

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA – PPGQA



**UTILIZAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA E
FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X COM ABORDAGEM
QUIMIOMÉTRICA PARA CLASSIFICAÇÃO E ESTIMAÇÃO DE
MINERAIS EM GEOPRÓPOLIS**

BRUNO BELIN DAL SANTOS

GUARAPUAVA-PR

2022

BRUNO BELIN DAL SANTOS

**UTILIZAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA E
FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X COM ABORDAGEM
QUIMIOMÉTRICA PARA CLASSIFICAÇÃO E ESTIMAÇÃO DE
MINERAIS EM GEOPRÓPOLIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Pablo González Borrero

GUARAPUAVA-PR

2022

Catálogo na Publicação
Rede de Bibliotecas da Unicentro

S237u

Santos, Bruno Belin Dal

Utilização de espectroscopia fotoacústica e fluorescência de raios X com abordagem quimiométrica para classificação e estimação de minerais em geoprópolis / Bruno Belin Dal Santos. -- Guarapuava, 2022.

xiii, 60 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada. Área de Concentração: Química Aplicada, 2022.

Orientador: Pedro Pablo González Borrero

Banca examinadora: Fábio Luiz Melquiades, Daiane Finger Ferreira

Bibliografia

1. Geoprópolis. 2. Espectroscopia fotoacústica. 3. Fluorescência de raios X por energia dispersiva. 4. Análises multivariadas. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada.

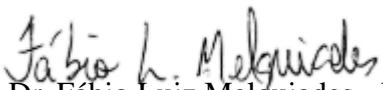
CDD 540

BRUNO BELIN DAL SANTOS

UTILIZAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA E
FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X COM ABORDAGEM QUIMIOMÉTRICA
PARA CLASSIFICAÇÃO E ESTIMAÇÃO DE MINERAIS EM
GEOPRÓPOLIS

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Aplicada, para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em 27 de setembro 2022.


Prof. Dr. Fábio Luiz Melquiades - UEL


Prof^a. Dr^a. Daiane Finger Ferreira - Unicentro


Prof. Dr. Pedro Pablo González Borrero - Orientador

GUARAPUAVA-PR

2022

AGRADECIMENTOS

Por todos os esforços não medidos, pela educação, aprendizado e formação pessoal, bem como todo incentivo e confiança depositados em mim durante todo o trajeto até aqui, quero ressaltar minha eterna gratidão aos meus pais, Sara Belin Dal Santos e Jozelho Dal Santos, por estarem sempre caminhando ao meu lado, dando total apoio.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Pablo González Borrero, que proporcionou a oportunidade de realizar o mestrado sob a sua orientação e sempre esteve contribuindo significativamente, sem medir esforços, na minha formação.

Agradeço também à Prof.^a Dr.^a Yohandra R. Torres, por ter cedido as amostras para a realização deste trabalho. Ao Prof. Dr. Vanderlei A. de Lima, pelo tempo cedido e ensinamentos passados a respeito das análises multivariadas. Aos colegas de trabalho, João Fábio Turco, que ajudou na seleção das amostras e ao Felipe Rodrigues dos Santos, pelas dicas e envio de material a respeito da técnica de *EDXRF*. Meu muito obrigado a todos!

Também agradeço às agências de fomento, pelo essencial auxílio financeiro. Por fim, a todos os familiares e amigos que sempre estiveram torcendo por esta conquista, e que de maneira direta ou indireta propiciaram este momento. A todos, registro aqui, minha eterna gratidão!

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota.”

Theodore Roosevelt

RESUMO

A geoprópolis é um produto apícola composto principalmente por solo, cerca de 90%, além de resinas vegetais e secreções enzimáticas das abelhas, que são utilizadas como matéria-prima para a construção de estruturas internas e externas da colmeia. Apresenta várias propriedades biológicas, as quais estão associadas as características geográficas onde a colônia se encontra, de acordo com a flora, clima e espécies de abelhas. Estudos têm mostrado que a geoprópolis possui diversas atividades farmacológicas como, antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, imunomoduladora, antitumoral e entre outras. Além da importância para a área da saúde, esta possui potencialidade para ser um bom indicador de agentes contaminantes em solos. Visto a ampla aplicação da geoprópolis em diversas áreas e setores e a falta de estudos deste produto apícola, neste trabalho foi estimada a composição química e determinado os minerais presentes nas amostras de geoprópolis pelas técnicas, espectroscopia fotoacústica (*PAS*) e fluorescência de raio x por energia dispersiva (*EDXRF*). Nos resultados dos espectros fotoacústicos foram observadas principalmente bandas entre 250 e 350 nm e outras entre 350 e 400 nm, características de alguns compostos fitoquímicos presentes na geoprópolis como quercitina, crisina, ácido p-cumárico, ácido gálico e kaempferol. No entanto, em geral, os espectros fotoacústicos são muito semelhantes, dificultando a distinção entre amostras. Pela análise qualitativa da técnica de *EDXRF*, foram identificados os seguintes minerais: Al, Si, P, S, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn, Sr e Zr. Na análise quantitativa, foi desenvolvido um método de calibração empírica a partir do material de referência SQC001, o qual foi validado para um erro menor que 20%. Desta forma, foram estimadas as concentrações dos minerais Si, K, Ca, Cr, Mn, Fe e Zn, presentes nas amostras. Também, por meio dos dados das técnicas *PAS* e *EDXRF*, as amostras das espécies *M. marginata*, *M. quadrifasciata* e *T. angustula* foram classificadas por regressão logística (RL) e análise de componentes principais (*PCA*), onde os resultados mostraram que tanto a composição química quanto mineral das amostras podem ser utilizadas para a classificação das espécies de abelhas produtoras da geoprópolis.

Palavras-chave: Geoprópolis; Espectroscopia fotoacústica; Fluorescência de raios X por energia dispersiva; Análises multivariadas.

ABSTRACT

Geopropolis is an apicultural product composed mainly of soil, about 90%, in addition to plant resins and enzymatic secretions of bees, which are used as raw material for the construction of internal and external structures of the hive. It has several biological properties, which are associated with the geographic characteristics where the colony is located, according to the flora, climate and bee species. Studies have shown that geopropolis has several pharmacological activities such as antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, immunomodulatory, antitumor and among others. In addition to its importance for the health area, it has the potential to be a good indicator of contaminants in soils. Considering the wide application of geopropolis in several areas and sectors and the lack of studies of this bee product, in this work the chemical composition was estimated and the minerals present in the geopropolis samples were determined by the techniques, photoacoustic spectroscopy (PAS) and x-ray fluorescence by dispersive energy (EDXRF). In the photoacoustic spectra results, bands between 250 and 350 nm and others between 350 and 400 nm were observed, characteristic of some phytochemical compounds present in geopropolis such as quercetin, chrysin, p-coumaric acid, gallic acid and kaempferol. However, in general, the photoacoustic spectra are very similar, making it difficult to distinguish between samples. Through the qualitative analysis of the EDXRF technique, the following minerals were identified: Al, Si, P, S, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn, Sr and Zr. In the quantitative analysis, an empirical calibration method was developed from the reference material SQC001, which was validated for an error of less than 20%. In this way, the concentrations of Si, K, Ca, Cr, Mn, Fe and Zn minerals present in the samples were estimated. Also, through the data of the PAS and EDXRF techniques, the samples of the species *M. marginata*, *M. quadrifasciata* and *T. angustula* were classified by logistic regression (LR) and principal component analysis (PCA), where the results showed that both the chemical composition and mineral from the samples can be used to classify the species of bees that produce geopropolis.

Keywords: Geopropolis; Photoacoustic spectroscopy; Energy dispersive X-ray fluorescence; Multivariate analyses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Gráfico do número de amostras de geoprópolis.....	17
Figura 2: Obtenção dos pós das amostras de geoprópolis.....	18
Figura 3: Prensa hidráulica manual Specac e pastilhas finalizadas e armazenadas nos porta amostras para análise de <i>EDXRF</i>	19
Figura 4: Esquema representativo do sistema experimental da técnica <i>PAS</i>	20
Figura 5: Esquema representativo do funcionamento da técnica de <i>EDXRF</i> , com imagem do equipamento.....	21
Figura 6: Espectro fotoacústico das amostras de geoprópolis.....	24
Figura 7: Espectros fotoacústicos normalizados das amostras de geoprópolis: a) todas as amostras, b) <i>M. quadrfaciata</i> , c) <i>T. angustula</i> e d) <i>M. marginata</i>	25
Figura 8: Espectros de fluorescência de raios X de energia dispersiva das amostras de geoprópolis.....	26
Figura 9: Espectros de fluorescência de raios X de energia dispersiva das amostras de geoprópolis: a) todas as amostras, b) <i>M. quadrfaciata</i> , c) <i>T. angustula</i> e d) <i>M. marginata</i>	28
Figura 10: Gráfico <i>Score PC1</i> e <i>PC2</i> baseado nos dados espectrais da técnica <i>PAS</i> , classificados de acordo com a espécie de abelha (linhas sólidas) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (linhas tracejadas).....	37
Figura 11: Gráfico <i>Score PC1</i> e <i>PC2</i> baseado nos dados qualitativos da técnica <i>EDXRF</i> , classificados de acordo com a espécie de abelha (linhas sólidas) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (linhas tracejadas).....	39
Figura 12: Gráfico <i>Score PC1</i> e <i>PC2</i> baseado nos dados quantitativos da técnica <i>EDXRF</i> , classificados de acordo com a espécie de abelha (linhas sólidas) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (linhas tracejadas).....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Compostos identificados em diferentes amostras de geoprópolis.....	6
Tabela 2: Condições experimentais do modelo de calibração usando o certificado SQC001.....	22
Tabela 3: Resultados do método de calibração empírica com amostra padrão SQC001. Os analitos que ficaram com concentração numa faixa de erro menor que 20%, estão destacados em verde.....	29
Tabela 4: Comparação das concentrações dos minerais presentes nas amostras de geoprópolis.....	30
Tabela 5: Resumo da validação cruzada do modelo de classificação de regressão logística dos dados espectrais da técnica <i>PAS</i>	31
Tabela 6: Resumo da validação do modelo de classificação de regressão logística dos dados espectrais da técnica <i>PAS</i>	31
Tabela 7: Matriz de confusão da regressão logística dos dados espectrais da técnica <i>PAS</i> para classificação das espécies de abelhas <i>M. marginata</i> , <i>M. quadrifasciata</i> e <i>T. angustula</i>	32
Tabela 8: Precisão detalhada por classe do modelo logístico dos dados espectrais da técnica <i>PAS</i>	32
Tabela 9: Resumo da validação cruzada do modelo de classificação de regressão logística dos dados qualitativos da técnica <i>EDXRF</i>	33
Tabela 10: Resumo da validação do modelo de classificação de regressão logística dos dados qualitativos da técnica <i>EDXRF</i>	33
Tabela 11: Matriz de confusão da regressão logística dos dados qualitativos da técnica <i>EDXRF</i> para classificação das espécies de abelhas <i>M. marginata</i> , <i>M. quadrifasciata</i> e <i>T. angustula</i>	34
Tabela 12: Precisão detalhada por classe do modelo logístico dos dados qualitativos da técnica <i>EDXRF</i>	34
Tabela 13: Resumo da validação cruzada do modelo de classificação de regressão logística dos dados quantitativos da técnica <i>EDXRF</i>	35
Tabela 14: Resumo da validação do modelo de classificação de regressão logística dos dados quantitativos da técnica <i>EDXRF</i>	35

