona marginata</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 27 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 28 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 29 | <i>Melipona marginata</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 30 | <i>Melipona marginata</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 31 | <i>Melipona marginata</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 32 | <i>Melipona bicolor</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 33 | <i>Melipona marginata</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 34 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |

Fonte: O autor, 2018.

Anexo 1 – Dados das amostras de geoprópolis utilizadas no presente estudo.

| Nº | Nome científico da abelha produtora | Município de coleta | Estado | Bioma |
|-----------|--|----------------------------|---------------|----------------|
| 35 | <i>Tetragonisca angustula</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 36 | <i>Melipona marginata</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 37 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 38 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 39 | <i>Tetragonisca angustula</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 40 | <i>Tetragonisca angustula</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 41 | <i>Tetragonisca angustula</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 42 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 43 | <i>Tetragonisca angustula</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 44 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 45 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 46 | <i>Tetragonisca angustula</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 47 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | Prudentópolis | PR | Mata Atlântica |
| 48 | <i>Tetragonisca angustula</i> | Quarto Centenário | PR | Mata Atlântica |
| 49 | <i>Tetragonisca angustula</i> | Curitiba | PR | Mata Atlântica |
| 50 | <i>Plebeia meridionalis</i> | Catanduvas | PR | Mata Atlântica |

Fonte – O autor, 2018.

Anexo 2 – Concentração de flavonoides em geoprópolis *in natura*, calculada a partir da média das triplicatas.

| Nº | Nome científico da abelha produtora | Flavonoides (mg/g) | Desvio padrão |
|----|---|--------------------|---------------|
| 1 | <i>Melipona asilvai</i> | 1,15 | 0,10 |
| 2 | <i>Melipona flavolineata</i> | 0,88 | 0,04 |
| 3 | <i>Melipona fasciculata</i> | 0,90 | 0,02 |
| 4 | <i>Tetragona clavipes</i> | 3,83 | 0,17 |
| 5 | <i>Melipona scutellaris</i> | 1,43 | 0,10 |
| 6 | <i>Trigona truculenta</i> | 6,29 | 0,59 |
| 7 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 26,30 | 1,54 |
| 8 | <i>Melipona fasciculata</i> | 3,43 | 0,20 |
| 9 | <i>Melipona seminigra merrillae</i> | 21,46 | 1,27 |
| 10 | <i>Melipona scutellaris</i> | 0,24 | 0,04 |
| 11 | <i>Melipona bicolor</i> | 1,92 | 0,21 |
| 12 | <i>Frieseomelitta doederleini</i> | 5,65 | 0,49 |
| 13 | <i>Melipona marginata</i> | 0,95 | 0,18 |
| 14 | <i>Scaptotrigona xanthotricha</i> | 3,55 | 0,12 |
| 15 | <i>Melipona quadrifasciata quadrifasciata</i> | 6,02 | 0,20 |
| 16 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 3,97 | 0,43 |
| 17 | <i>Melipona scutellaris</i> | 1,51 | 0,41 |
| 18 | <i>Melipona subnitida</i> | 16,79 | 0,22 |
| 19 | <i>Melipona marginata</i> | 1,34 | 0,18 |
| 20 | <i>Melipona fasciculata</i> | 13,00 | 0,87 |
| 21 | <i>Melipona marginata</i> | 3,31 | 0,18 |
| 22 | <i>Melipona scutellaris</i> | 1,84 | 0,21 |
| 23 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 2,28 | 0,48 |
| 24 | <i>Tetragonisca angustula</i> | 10,65 | 0,49 |
| 25 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 1,14 | 0,03 |
| 26 | <i>Melipona marginata</i> | 10,38 | 2,14 |
| 27 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 1,71 | 0,02 |
| 28 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 1,25 | 0,15 |
| 29 | <i>Melipona marginata</i> | 3,17 | 0,45 |
| 30 | <i>Melipona marginata</i> | 1,46 | 0,28 |
| 31 | <i>Melipona marginata</i> | 2,13 | 0,14 |
| 32 | <i>Melipona bicolor</i> | 4,61 | 0,31 |
| 33 | <i>Melipona marginata</i> | 2,16 | 0,09 |
| 34 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 2,54 | 0,11 |

Fonte: O autor, 2018.