Tabela 15: Matriz de confusão da regressão logística dos dados quantitativos da técnica <i>EDXRF</i> para classificação das espécies de abelhas <i>M. marginata</i> , <i>M. quadrifasciata</i> e <i>T. angustula</i>	36
Tabela 16: Precisão detalhada por classe do modelo logístico dos dados quantitativos da técnica <i>EDXRF</i>	36

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AG	Algoritmo genético
EDXRF	<i>Energy Dispersive X-ray Fluorescence</i> (fluorescência de raios X por energia dispersiva)
EPP	Extrato etanólico de própolis
FAAS	<i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i> (espectrometria de absorção atômica com chama)
FP	<i>False Positive</i> (falso positivo)
FP	<i>Fundamental Parameters</i> (parâmetros fundamentais)
FT-IR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier)
GC-MS	<i>Gas Chromatography couple with Mass Spectrometry</i> (cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa)
GFAAS	<i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i> (espectrometria de absorção atômica em forno de grafite)
HCA	<i>Hierarchical Cluster Analysis</i> (análise de agrupamentos hierárquicos)
HPLC-DAD	<i>High Performance Liquid Chromatography with Diode Arrangement Detector</i> (cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo)
ICP-MS	<i>Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometer</i> (espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente)
ICP-OES	<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i> (espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente)
INAA	<i>Instrumental Neutron Activation Analysis</i> (análise instrumental de ativação de nêutron)
MAE	<i>Mean Absolute Error</i> (erro médio absoluto)
MIA	<i>Multivariate Image Analysis</i> (análise multivariada de imagens)
MPLS	<i>Modified Partial Least Square</i> (regressão por mínimos quadrados parciais modificados)
NIR	<i>Near Infrared</i> (infravermelho próximo)
PAS	<i>Photoacoustic Spectroscopy</i> (espectroscopia fotoacústica)
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (análise de componentes principais)
PLS	<i>Partial Least Square</i> (regressão por mínimos quadrados parciais)

<i>RL</i>	Regressão logística
<i>RMSE</i>	<i>Root Mean Square Error</i> (raiz do erro quadrático médio)
<i>ROC</i>	<i>Receiver Operator Characteristic</i> (característica de operação do receptor)
<i>SD</i>	<i>Standard Deviation</i> (desvio padrão)
<i>SDD</i>	<i>Silicon Drift Detector</i> (detector de desvio de silício)
<i>TP</i>	<i>True Positive</i> (verdadeiro positivo)
<i>UATR</i>	<i>Universal Attenuated Total Reflection</i> (reflexão total atenuada universal)
<i>UPLC-MS/MS</i>	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry</i> (cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas)
UV-Vis	Ultravioleta-visível
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda máximo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	4
2.1 OBJETIVO GERAL.....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	5
3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E MINERAL DA GEOPRÓPOLIS.....	5
3.2 ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA (PAS).....	9
3.3 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR ENERGIA DISPERSIVA (EDXRF).....	10
3.4 APLICAÇÃO DA QUIMIOMETRIA ÀS TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS.....	12
3.4.1 Algoritmos Genéticos.....	13
3.4.2 Regressão Logística (RL).....	14
3.4.3 Análise de Componentes Principais (PCA).....	15
4 METODOLOGIA.....	17
4.1 AMOSTRAS DE GEOPRÓPOLIS.....	17
4.1.1 Preparação das Amostras para Caracterização.....	18
4.2 OBTENÇÃO DOS ESPECTROS FOTOACÚSTICOS.....	19
4.3 CARACTERIZAÇÃO POR EDXRF.....	21
4.4 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS.....	23
4.4.1 Pré-Processamento dos Dados.....	23
4.4.2 Obtenção dos Modelos de Regressão Logística.....	23
4.4.3 Fatores das Análises de Componentes Principais.....	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1 INTERPRETAÇÃO DOS ESPECTROS FOTOACÚSTICOS.....	24
5.2 INTERPRETAÇÃO DOS ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X.....	26
5.2.1 Determinação dos Teores dos Minerais Presentes nas Amostras de Geopropolis.....	28
5.3 AVALIAÇÃO DOS MODELOS DE REGRESSÃO LOGÍSTICA.....	30

5.4 IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE GEOPRÓPOLIS POR ESPÉCIES DE ABELHAS POR MEIO DE ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS.....	36
6 CONCLUSÕES.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
ANEXO A.....	49
ANEXO B.....	50
ANEXO C.....	54
ANEXO D.....	59

1 INTRODUÇÃO

A classificação biológica das abelhas segue a seguinte sequência: subordem *Apocrita*, superfamília *Apoidea*, família *Apidae*, subfamília *Apinae*, com as espécies sociais distribuídas nas tribos *Apini*, *Meliponini* e *Bombini*. No Brasil, a principal tribo é a *Meliponini*, pois engloba as representantes dos gêneros *Trigona* e *Melipona*, as mais utilizadas economicamente no país. As abelhas da tribo *Meliponini* podem ser denominadas como abelhas nativas, abelhas indígenas sem ferrão ou meliponíneos. Mas popularmente, recebem diferentes denominações como mandaçaia, urucu, jandaíra, jataí, tiúba, mirim, mosquito e entre outras, dependendo da região e da espécie específica (SFORCIN, 2017).

A técnica de criação das abelhas da tribo *Meliponini* é chamada meliponicultura e o local de criação é denominado meliponário, onde ocorre as extrações da própolis e geoprópolis. A própolis é um material resinoso que apresenta aroma intenso e característico e possui forte propriedade adesiva. As abelhas elaboram a própolis a partir de secreções de árvores e de flores, folhas e pólen, a qual é composta, de forma genérica, por 50% de resinas, 30% de ceras, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de outras substâncias orgânicas. A própolis é composta por mais de 300 compostos químicos, sendo que os flavonoides representam cerca de 25% do total destes compostos (MARCUCCI, 1995; OROIAN; DRANCA; URSACHI, 2020).

Além da própolis, os meliponíneos produzem a geoprópolis. Ela é composta principalmente por solo, cerca de 90%, além de resinas vegetais e secreções enzimáticas das abelhas, que são utilizadas como matéria-prima para a construção de estruturas internas e externas da colmeia (BONSUCCESSO et al., 2018). De forma similar à própolis, a geoprópolis possui uma complexa composição química e diversas propriedades biológicas. Estas últimas são principalmente atribuídas a seus componentes fitoquímicos, sendo que a influência do conteúdo inorgânico da geoprópolis, como minerais e partículas de solos, nas propriedades farmacológicas não tem sido investigada. (LAVINAS et al., 2019)

Tanto a composição fitoquímica quanto as propriedades biológicas da geoprópolis estão associadas às características geográficas onde a colônia se encontra, de acordo com a flora, clima e espécies de abelhas. Dentre as principais classes de compostos orgânicos identificadas na geoprópolis estão os ácidos graxos, ácidos orgânicos, açúcares, álcoois, esteroides, além de compostos polifenólicos, triterpenos e saponinas (FERREIRA et al., 2019; LAVINAS et al., 2019)

No Brasil, extratos de geoprópolis e mel de abelhas sem ferrão são amplamente utilizados na medicina popular principalmente pelas comunidades indígenas. Estudos têm mostrado que a geoprópolis possui diversas atividades farmacológicas como, antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, imunomoduladora, antitumoral e entre outras (DA CUNHA et al., 2013 e LAVINAS et al., 2019).

Além da importância para a medicina, a geoprópolis tem se mostrado também, um bom indicador de agentes contaminantes em solos. Pesquisas indicam concentrações de metais em amostras de própolis, sugerindo que os níveis de elementos específicos nas amostras estão relacionados ao local da colheita, podendo atribuir a origem geográfica da própolis. Por esta razão, a composição química da própolis pode ser utilizadas como bioindicador eficaz de contaminação ambiental em colmeias e arredores (FINGER et al., 2014), podendo garantir a segurança e a qualidade da própolis para comercialização (INMACULADA GONZÁLEZ-MARTÍN et al., 2015). Visto que a geoprópolis possui grande quantidade de resíduos de solos em sua composição, a sua investigação à procura de elementos tóxicos é de grande relevância. Contudo, existem poucos estudos sobre a composição química e mineral da geoprópolis, o que dificulta a identificação e padronização destes compostos e seu potencial farmacológico.

Estudos sobre a composição fitoquímica, identificação mineral e outras características que revelem informações importantes sobre a própolis e a geoprópolis têm se intensificado cada vez mais. No que diz respeito ao comportamento no UV-Vis, as bandas de absorção dos compostos fitoquímicos presentes em amostras de própolis variam, em geral, entre 254 nm e 370 nm (GARDANA et al., 2007).

Técnicas como a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (*GC-MS*) (BANKOVA et al., 1998; VELIKOVA et al., 2000), espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite (*GFAAS*), espectrometria de absorção atômica com chama (*FAAS*) (FINGER et al., 2014), espectroscopia no infravermelho próximo (*NIR*) (INMACULADA GONZÁLEZ-MARTÍN et al., 2015), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (*UPLC-MS/MS*) (CARDOZO et al., 2015), cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao detector por arranjo de diodos (*HPLC-DAD*) (TORRES et al., 2018), espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (*ICP OES*) (BONSUCESSO et al., 2018), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (*ICP-MS*) (FERREIRA et al., 2019), fluorescência de raios X por energia dispersiva (*EDXRF*) (ROTICH, 2019 e FIAMEGOS et al., 2020), análise multivariada de imagens (*MIA*) e *NIR*

(TURCO et al., 2020), junto de análises multivariadas, vêm sendo aplicadas no estudo da composição fitoquímica e mineral da geoprópolis.

Visto o grande potencial da geoprópolis, fica evidente a busca pela aplicação de diferentes métodos analíticos para analisar a sua composição. Por isso, este trabalho estima a composição fitoquímica e determina a composição mineral de amostras de geoprópolis por meio das técnicas, espectroscopia fotoacústica (*PAS*) e a *EDXRF*, sendo estas de análise rápida e não destrutiva, que não requer solventes ou pré-tratamento complexos das amostras. Também, utilizando abordagens quimiométricas, como a regressão logística (RL) e análise de componentes principais (*PCA*), obteve-se métodos de classificação e predição que ajudam a investigar as características da geoprópolis.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estimar a composição química e determinar a composição mineral em amostras de geoprópolis por meio das técnicas *PAS* e *EDXRF*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o espectro de absorção das amostras de geoprópolis utilizando a *PAS*.
- Determinar a composição mineral das amostras de geoprópolis por meio da técnica de *EDXRF*.
- Aplicar métodos de análises multivariadas aos dados das técnicas *PAS* e *EDXRF*, afim de correlacionar parâmetros que auxiliem na classificação das amostras e determinação de sua composição.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E MINERAL DA GEOPRÓPOLIS

A geoprópolis provinda das abelhas da tribo *Meliponini* possui complexa composição química, a qual está associada as características geográficas onde a colônia se encontra, de acordo com a flora, clima e espécies de abelhas (FERREIRA et al., 2019; VELIKOVA et al., 2000). Entre os primeiros estudos sobre a composição química da geoprópolis, destaca-se o estudo feito por BANKOVA et al., 1998, por meio da técnica da *GC-MS* analisaram amostras de geoprópolis produzidas pelas espécies *Melipona compressipes*, *Tetragona clavipes* e *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Nessas amostras, foram identificados ácidos alifáticos e aromáticos, fenóis e álcoois aromáticos, aldeídos e cetonas aromáticos, açúcares, flavonoides, diterpenos, triterpenos e outros componentes.

Outras pesquisas sobre amostras de geoprópolis de espécies da tribo *Meliponini* coletadas em várias regiões do Brasil, identificaram, por meio da técnica *GC-MS*, a presença de ácidos benzoicos, ácidos di-hidrocinâmicos, ácidos cinâmicos, prenil cafeato, cafeato de benzila, fenetil cafeato, ácidos cumáricos, ácidos diterpênicos, álcoois triterpênicos e açúcares (VELIKOVA et al., 2000).

Dentre os estudos recentes sobre a composição da geoprópolis, ARAUJO et al., 2015, investigaram amostras coletadas no nordeste do Maranhão, providas da espécie *Melipona fasciculata Smith* usando a análise *GC-MS*. Os principais constituintes dos compostos da geoprópolis foram carboidratos e seus derivados, triterpenos, ácido anacárdico, alquilresorcinóis e álcoois de açúcar.

Além dos estudos citados acima, CARDOZO et al., 2015, analisaram amostras de geoprópolis da região de Prudentópolis – PR produzidas pelas abelhas popularmente conhecidas como jataí (*Tetragonisca angustula*), mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*) e mandurí (*Melipona marginata*) por meio da *UPLC-MS/MS*, e observaram a presença de fenóis, flavonoides e outros compostos orgânicos, como vanilina, ácido p-cumárico, 3-hidróxi-4-metóxi-cinamaldeído, ácido cafeico, canferol, canferida, di-hidrocanferida, ácidos E/Z comúnicos, ácido agatálico, ácido cuprêssico, ácido isocuprêssico e ácido 15-acetóxi-isocuprêssico.

Ainda sobre os trabalhos de CARDOZO et al., 2015, dados espectrais da espectroscopia no ultravioleta visível (UV-Vis) constataram bandas de absorção das amostras de geoprópolis.

Foram observados máximos de absorção em 232 nm e entre 270 e 285 nm no espectro UV-Vis de todas as amostras. Apenas as geoprópolis de *Melipona marginata* apresentaram uma banda de absorção fraca entre 304 e 314 nm, possivelmente devido à presença de baixos teores de fenilpropanoides, como o ácido p-cumárico, ou também devido à presença de flavonóis, como a galangina. Outras observações feitas no espectro de absorção foram em 275 nm e 232 nm, que podem ser atribuídas à presença de derivados do ácido gálico e por di-hidroflavonóis, como a di-dihidrocanferida, respectivamente. Foi constatado que a ausência de bandas intensas com máximos de absorção em torno de 245 nm, 290 nm e 330 nm se deve à ausência ou baixas concentrações de monômeros ou dímeros dos ácidos cafeoilquínicos.

Em geral, os espectros UV-Vis típicos de flavonoides incluem duas bandas de absorbância, a banda A, na faixa de 310-350 nm para flavonas e 350-385nm para flavonóis, e a banda B encontrada na faixa de 250-290 nm, sendo praticamente o mesmo em todos os subgrupos de flavonoides (TSIMOGLIANNIS et al., 2007). A Tabela 1 mostra alguns dos compostos que podem estar presentes na geoprópolis e seus respectivos valores de absorção.

Tabela 1: Compostos identificados em diferentes amostras de geoprópolis

Compostos	Máximos de absorção (nm)		Referências
	Banda A	Banda B	
Flavanona	321	253	(CHANG; CHANG, 2005)
Flavona	297	253	(CHANG; CHANG, 2005)
Quercitina	369	253	(CHANG; CHANG, 2005; VIUDA-MARTOS et al., 2008)
Crisina	313	269	(CHANG; CHANG, 2005; VIUDA-MARTOS et al., 2008)
Vanilina	309	291	(CHANG; CHANG, 2005)
Ácido p-cumárico	340	270	(CARDOZO et al., 2015; CHANG; CHANG, 2005)
Ácido gálico	-	273	(CARDOZO et al., 2015; CHANG; CHANG, 2005)
Ácido cafeico	-	325	(CHANG; CHANG, 2005)
Kaempferol	365	265	(CHANG; CHANG, 2005; VIUDA-MARTOS et al., 2008)

Dos compostos mostrados na Tabela 1, outros como 3-hidroxi-4-metoxi-cinamaldeído, canferida, ácidos E/Z comuns dihidrocanferídeos, ácido agatálico, ácido cupresico, ácido isocupressico e ácido 15-acetoxi-isocupressico, também podem ser encontrados em amostras de geoprópolis (CARDOZO et al., 2015).

Além da importância da composição química e das propriedades físico-químicas da geoprópolis, pesquisadores têm relatado que o estudo da composição da geoprópolis é uma ferramenta eficiente para o monitoramento ambiental. FINGER et al., 2014, determinaram as

concentrações, de amostras de diferentes regiões do estado do Paraná, Brasil, de onze metais representativos (Al, Ca, Cd, Cr, Cu, K, Mg, Mn, Na, Pb e Zn) em quarenta e duas amostras de própolis da espécie *Apis mellifera*, as quais foram medidas por *GFAAS* e *FAAS*. Os níveis de Al, Ca e Mg foram estatisticamente diferentes em algumas regiões do Paraná e podem ser usados para atribuir a origem geográfica da própolis. A concentração média de Cd, Cr e Pb na própolis bruta permitiu a identificação de áreas específicas com contaminação ambiental. Nesse mesmo trabalho, eles também determinaram o espectro de absorção dos íons metálicos presentes nas amostras de própolis, sendo que pela *FAAS* constatou as seguintes emissões: 309,3 nm (Al); 324,7 nm (Cu); 285,2 nm (Mg); 279,5 nm (Mn); 213,9 nm (Zn); 422,7 nm (Ca); 589 nm (Na); 766,5 nm (K). Pela *GFAAS* as emissões constatadas, foram: 357,9 nm (Cr); 283,3 nm (Pb); 228,8 nm (Cd).

INMACULADA GONZÁLEZ-MARTÍN et al., 2015, avaliaram o potencial da técnica *NIR* com sondas de fibra óptica de refletância remota para determinar a composição mineral da própolis. Noventa e uma amostras de própolis foram coletadas no Chile (região Bio-Bio) e Espanha (regiões Castilla-León e Galicia). Os minerais medidos foram Al, Ca, Fe, K, Mg, P, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn, onde os resultados demonstraram que a capacidade de previsão pode ser considerada boa, indicando que o método *NIR* é comparável aos métodos químicos, além de permitir rápida previsão de elementos potencialmente tóxicos na própolis antes do consumo.

Nesse mesmo estudo, para esses metais foram determinadas as faixas de seus espectros de absorção sendo que os seus máximos e mínimos foram: 1330 e 1556 nm (Al); 1500 e 1542 nm (Ca); 1228 e 1112 nm (Fe); 1481,3 e 1224 nm (K); 1520 e 1532 nm (Mg); 1554 e 1968 nm (P); 1366 e 1590 nm (Cr); 1244 e 1356 nm (Cu); 1520 e 1558 nm (Ni); 1820 e 1968 nm (Pb); 1816 e 1976 nm (Zn). Os elementos minerais determinados nesse trabalho mostraram uma correlação entre a concentração e a absorbância em comprimentos de onda no intervalo de 1510-1550 nm, sendo que essa região do espectro corresponde à absorbância de dois anéis aromáticos da estrutura básica dos flavonoides e a vibração do 2º harmônico do grupo carbonila dos flavonoides. Outros elementos minerais mostraram correlações com valores de comprimento de onda próximos a 1400 e 1900 nm relacionados aos *overtone*s (vibrações fundamentais de estiramento entre os átomos das moléculas) O-H da água. Os resultados de INMACULADA GONZÁLEZ-MARTÍN et al., 2015, mostraram que é possível determinar a composição desses metais nas faixas indicadas em amostras de própolis de diferentes origens por aplicação direta de uma sonda de fibra óptica *NIR*.

Também, no estudo da própolis, TORRES et al., 2018, investigaram a composição química e as propriedades antioxidantes e antibacterianas de extratos etanólicos de própolis (EEP) de *Melipona quadrifasciata* e *Tetragonisca angustula*, da região de Rio das Antas, RS, Brasil. A análise por *HPLC-DAD* mostrou que o EEP de *Melipona quadrifasciata* tem uma composição química mais complexa que o EEP de *Tetragonisca angustula*. Além disso, as análises por *UPLC-MS* do EEP de *Melipona quadrifasciata* indicaram flavonoides e terpenos como constituintes principais.

Sobre a geoprópolis, BONSUCESSO et al., 2018 determinaram, via *ICP OES*, a concentração de metais tóxicos na geoprópolis de *Melipona scutellaris* na região metropolitana de Salvador, Bahia. Os elementos evidenciados pelo estudo foram Fe, Ba, Cd, Cr, Cu, Mo, Ni, Pb e Zn, variando a presença destes entre áreas não urbanas e urbanas. O estudo constatou que a geoprópolis pode ser considerada um bom indicador ambiental, mesmo em áreas com baixa contaminação.

Já DUTRA et al., 2019, investigaram a composição química da geoprópolis produzida pela *Melipona fasciculata* na região de savana do Maranhão, Brasil, onde foram identificados por meio da técnica *GC-MS*, ácidos graxos, ácidos orgânicos, ácidos fenólicos, triterpenos, esteroides, açúcares e álcoois.

No estudo das geoprópolis produzidas por várias tribos de abelhas, FERREIRA et al., 2019, analisaram amostras das espécies *Melipona mondury*, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona scutellaris*, *Melipona seminigra* e *Tetragonisca angustula*, obtidas em apiários associados da FASC (Associação Federada de Apicultores do Estado de Santa Catarina), pela técnica de *ICP-MS*, utilizando a análise de componentes principais (*PCA*) e a análise de agrupamentos hierárquicos (*HCA*), como ferramentas quimiométricas. Os elementos evidenciados nas composições minerais foram Ag, Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Na, Ni, Pb, Se, V e Zn. O estudo constatou que a geoprópolis é uma fonte potencial de compostos naturais que podem melhorar a qualidade dos alimentos, aumentando o conteúdo bioativo e prevenindo danos ao oxigênio nos alimentos, assim como para aplicação farmacológica na área da saúde.