Anexo 2 – Concentração de flavonoides em geoprópolis *in natura*, calculada a partir da média das triplicatas.

| Nº | Nome científico da abelha produtora | Flavonoides (mg/g) | Desvio Padrão |
|----|-------------------------------------|--------------------|---------------|
| 35 | <i>Tetragonisca angustula</i> | 6,64 | 0,37 |
| 36 | <i>Melipona marginata</i> | 18,19 | 0,21 |
| 37 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 1,94 | 0,07 |
| 38 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 6,37 | 0,66 |
| 39 | <i>Tetragonisca angustula</i> | 5,56 | 0,66 |
| 40 | <i>Tetragonisca angustula</i> | 5,92 | 0,21 |
| 41 | <i>Tetragonisca angustula</i> | 4,77 | 0,14 |
| 42 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 17,43 | 0,62 |
| 43 | <i>Tetragonisca angustula</i> | 4,62 | 0,42 |
| 44 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 6,01 | 0,56 |
| 45 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 1,56 | 0,24 |
| 46 | <i>Tetragonisca angustula</i> | 10,30 | 0,63 |
| 47 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 2,29 | 0,42 |
| 48 | <i>Tetragonisca angustula</i> | 6,18 | 0,68 |
| 49 | <i>Tetragonisca angustula</i> | 4,69 | 0,63 |
| 50 | <i>Plebeia meridionalis</i> | 5,70 | 0,74 |

Fonte: O autor, 2018.

Anexo 3 – Valores de VCEAC em geoprópolis *in natura*.

| Nº | Nome científico | Vitamina C equivalente (mg/g) | Desvio Padrão |
|-----------|---|--|----------------------|
| 1 | <i>Melipona asilvai</i> | 0,08 | 0,00 |
| 2 | <i>Melipona flavolineata</i> | 1,02 | 0,03 |
| 3 | <i>Melipona fasciculata</i> | 1,11 | 0,06 |
| 4 | <i>Tetragona clavipes</i> | 1,39 | 0,05 |
| 5 | <i>Melipona scutellaris</i> | 1,97 | 0,02 |
| 6 | <i>Trigona truculenta</i> | 3,24 | 0,00 |
| 7 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 6,39 | 0,11 |
| 8 | <i>Melipona fasciculata</i> | 1,36 | 0,05 |
| 9 | <i>Melipona seminigra merrillae</i> | 6,49 | 0,01 |
| 10 | <i>Melipona scutellaris</i> | 0,44 | 0,07 |
| 11 | <i>Melipona bicolor</i> | 1,25 | 0,15 |
| 12 | <i>Frieseomelitta doederleini</i> | 1,69 | 0,07 |
| 13 | <i>Melipona marginata</i> | 0,72 | 0,02 |
| 14 | <i>Scaptotrigona xanthotricha</i> | 1,04 | 0,06 |
| 15 | <i>Melipona quadrifasciata quadrifasciata</i> | 0,74 | 0,04 |
| 16 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 0,96 | 0,08 |
| 17 | <i>Melipona scutellaris</i> | 5,18 | 0,19 |
| 18 | <i>Melipona subnitida</i> | 6,67 | 0,10 |
| 19 | <i>Melipona marginata</i> | 0,15 | 0,04 |
| 20 | <i>Melipona fasciculata</i> | 6,87 | 0,11 |
| 21 | <i>Melipona marginata</i> | 1,58 | 0,04 |
| 22 | <i>Melipona scutellaris</i> | 2,49 | 0,01 |
| 23 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 0,45 | 0,04 |
| 24 | <i>Tetragonisca angustula</i> | 1,10 | 0,04 |
| 25 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 0,21 | 0,00 |
| 26 | <i>Melipona marginata</i> | 2,34 | 0,08 |
| 27 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 0,33 | 0,04 |
| 28 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 0,31 | 0,02 |
| 29 | <i>Melipona marginata</i> | 0,01 | 0,01 |
| 30 | <i>Melipona marginata</i> | 1,01 | 0,01 |
| 31 | <i>Melipona marginata</i> | 1,35 | 0,10 |
| 32 | <i>Melipona bicolor</i> | 3,23 | 0,07 |
| 33 | <i>Melipona marginata</i> | 0,62 | 0,01 |
| 34 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 0,63 | 0,02 |

Fonte: O autor, 2018.

Anexo 3 – Valores de VCEAC em geoprópolis *in natura*.

| Nº | Nome científico | Vitamina C equivalente (mg/g) | Desvio Padrão |
|-----------|--------------------------------|--|----------------------|
| 35 | <i>Tetragonisca angustula</i> | 0,42 | 0,01 |
| 36 | <i>Melipona marginata</i> | 3,17 | 0,10 |
| 37 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 0,31 | 0,09 |
| 38 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 1,33 | 0,10 |
| 39 | <i>Tetragonisca angustula</i> | 0,43 | 0,02 |
| 40 | <i>Tetragonisca angustula</i> | 0,52 | 0,02 |
| 41 | <i>Tetragonisca angustula</i> | 0,44 | 0,03 |
| 42 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 6,28 | 0,18 |
| 43 | <i>Tetragonisca angustula</i> | 0,42 | 0,03 |
| 44 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 1,27 | 0,05 |
| 45 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 0,25 | 0,03 |
| 46 | <i>Tetragonisca angustula</i> | 0,98 | 0,06 |
| 47 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 2,09 | 0,11 |
| 48 | <i>Tetragonisca angustula</i> | 0,97 | 0,03 |
| 49 | <i>Tetragonisca angustula</i> | 0,60 | 0,01 |
| 50 | <i>Plebeia meridionalis</i> | 3,43 | 0,16 |

Fonte: O autor, 2018.