No trabalho de TURCO, 2019, os dados provindos da técnica *NIR* sobre extratos etanólicos de geoprópolis de abelhas nativas brasileiras, registraram o espectro de absorção das amostras. Constatou-se que na região do infravermelho próximo ocorre a absorção de *overtones* e os espectros dependem das características física e composição química das substâncias presentes nas amostras. Pelos espectros de *NIR* foi 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} , onde há diferença apenas nas intensidades. Averiguou-se que as bandas entre 5400 até 6000cm^{-1} provavelmente correspondem a 1ª *overtone* da ligação C-H, enquanto a banda que compreende a faixa entre 8000 a 9000cm^{-1} representa caracteristicamente a 2ª *overtone* de C-H. A faixa entre 5000cm^{-1} apresenta as combinações de O-H.

3.2 ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA (PAS)

A PAS tem como princípio físico o efeito fotoacústico. Este efeito se baseia na conversão de energia luminosa absorvida pela amostra em calor por meio de processos de desexcitação não radioativa. Quando a luz modulada é absorvida por uma amostra que se encontra dentro de uma câmara fechada tendo um gás como meio (ar), a cada pulso de luz, é gerado um pequeno gradiente de temperatura no material. O calor passa por condução para o ar, gerando uma onda de pressão, a qual é detectada por um microfone presente no interior da caixa, que resulta no sinal fotoacústico. A intensidade do sinal gerado dependerá da frequência de modulação da luz incidente e os resultados podem nos fornecer dados qualitativos e quantitativos a respeito das amostras a serem analisadas (MELLO; LÓIO; VIANA, 2010).

Existem vantagens da PAS em relação aos outros tipos de espectroscopias ópticas. Com ela é possível medir diretamente a absorção, sem haver interferências nas medidas. Ela não necessita de tratamentos químicos complexos para a preparação das amostras, permite estudar a composição e propriedades ópticas e térmicas dos materiais (HERNANDEZ-AGUILAR et al., 2020).

Já FAUSTO VAZ , 2014, em sua dissertação, utilizou a PAS na identificação de biomoléculas funcionais presentes em espécies de frutas e vegetais. A técnica prova ser uma ferramenta experimental de grande potencial e eficiência na identificação de biomoléculas em sistemas biológicos “*in natura*”, sem necessidade de utilização de processos exaustivos de extração molecular, uma vez que os comprimentos de onda (λ_{max}) que representam os picos de absorção em cada amostra de frutas e vegetais investigados (açai, cupuaçu, castanha do brasil, maçã vermelha, uva globe, uva preta, uva rubi, acerola, caju vermelho, caju amarelo, caqui, cebola roxa, cenoura e tomate), evidenciam a existência de biomoléculas funcionais tanto do grupo dos polifenóis como nos carotenóides.

No trabalho de MATOS et al., 2018, a *PAS* na faixa visível foi utilizada para analisar a capacidade nutricional de amostras de solo, submetidas a diferentes tratamentos. Essa análise foi realizada por meio dos picos de absorção das clorofilas A e B e da cutícula das folhas de mamoeiro plantadas em solos com adição de biocarvão e com (sem) micorrizas. Todas as amostras tratadas apresentaram um aumento nos picos de atividade da clorofila em relação à amostra base, e as amostras contendo micorriza e biocarvão apresentaram os maiores picos de atividade da clorofila, provando ser o melhor tratamento de fertilização do solo. Desta forma no estudo provou-se a eficiência da *PAS*, destacando-a como alternativa às técnicas convencionais, pois apresentou respostas mais rápidas e com alta sensibilidade às mudanças morfológicas das amostras.

3.3 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR ENERGIA DISPERSIVA (*EDXRF*)

A técnica de *EDXRF* surgiu com a criação dos detectores semicondutores de silício (Si) e germânio (Ge), capaz de discriminar raios X de energias próximas. Ela é uma técnica analítica atômica não destrutiva usada para obter informações qualitativas e quantitativas da composição elementar de uma determinada amostra. É baseada na medição das intensidades de raios X característicos ($K\alpha$, $K\beta$, $L\alpha$, $L\beta$, ...), emitidos pelos elementos que constituem a amostra. Os átomos dos materiais, ao serem irradiados por um feixe de raios X, por possuírem energia bem definidas, a análise qualitativa é possível. Como a intensidade dos raios X característicos é função da concentração, a análise quantitativa também pode ser feita. Existem vários métodos de análise para o tratamento dos dados provindos da técnica de *EDXRF*. Atualmente, na maioria, há um *software* acoplado ao espectrômetro para o tratamento de dados (SANTOS, E. S.; GAMA, E. M.; FRANÇA, R. DA S.; SOUZA, A. S.; MATOS, 2013).

Devido a versatilidade da técnica, ela é empregada em diversos setores e aplicações, como na produção de materiais como cimento e vidro, na mineração, nas indústrias petroquímicas, no estudo de polímeros e setores relacionados, na perícia forense, em produtos farmacêuticos e de saúde, no meio ambiente, na avaliação de alimentos e cosméticos, entre outros.

JUNIOR, O. R. A., et al., 2009, utilizaram uma técnica portátil da *EDXRF* para analisar a água e sedimento de pontos turísticos da cidade de Guarapuava – PR. Nas amostras de água foram determinados Fe, Ni e Cu, onde a coleta apresentou variações de concentrações de uma

época a outra. Evidenciaram um problema de contaminação de Fe, em alguns pontos das regiões em que as amostras foram coletadas. Para as amostras de sedimento, identificaram quantitativamente Ca, Ti, Fe, Zn, Zr e qualitativamente Mn Cu, Sr, Y, Nb, de modo que os elementos Fe e Ti apresentaram valores elevados de concentração. Constataram que a técnica é eficiente para análises quali-quantitativa de amostras de água e sedimentos, pois identificou-se os pontos com possíveis contaminações por elementos específicos.

Na caracterização dos níveis de elementos químicos em solo, WASTOWSKI et al., 2010, realizaram a inspeção em três áreas de solos distintos do *campus* do Centro de Educação Superior Norte do RS, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Por meio dos resultados da técnica *EDXRF*, constataram que esta pode ser utilizada para avaliação das modificações existentes nos teores de elementos químicos presentes no solo submetido a diferentes sistemas de uso e manejo.

Outra aplicação da técnica foi testada por MANOHARA; BELAGALI, 2017, onde estudaram a qualidade de compostos no bairro Mysore na cidade de Vidyaranyapura, Índia, para a compostagem. Averiguaram que a técnica de *EDXRF* além de ser não-destrutiva, é econômica e capaz de estimar as concentrações de vários metais presentes nas amostras simultaneamente, economizando tempo, sendo significativa na avaliação da qualidade de compostos em relação a outras técnicas comumente utilizadas para este fim.

Já ROTICH, 2019, obteve a caracterização físico-química e do conteúdo mineral do mel dos condados Baringo e Kitui no Quênia. A utilização da *EDXRF* foi eficiente podendo constatar que o mel de ambas as regiões não é contaminado por atividades agrícolas potenciais, como inseticidas ou tráfego pesado e indústrias, destacando um fator positivo para as indústrias de alimentos das regiões.

Em estudo para a classificação de mel de acordo com a variedade botânica, FIAMEGOS et al., 2020, utilizaram a fluorescência de raios X por energia dispersiva combinada com uma modelagem quimiométrica. A determinação do perfil da composição elementar de méis por *EDXRF* provou ser uma técnica apropriada para confirmar a variedade botânica e a origem geográfica dos méis, conforme indicado nos rótulos sob os quais são comercializados.

No estudo morfológico de abelhas, LEAL et al., 2019, tiveram como objetivo a caracterização das abelhas *Scaptotrigona affabra Postica*, provindas da região central do estado do Maranhão, localizada no município de Barra do Corda. Os resultados das análises multielementares usando as técnicas de análise instrumental de ativação de nêutrons (*INAA*) e *EDXRF*, foram comparados e ambas se mostraram adequadas e complementares, fornecendo

o conhecimento da composição elementar da abelha *Scaptotrigona Postica*. Os dados desta pesquisa podem indicar a origem botânica das suas resinas e contribuir para entender a relação dessas abelhas com a vegetação ao redor do meliponário.

3.4 APLICAÇÃO DA QUIMIOMETRIA ÀS TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

A quimiometria é uma área que se refere à aplicação de métodos estatísticos e matemáticos a problemas de origem química. Devido ao avanço e a sofisticação das técnicas instrumentais, impulsionada pela entrada de novas tecnologias nos laboratórios de análise, tornaram-se necessários tratamentos de dados mais complexos do ponto de vista matemático e estatístico, a fim de relacionar os sinais obtidos com os resultados desejados (SCHIMIDT; BUENO; POPPI, 2002).

Um modelo estatístico dos métodos multivariados considera a correlação entre muitas variáveis analisadas simultaneamente, permitindo a extração de uma quantidade muito maior de informação e de forma mais segura (NAGATA; BUENO; PERALTA-ZAMORA, 2001). Para a retirada de informações relevantes a partir dos dados experimentais, um dos métodos padrões é a análise de componentes principais (*PCA*). Com a *PCA* é possível identificar os padrões dominantes dos dados, tais como grupos e tendências.

No trabalho de FINGER et al., 2014, os dados quantitativos obtidos de algumas amostras de própolis foram avaliados pela *PCA* para obter a relação entre as amostras de própolis de acordo com seus níveis de metais tóxicos. No estudo também foi efetuada uma análise de variância de um fator (*ANOVA* de uma via) seguida de um teste post-hoc de Fisher para verificar diferenças estatísticas entre os valores médios no nível de confiança de 95%. Os resultados do método empregado constataram que a própolis é um bioindicador eficaz, por identificar os minerais presentes nas amostras.

Corroborando a ideia da construção de modelos estatísticos, INMACULADA GONZÁLEZ-MARTÍN et al., 2015, utilizaram o método de regressão de mínimos quadrados parciais modificados (*MPLS*) para desenvolver um modelo de calibração *NIR*. Os resultados demonstraram que a capacidade de previsão pode ser considerada boa, indicando que o método *NIR* é comparável aos métodos químicos, sendo que este é interessante devido a rápida previsão de elementos potencialmente tóxicos na própolis antes do consumo.

Acrescentando-se, os estudos de FIAMEGOS et al., 2020, mostraram que a técnica de *EDXRF* aliada a modelos de *PCA* e *PLS-DA* é de grande relevância, pois permitiram uma

ótima classificação de mel, confirmando a variedade botânica e a origem geográfica destes, conforme indicado nos rótulos sob os quais são comercializados.

O trabalho de TURCO et al., 2020, também confirma a credibilidade da aplicação da quimiometria no estudo da composição de produtos oriundos das abelhas. Os dados provindos das técnicas *MIA* e *NIR* sobre extratos etanólicos de geoprópolis de abelhas nativas brasileiras foram utilizados para construir modelos de regressão pela *PLS*. Os resultados mostraram que a metodologia pode ser potencialmente usada para prever o conteúdo total de flavonoides e a capacidade antioxidante da geoprópolis com precisão aceitável, tornando a abordagem com tendências de empregabilidade no controle de qualidade de extratos de geoprópolis com as vantagens de ser uma metodologia rápida, de baixo custo e ecológica.

3.4.1 Algoritmos Genéticos

Toda otimização possui vários componentes, como o espaço de busca, no qual são consideradas todas as possibilidades de soluções do problema envolvido. Os algoritmos genéticos (AGs), são muito eficientes para busca de soluções ótimas para uma grande variedade de problemas, pois são capazes de identificar e explorar fatores diversos. No caso da variabilidade das amostras de geoprópolis, investigadas neste trabalho, este método tem grande aplicabilidade.

Os AGs são métodos de otimização e busca inspirados nos mecanismos de evolução de populações de seres vivos. Foram introduzidos por John Holland em 1975. Esses algoritmos seguem o princípio da seleção natural e sobrevivência do mais apto, declarado em 1859 pelo naturalista e fisiologista inglês Charles Darwin. Nas palavras de Darwin: “Quanto melhor um indivíduo se adaptar ao seu meio ambiente, maior será sua chance de sobreviver e gerar descendentes” (SILVA et al., 1999).

O primeiro passo de um AG típico é a geração de uma população inicial de cromossomos, que é formada por um conjunto aleatório de cromossomos que representam possíveis soluções do problema a ser resolvido. Durante o processo evolutivo, esta população é avaliada e cada cromossomo recebe uma nota (aptidão), refletindo na qualidade da solução que ele representa. Em geral, os cromossomos mais aptos são selecionados e os membros menos aptos são descartados.

Os membros selecionados podem sofrer modificações em suas características fundamentais por meio dos operadores de *crossover* e mutação, gerando descendentes para a

próxima geração. Este processo é repetido até que uma solução satisfatória seja encontrada. As vantagens desse algoritmo são que funcionam tanto com parâmetros contínuos como discretos ou uma combinação deles, realizam buscas simultâneas em várias regiões do espaço de busca, pois trabalham com uma população e não com um único ponto, o que torna um bom pré-processador de dados para diversas análises multivariadas (BECKMANN; LIMA; EBECKEN, 2009).

3.4.2 Regressão Logística (RL)

A regressão logística é um método supervisionado que nos permite estimar a probabilidade associada à ocorrência de determinado evento para um conjunto de variáveis explanatórias. Este método busca estimar a probabilidade de a variável dependente assumir um determinado valor em função dos valores conhecidos de outras variáveis independentes. Por se tratar de uma técnica mais genérica e robusta, sua aplicação é apropriada numa grande variedade de situações, entre elas a classificação de indivíduos em categorias (SMOLLE et al., 2017).

Na regressão logística, a probabilidade de ocorrência de um evento pode ser estimada diretamente. No caso da variável dependente Y assumir apenas dois possíveis estados (1 ou 0) e haver um conjunto de p variáveis independentes X_1, X_2, \dots, X_p , o modelo de regressão logística pode ser escrito da seguinte forma (FIGUEIRA, 2006):

$$P(Y = 1) = \frac{1}{1 + e^{-g(x)}} \quad (1)$$

A função $g(x)$ é dada pela relação $g(x) = B_0 + B_1X_1 + \dots + B_pX_p$. Os coeficientes B_0, B_1, \dots, B_p são estimados a partir do conjunto de dados, pelo método da máxima verossimilhança. Neste método, se encontra uma combinação de coeficientes que maximiza a probabilidade de a amostra ter sido observada. Considerando uma certa combinação de coeficientes B_0, B_1, \dots, B_p e variando os valores de X . A equação 1 pode assumir os estados 1 ou 0 quando: $g(x) \rightarrow +\infty$, então $P(Y=1) \rightarrow 1$ ou $g(x) \rightarrow -\infty$, então $P(Y=1) \rightarrow 0$.

Para utilizar o modelo de regressão logística para discriminação de dois grupos, segue a regra: se $P(Y=1) > 0,5$, então classifica-se $Y=1$, e se $P(Y=1) < 0,5$, então classifica-se $Y=0$. Para obter-se uma boa estimativa de eficiência classificatória do modelo, recomenda-se separar o conjunto amostral em duas partes. Uma para estimação do modelo e outra para testar a eficiência da classificação (FIGUEIRA, 2006).

Neste trabalho, o software *Waikato Environment for Knowledge Analysis (WEKA)* foi utilizado para realizar a regressão logística (MARGARET, 2017). Portanto, algumas métricas de avaliação em *machine learning* para classificação foram adotadas. A primeira delas é a matriz de confusão, a qual consiste em uma forma simples de visualizar a performance de um modelo de classificação pelos parâmetros: verdadeiro positivo (ou *TP*, do inglês *True Positive*) ou falso positivo (ou *FP*, do inglês *False Positive*). A matriz de confusão permite visualizar facilmente quantos exemplos foram classificados corretamente e erroneamente em cada classe (FERREIRA, 2022).

Outros parâmetros avaliados foram a precisão, revocação ou sensibilidade (*Recall*), que nos revela quantos fatores foram classificados corretamente como positivos e a métrica F (do inglês, *F-Measure*), a qual leva em consideração tanto a precisão quanto a sensibilidade, sendo que um modelo que apresente uma boa métrica F, é capaz tanto de acertar suas predições (precisão alta) quanto de recuperar os exemplos da classe de interesse (sensibilidade alta). A curva *ROC* (do inglês *Receiver Operating Characteristic*), que pode ser utilizada para avaliar a performance de um classificador para diferentes limiares de classificação, também foi utilizada. Para todos estes parâmetros citados anteriormente, o valor varia de 0 a 1, esperando-se valores maiores que 0,5 e quanto mais próximo de 1, melhor será a avaliação do modelo.

Por fim, foram analisados também, o erro médio absoluto (*MAE*, do inglês *Mean Absolute Error*) e a raiz quadrada do erro médio (*RMSE*, do inglês *Root Mean Square Error*), a qual é definida pela equação 2 (NOVACOSKI et al., 2022):

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

onde n é o número de amostras usadas para a predição e $y_i - \hat{y}_i$ são os valores medidos e preditos, respectivamente.

3.4.3 Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise de Componente Principais ou *Principal Component Analysis (PCA)* foi inventado em 1901 por Karl Pearson. Trata-se de um método não supervisionado que tem por finalidade básica, a análise dos dados usados visando sua redução, eliminação de sobreposições e a escolha das formas mais representativas de dados a partir de combinações

lineares das variáveis originais. Sendo um dos métodos estatísticos de múltiplas variáveis mais simples, é uma maneira de identificar a relação entre as características extraídas de dados (HONGYU; SANDANIELO; OLIVEIRA-JR, 2015).

Esta técnica pode ser utilizada para geração de índices e agrupamento de indivíduos. A análise agrupa os indivíduos de acordo com sua variação, isto é, os indivíduos são agrupados segundo suas variâncias, ou seja, segundo seu comportamento dentro da população, representado pela variação do conjunto de características que define o indivíduo, ou seja, a técnica agrupa os indivíduos de uma população segundo a variação de suas características (MEIRA et al., 2020).

Considere a situação em que observamos \mathbf{p} características de \mathbf{n} indivíduos de uma população. As características observadas são representadas pelas variáveis $X_1, X_2, X_3, \dots, X_p$. A matriz de dados é de ordem $\mathbf{n} \times \mathbf{p}$ e normalmente denominada de matriz \mathbf{X} (VARELLA, 2008):

$$X = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & x_{13} & \dots & x_{1p} \\ x_{21} & x_{22} & x_{23} & \dots & x_{2p} \\ x_{31} & x_{32} & x_{33} & \dots & x_{3p} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{n1} & x_{n2} & x_{n3} & \dots & x_{np} \end{bmatrix}$$

A estrutura de interdependência entre as variáveis da matriz de dados é representada pela matriz de covariância \mathbf{S} ou pela matriz de correlação \mathbf{R} . O entendimento dessa estrutura através das variáveis $X_1, X_2, X_3, \dots, X_p$ é complicada na prática. Assim, objetivo da análise de componentes principais é transformar essa estrutura complicada, representadas pelas variáveis $X_1, X_2, X_3, \dots, X_p$, em uma outra estrutura representada pelas variáveis $Y_1, Y_2, Y_3, \dots, Y_p$, não correlacionadas e com variâncias ordenadas, sendo possível comparar os indivíduos usando apenas as variáveis Y_{is} que apresentam maior variância. A solução surge a partir da matriz de covariância (VARELLA, 2008).

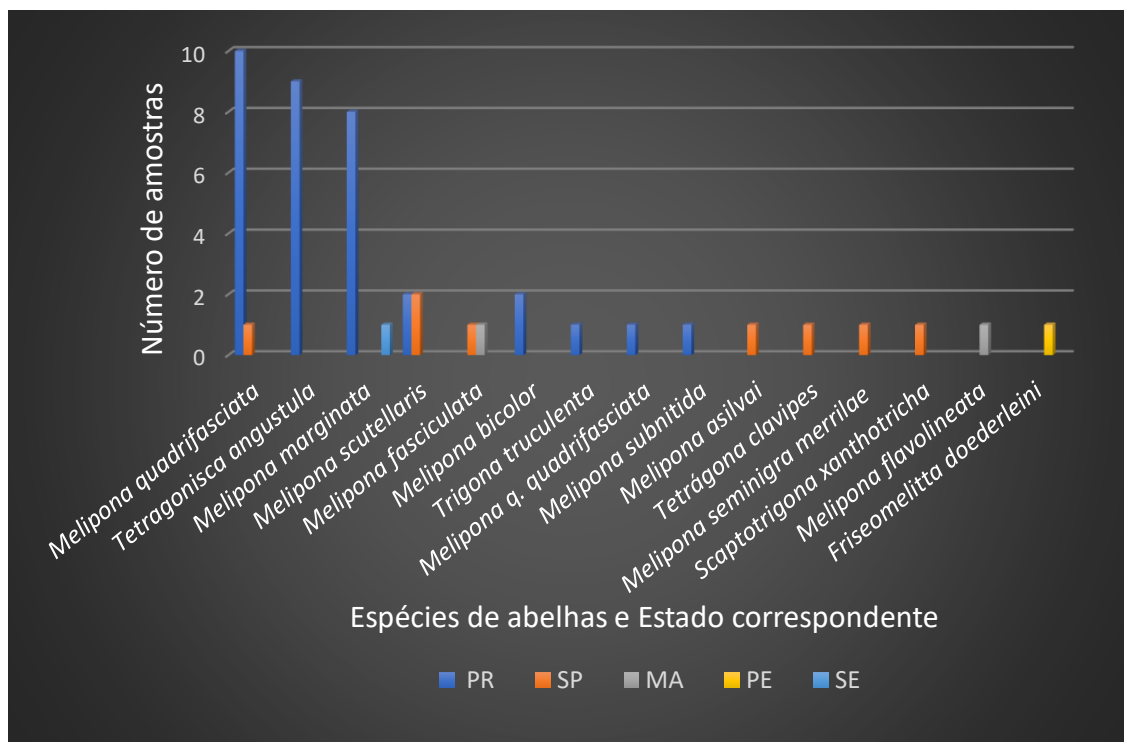
Em geral, a *PCA* é um método estatístico linear que encontra autovalores e autovetores da matriz de covariância dos dados e, com esse resultado, pode-se realizar a redução dimensional dos dados e analisar os padrões principais de variabilidade presentes. Nestas análises, espera-se extrair um menor número de componentes principais possíveis para explicar a variação total dos dados originais (MEIRA et al., 2020; SUREK et al., 2022).