Anexo 4 – Valores de FRAP em geoprópolis *in natura*. **N.d.** = não detectado

| Nº | Nome científico da abelha produtora | Fe ²⁺ (µg/g) | Desvio padrão |
|----|---|-------------------------|---------------|
| 1 | <i>Melipona asilvai</i> | n.d. | n.d. |
| 2 | <i>Melipona flavolineata</i> | 5,35 | 0,12 |
| 3 | <i>Melipona fasciculata</i> | 5,53 | 0,08 |
| 4 | <i>Tetragona clavipes</i> | 3,12 | 0,13 |
| 5 | <i>Melipona scutellaris</i> | 5,19 | 0,06 |
| 6 | <i>Trigona truculenta</i> | 1,85 | 0,02 |
| 7 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 0,42 | 0,01 |
| 8 | <i>Melipona fasciculata</i> | 0,05 | 0,01 |
| 9 | <i>Melipona seminigra merrillae</i> | 3,62 | 0,25 |
| 10 | <i>Melipona scutellaris</i> | 1,55 | 0,13 |
| 11 | <i>Melipona bicolor</i> | 2,68 | 0,15 |
| 12 | <i>Frieseomelitta doederleini</i> | 2,58 | 0,35 |
| 13 | <i>Melipona marginata</i> | 0,12 | 0,01 |
| 14 | <i>Scaptotrigona xanthotricha</i> | 0,85 | 0,02 |
| 15 | <i>Melipona quadrifasciata quadrifasciata</i> | 4,20 | 0,13 |
| 16 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 3,05 | 0,04 |
| 17 | <i>Melipona scutellaris</i> | 18,55 | 0,25 |
| 18 | <i>Melipona subnitida</i> | 0,95 | 0,01 |
| 19 | <i>Melipona marginata</i> | nd | nd |
| 20 | <i>Melipona fasciculata</i> | 0,70 | 0,04 |
| 21 | <i>Melipona marginata</i> | 1,57 | 0,24 |
| 22 | <i>Melipona scutellaris</i> | 17,90 | 0,14 |
| 23 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | nd | nd |
| 24 | <i>Tetragonisca angustula</i> | nd | nd |
| 25 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 3,57 | 0,26 |
| 26 | <i>Melipona marginata</i> | 8,43 | 0,40 |
| 27 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 0,01 | 0,00 |
| 28 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 1,97 | 0,10 |
| 29 | <i>Melipona marginata</i> | 9,88 | 0,19 |
| 30 | <i>Melipona marginata</i> | 1,62 | 0,26 |
| 31 | <i>Melipona marginata</i> | 16,75 | 0,08 |
| 32 | <i>Melipona bicolor</i> | 3,66 | 0,04 |
| 33 | <i>Melipona marginata</i> | n.d. | n.d. |
| 34 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 1,59 | 0,30 |

Fonte: O autor, 2018.

Anexo 4 – Valores de FRAP em geoprópolis *in natura*. **N.d.** = não detectado.

| Nº | Nome científico da abelha produtora | Fe²⁺ (µg/g) | Desvio Padrão |
|-----------|--|-------------------------------|----------------------|
| 35 | <i>Tetragonisca angustula</i> | 0,15 | 0,02 |
| 36 | <i>Melipona marginata</i> | 28,61 | 0,47 |
| 37 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 3,27 | 0,11 |
| 38 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 2,57 | 0,22 |
| 39 | <i>Tetragonisca angustula</i> | 0,90 | 0,01 |
| 40 | <i>Tetragonisca angustula</i> | 11,57 | 0,36 |
| 41 | <i>Tetragonisca angustula</i> | 0,08 | 0,00 |
| 42 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 0,17 | 0,01 |
| 43 | <i>Tetragonisca angustula</i> | 5,82 | 0,33 |
| 44 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 5,89 | 0,34 |
| 45 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 0,31 | 0,04 |
| 46 | <i>Tetragonisca angustula</i> | 15,38 | 0,15 |
| 47 | <i>Melipona quadrifasciata</i> | 0,13 | 0,02 |
| 48 | <i>Tetragonisca angustula</i> | 12,69 | 0,60 |
| 49 | <i>Tetragonisca angustula</i> | 1,82 | 0,25 |
| 50 | <i>Plebeia meridionalis</i> | 5,56 | 0,20 |

Fonte: O autor, 2018.