4 METODOLOGIA

4.1 AMOSTRAS DE GEOPRÓPOLIS

O Laboratório de Cromatografia e Produtos Naturais (CRONAT) da UNICENTRO-PR, disponibilizou 46 amostras de geoprópolis para a realização deste trabalho. Estas, apresentadas na Figura 1, foram produzidas por 15 espécies de meliponíneos de 9 municípios e 5 estados distintos.

Figura 1: Gráfico do número de amostras de geoprópolis



FONTE: O Autor

Pode-se notar que a maior parte das amostras de geoprópolis foram produzidas por abelhas criadas no Estado do Paraná, sendo as três espécies com maior número de amostras, *Melipona quadrifasciata*, *Tetragonisca angustula* e *Melipona marginata*. Na Tabela 1A, no anexo A, estão presentes as informações, como o nome científico da abelha produtora, município de coleta, estado e bioma, sobre cada uma das amostras de geoprópolis utilizadas neste trabalho. Mais detalhes sobre as características dessas amostras estão descritas em TURCO, 2019.

4.1.1 Preparação das Amostras para Caracterização

As amostras de geoprópolis foram maceradas manualmente com o objetivo de atingir homogeneidade na forma de pó para a caracterização pela técnica *PAS* e por *EDXRF*. A Figura 2 mostra o preparo para uma amostra, desde a forma *in natura* até a obtenção do pó.

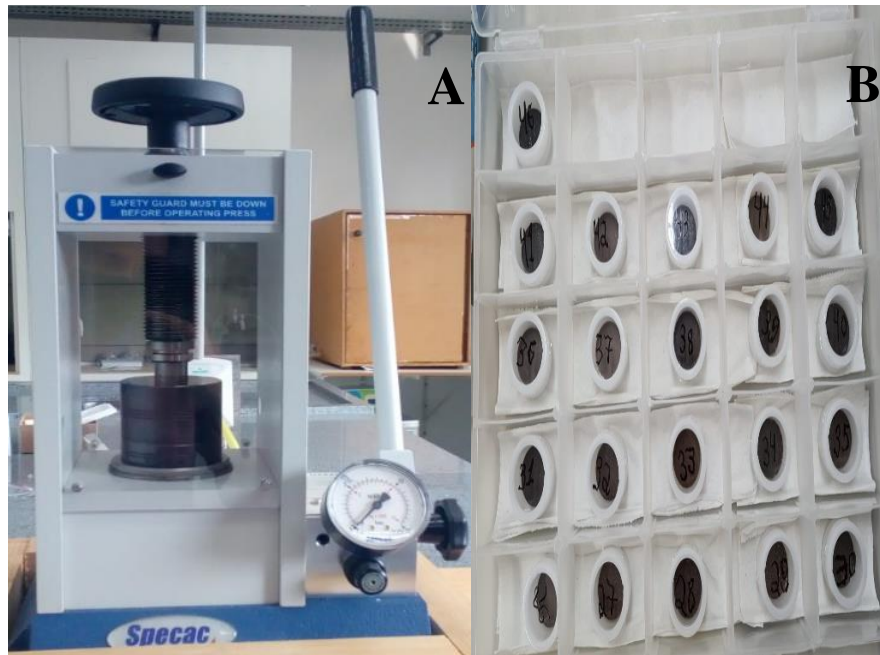
Figura 2: Obtenção dos pós das amostras de geoprópolis



FONTE: O Autor

Desse mesmo pó, obtido de cada amostra, foram elaboradas pastilhas. O intuito da fabricação das pastilhas foi para aplicação das análises de *EDXRF*. Esperava-se obter pastilhas com medidas em torno de 4mm de espessura e 2,5cm de diâmetro. Medidas essas compatíveis com o porta amostra do equipamento e que estão dentro da profundidade de penetração crítica para a radiação incidente, a qual, para uma matriz de solo mineral é de 2 mm (HOKURA, 2020). Por isso, foram efetuados alguns testes antes de fixar a massa das mesmas, que foi de aproximadamente 3g, alcançando uma condição de espessura infinita para a medida. Foi utilizado a prensa hidráulica manual da Specac (Figura 3), presente em um dos laboratórios do Centro de Ciências Moleculares e Nanotecnologia (CCMN), com configuração de carga de 15 toneladas (tons). O método de preparação ocorreu em duas fases, prensando primeiramente a amostra até 7,5 tons e posterior até 15 tons, visando obter uma maior homogeneidade das pastilhas.

Figura 3: Prensa hidráulica manual Specac (A) e pastilhas finalizadas e armazenadas nos porta amostras (B) para análise de *EDXRF*



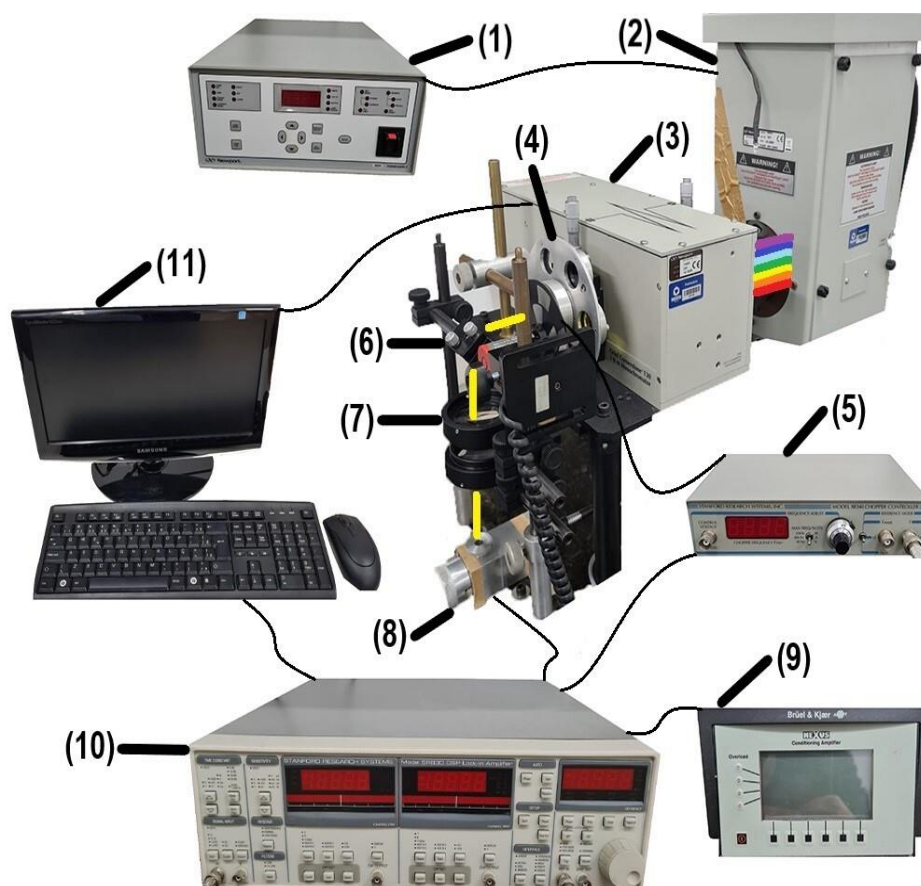
FONTE: O Autor

As pastilhas foram acondicionadas em porta amostras com filme Mylar[®], utilizadas para a análise no equipamento de *EDXRF*.

4.2. OBTENÇÃO DOS ESPECTROS FOTOACÚSTICOS

As amostras na forma de pó foram primeiramente caracterizadas no Laboratório de Propriedades Ópticas e Térmicas (LPOT) do Departamento de Física da Universidade Estadual do Centro-Oeste (DEFIS/UNICENTRO). O sistema experimental utilizado para caracterizar as amostras está representado na Figura 4. O equipamento deste sistema consiste em uma fonte e lâmpada de Xenon (Oriel-66921) de 1000W de potência, cuja emissão de comprimentos de onda varre do ultravioleta (UV) até o infravermelho próximo (*NIR*) (~180-1600nm). As medições foram realizadas a uma potência nominal de 700W.

Figura 4: Esquema representativo do sistema experimental da técnica PAS



FONTE: O Autor

Para seleccionar a faixa do espectro incidente na amostra, foi utilizado um dispositivo monocromador (Oriel-74004) (3) e um conjunto de filtros (4), cuja função é eliminar ordens superiores de difração. Este feixe, antes de incidir sobre a amostra, passa por um modulador mecânico (Stanford-SR540) (5) com frequência estabelecida de 16Hz e um conjunto de espelhos e lentes (6 e 7). Na detecção do sinal fornecido pela amostra, foi utilizado um microfone acústico sensível (Brüel e Kjaer-2690-0S2) (8 e 9), com sensibilidade estabelecida de aproximadamente 47mV/Pa. O sinal elétrico é enviado para o amplificador Lock-in (Stanford-SR830) (10). Os dados recebidos foram armazenados no computador (11). Neste estudo, a faixa de comprimento de onda de 250 nm a 1000 nm, das 46 amostras, foram investigados. A aquisição do sinal fotoacústico foi realizada em triplicata para cada amostra. Os espectros de PAS foram normalizados considerando a razão com o espectro de absorção do corpo negro, o qual é utilizado o carvão como padrão, para remover a influência do espectro de emissão da lâmpada de xenônio.

4.3 CARACTERIZAÇÃO POR *EDXRF*

As amostras foram caracterizadas no laboratório multiusuário de espectroscopia do CCMN, utilizando um espectrômetro de fluorescência de raios X, cujo funcionamento é exemplificado na Figura 5. O equipamento utilizado é da marca Shimadzu, modelo EDX-7000, com detector de *SDD* (*Silicon Drift Detector*), software de análise PCEDX-Pro e tubo de raios X com alvo de ródio (Rh). Inicialmente foram efetuados alguns testes, antes de fazer a análise de todas as 46 amostras, para análises visando otimizar a obtenção do sinal das amostras durante as medidas.

Figura 5: Esquema representativo do funcionamento da técnica de *EDXRF*, com imagem do equipamento



FONTE: Adaptado de (SHIMADZU CORPORATION, 2010)

As análises foram divididas em duas etapas: a análise qualitativa e a análise quantitativa. A análise qualitativa teve como objetivo identificar os elementos contidos nas amostras de geoprópolis. Os testes iniciais variaram as condições no tempo de medida, filtro de energia e controle de atmosfera (ar e vácuo). Estes foram efetuados para amostras em pó e amostras em forma de pastilha.

Dos testes realizados, após a análise dos resultados iniciais, constatou que as melhores condições experimentais foram para as amostras em forma de pastilha, usando colimador de 10 mm, com tempo de medida de 100 segundos, sem a utilização de filtros e com atmosfera à vácuo. Foram feitas análises para os canais Al-U e Na-Sc, com a tensão no tubo de Rh de 50 kV e 15 kV, correntes de 26 μA e 207 μA e tempo morto do detector de Si de 31% e 30%, respectivamente para cada canal. Desta forma, a análise qualitativa foi realizada em triplicata para as 46 amostras de geoprópolis.

A análise quantitativa foi realizada com o intuito de determinar o teor dos elementos presentes nas amostras, identificados pela análise qualitativa. Para isso, o método de calibração empírica foi utilizado. O mesmo consiste em utilizar a intensidade teórica de um padrão certificado, para determinar a sensibilidade dos elementos que serão investigados das amostras em questão e desta forma, determinar os teores dos elementos relacionando com as intensidades de raios X fluorescente medidos, para as amostras desconhecidas.

Foram utilizados dois materiais de referência certificados na análise quantitativa, um para a calibração do método quantitativo (SQC001 (solo)) e outro para validá-lo (CRM051 (solo argiloso)) (Figuras 1A e 2A presentes no anexo C). A escolha destes certificados se deu por terem matrizes semelhantes, e se tratando de solos, podem vir a fornecer uma boa representação para as amostras de geoprópolis que consistem em 90% de solo em sua composição. A Tabela 2 apresenta as condições de medidas empregadas na análise quantitativa efetuada em triplicata para as 46 amostras, em atmosfera de vácuo e utilizando colimador de 10 mm.

Tabela 2: Condições experimentais do modelo de calibração usando o certificado SQC001

Analito	Canal	Tensão (kV)	Corrente (μA)	Tempo (s)	Análise (keV)	Tempo Morto (%)
Al					1,3 - 1,7	
Si					1,5 - 1,9	
P					1,8 - 2,2	
S	Na - Sc	15	207	100	2,1 - 2,5	30
K					3,1 - 3,5	
Ca					3,5 - 3,9	
Ti					4,3 - 4,7	
Cr					5,2 - 5,6	
Mn					5,7 - 6,1	
Fe	Al - U	50	26	100	6,2 - 6,6	31
Cu					7,8 - 8,2	
Zn					8,4 - 8,8	
Sr					13,9 - 14,4	

4.4 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS

4.4.1 Pré-Processamento dos Dados

Foram selecionadas apenas 27 amostras das 46 caracterizadas para as análises de classificação (RL e *PCA*). Optou-se por essa seleção visando um conjunto de dados mais homogêneo, por isso, foram selecionadas somente as amostras providas do estado do Paraná e que foram produzidas pelas espécies das abelhas, *Melipona quadrifasciata*, *Tetragonisca angustula* e *Melipona marginata*. Desta forma, obtém-se uma distribuição semelhante entre quantidade de amostra provida de cada espécie de abelha e região de coleta. Os dados das técnicas de *PAS* e *EDXRF* destas 27 amostras, foram pré-processados pelo software de licença livre Weka 3.8.6[®], onde foi aplicado o algoritmo genético para otimizá-los. No caso dos dados das técnicas *PAS* e *EDXRF*, são associados os valores dos comprimentos de ondas aos dados espectrais e as energias as intensidades dos espectros, respectivamente, que melhor representam cada amostra. Utilizou-se os valores médios das triplicatas. Este pré-processamento foi aplicado para as análises RL.

4.4.2 Obtenção dos Modelos de Regressão Logística

Utilizando o software Weka 3.8.6[®], os dados de *PAS* e *EDXRF* foram divididos de forma aleatória em dois grupos pelo programa. Dois terços das amostras (18) formaram o modelo de calibração (e validação cruzada interna), e um terço das amostras (9) o conjunto de validação. O objetivo foi modelar a relação dos dados de cada técnica como variáveis preditoras com a variável dependente em questão, as espécies de abelhas produtoras. Para a *PAS*, foram utilizados os dados espectrais de 250-1000 nm e para o *EDXRF* os valores de contagem do canal Al-U (0-40keV). Desta forma, os modelos de classificação foram testados, podendo constatar se há algum agrupamento das amostras pelos dados, com base na espécie da abelha produtora.

4.4.3 Fatores das Análises de Componentes Principais

A *PCA* foi realizada utilizando o aplicativo denominado análise de componente principal para espectroscopia do *software* OriginPro 2022b (licença SR1 9.9.5.171). Como fatores da

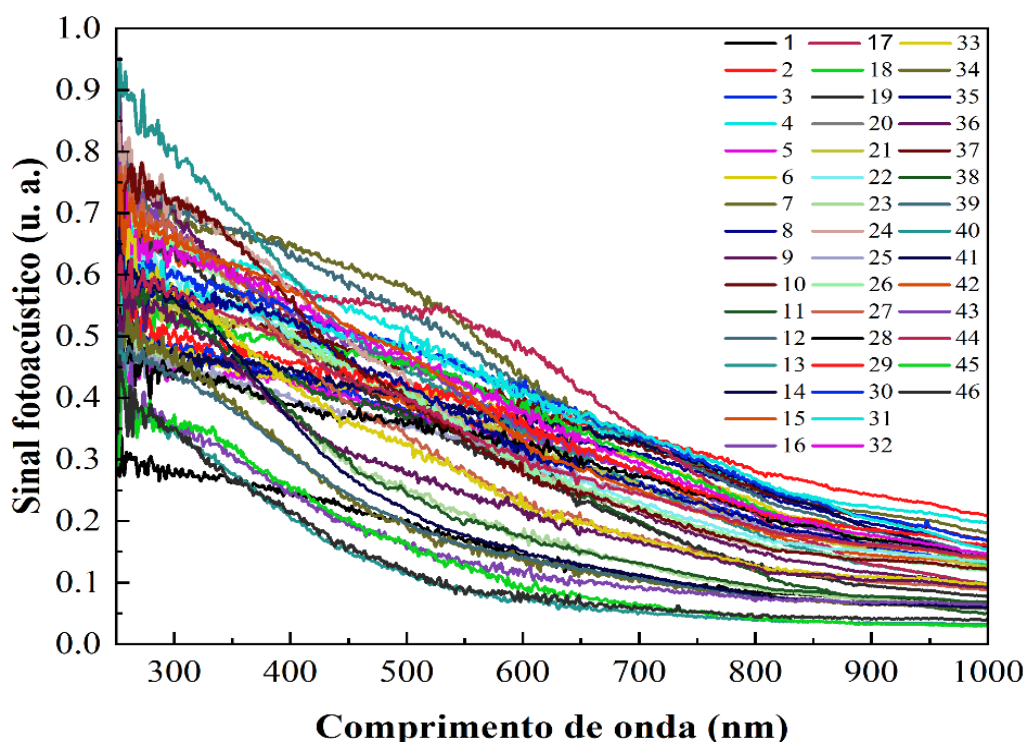
PCA, foram considerados os dados espectrais de 250 a 1000 nm para a *PAS* e os valores de contagem do canal Al-U (0-40keV) das análises qualitativa e quantitativa para o *EDXRF*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 INTERPRETAÇÃO DOS ESPECTROS FOTOACÚSTICOS

Na Figura 6 foram apresentados os espectros fotoacústicos para comparar a variabilidade química das amostras de geoprópolis. Para todos os espectros não há mudanças significativas nas intensidades dos sinais fotoacústicos, os perfis foram semelhantes para todas as geoprópolis independente da espécie de abelha ou município de coleta. Existem bandas mais intensas entre 250 e 350 nm, região onde se encontram os principais compostos presentes nas amostras de geoprópolis (Tabela 1). Como no trabalho de CARDOZO et al., 2015, em geral, a geoprópolis apresenta bandas de absorção significativas na faixa acima de 270 nm. As primeiras bandas entre 250 e 350 nm podem estar associadas aos compostos flavanona, flavona, quercitina, crisina, ácido p-cumárico e ácido gálico que possuem seus máximos de absorção nesta região (banda A, conforme Tabela 1).

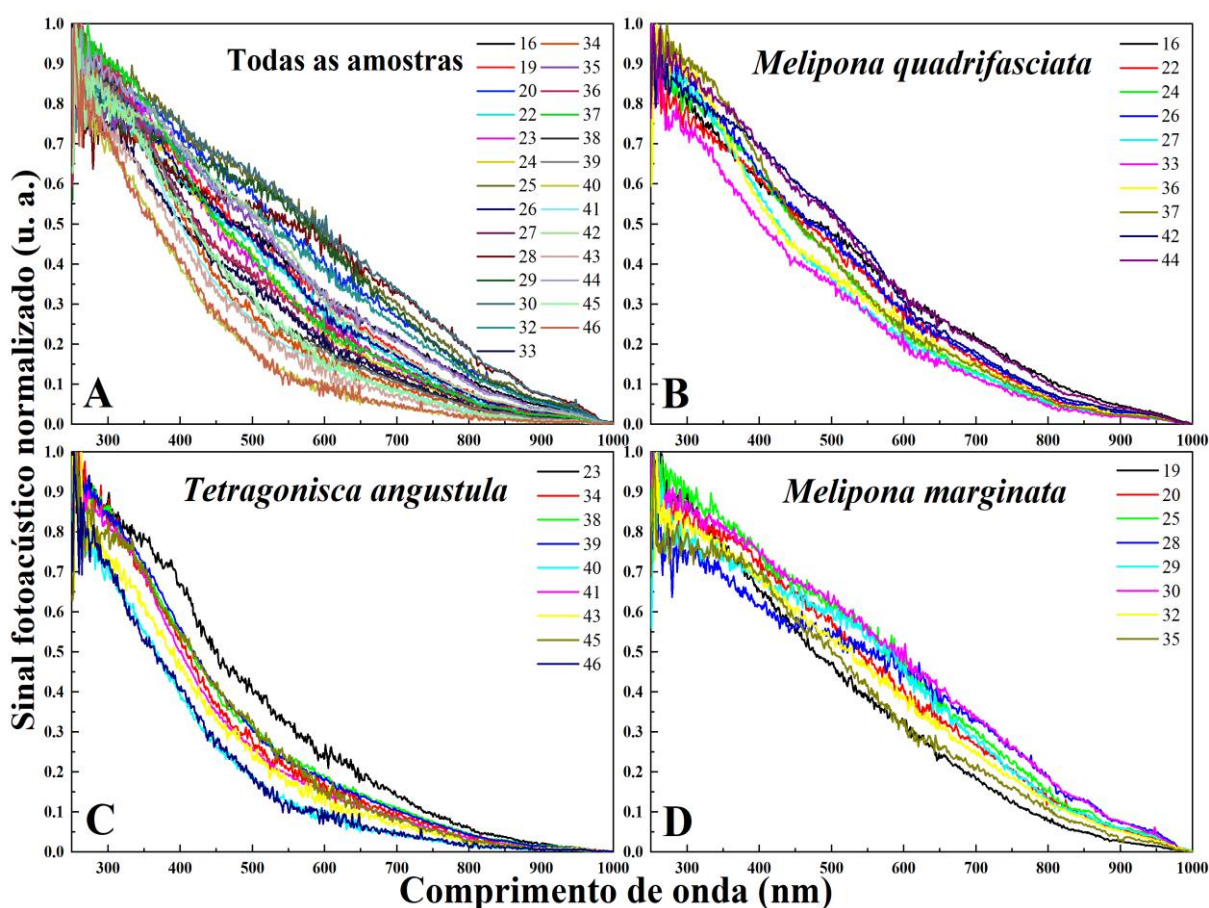
Figura 6: Espectro fotoacústico das amostras de geoprópolis



FONTE: O Autor

A Figura 7 mostra os espectros de absorção normalizados de 0 a 1 e separados entre as espécies de abelhas estudadas das amostras que foram utilizadas para as análises quimiométricas. Os máximos de absorção estão próximos aos valores mencionados na Tabela 1, na qual são descritos alguns compostos fitoquímicos. Também é possível observar nos espectros uma banda de absorção fraca entre 350 e 400 nm, possivelmente causada por compostos flavonoides como quercitina e kaempferol (banda B, conforme Tabela 1), ou mesmo por compostos fenólicos como ácido p-cumárico (CHANG; CHANG, 2005; VIUDA-MARTOS et al., 2008).

Figura 7: Espectros fotoacústicos normalizados das amostras de geoprópolis que foram selecionadas para as análises quimiométricas: A) Todas as amostras, B) *M. quadrifasciata*, C) *T. angustula* e D) *M. marginata*



FONTE: O Autor

Em geral, os espectros fotoacústicos são muito semelhantes, dificultando a distinção de diferentes classes desse tipo de matriz. Para superar essa dificuldade, foram utilizadas

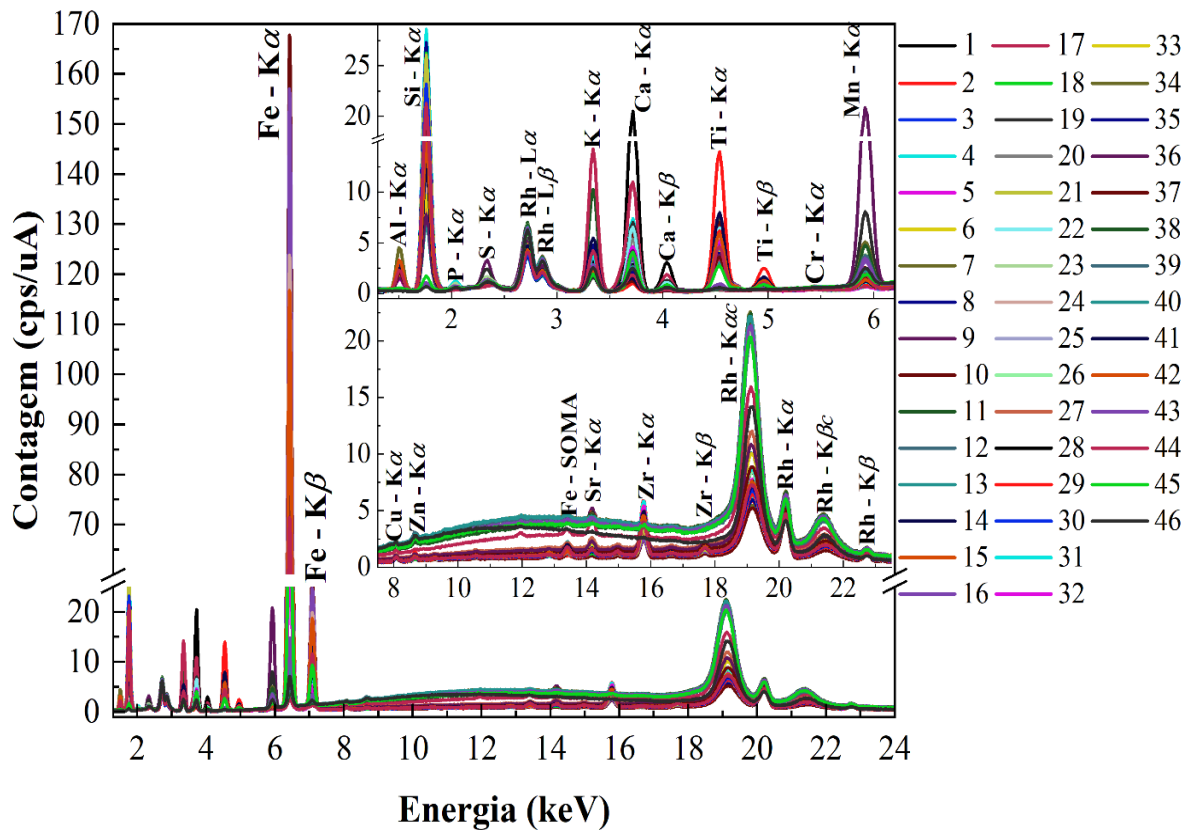
abordagens quimiométricas para analisar os fatores de classificação das amostras com os dados de seus respectivos espectros de absorção.

5.2 INTERPRETAÇÃO DOS ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

Os resultados das análises qualitativas de *EDXRF*, presente na figura 8, nos mostram os minerais identificados em todas as amostras de geoprópolis, os quais são: Al, Si, P, S, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn, Sr e Zr. Nota-se a maior intensidade no pico do Fe em todas as amostras, o que pode ser um indício de que este elemento pode ser o de maior concentração. Este resultado é condizente com os resultados apresentados por BONSUCESSE et al., 2018, onde foram comparadas amostras de solos e própolis com a geoprópolis da espécie de abelha *Melipona scutellaris* da região metropolitana de Salvador, Bahia.

As altas contagens no valor de Rh nos espectros, são devido ao espalhamento gerados pelo tubo de raio X. No geral, é evidente a variação das contagens para os elementos investigados de acordo com as diferentes amostras.

Figura 8: Espectros de fluorescência de raios X de energia dispersiva das amostras de geoprópolis

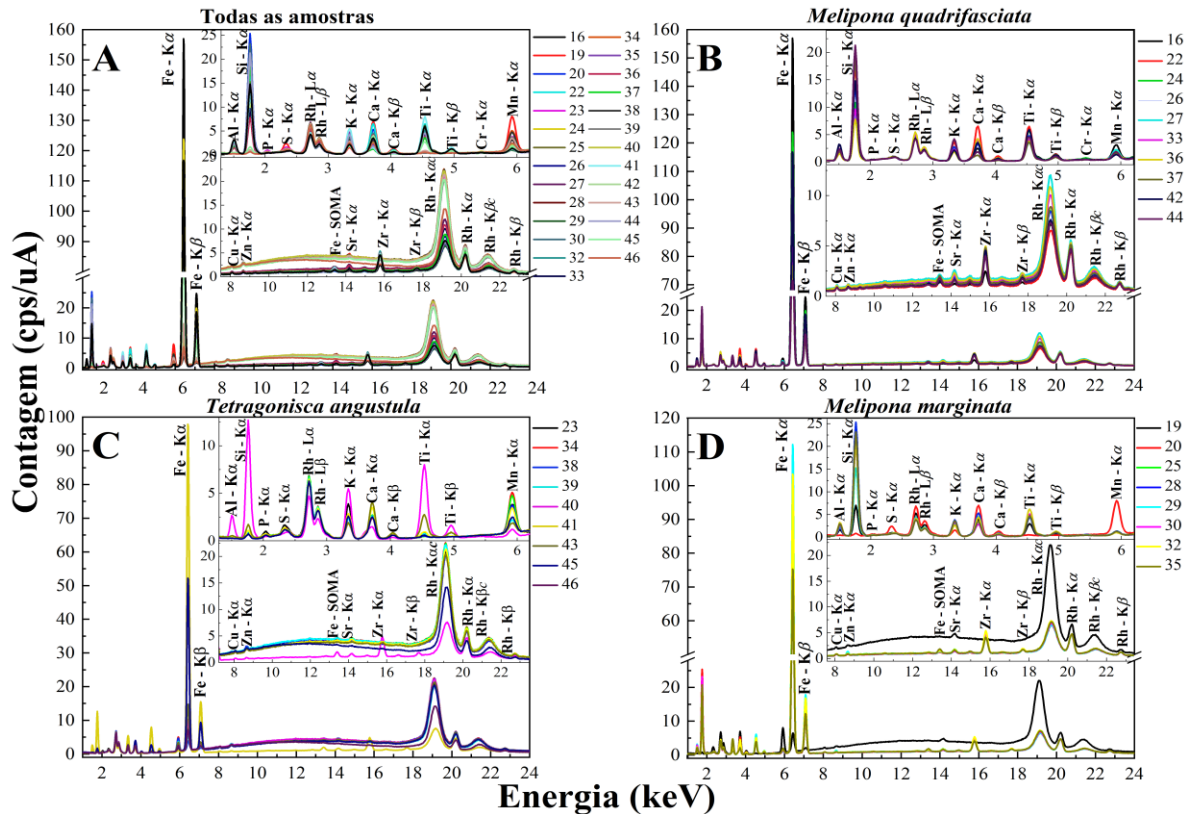


FONTE: O Autor

As altas quantidades de minerais são características da geoprópolis, uma vez que o solo é o componente primário deste produto das abelhas sem ferrão. Dentre os minerais essenciais temos o N, P, K, Ca, Mn, S, B, Cl, Fe, Mg, Zn, Cu, Mo. Nas amostras estudadas neste trabalho, P, K, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn foram identificados. Os minerais essenciais são um grupo de elementos que desempenham um papel importante na vida humana, pois são responsáveis por diversas funções bioquímicas. Além destes, metais como Al, Ti e Cr também foram identificados nas amostras (KIM; KIM; KUMAR, 2019).

Com base nos elementos encontrados nas amostras acreditamos ser possível associar a composição mineral a cada região de amostragem dos meliponários e diferenciar as amostras entre si, uma vez que os elementos variam de uma amostra para outra. Também foi possível identificar K em todas as amostras de geoprópolis, sendo este um mineral essencial no desenvolvimento das plantas e que podem justificar a característica resinosa de algumas amostras analisadas (FERREIRA et al., 2019). A Figura 9 apresenta os espectros de *EDXRF* para as amostras que foram alvos de análises multivariadas. Outro fator que pode estar relacionado com as resinas presentes nas amostras, são as curvaturas na região de 8 a 18 keV, como mostram as Figuras 9C e 9D.

Figura 9: Espectros de fluorescência de raios X de energia dispersiva das amostras de geoprópolis que foram selecionadas para as análises quimiométricas: A) Todas as amostras, B) *M. quadrifasciata*, C) *T. angustula* e D) *M. marginata*



FORNE: O Autor

5.2.1 Determinação dos Teores dos Minerais Presentes nas Amostras de Geoprópolis

Os elementos que tiveram seus valores estimados pelo método de calibração empírica utilizando o padrão SQC001 como referência foram o Al, Si, P, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn e Sr, elementos estes identificados anteriormente pelo método qualitativo. A Tabela 3 mostra os valores estimados das concentrações dos elementos pelo método de calibração empírica com amostra de referência.

Tabela 3: Resultados do método de calibração empírica com amostra padrão SQC001. Os analitos que ficaram com concentração numa faixa de erro relativo menor que 20%, estão destacados em verde.

Amostras certificadas	Calibração					Validação				
	SQC001					CRM051				
Analito	Concentração real (ppm)	Desvio padrão	Concentração calculada (ppm)	Desvio padrão	Erro relativo %	Concentração real (ppm)	Desvio padrão	Concentração calculada (ppm)	Desvio padrão	Erro relativo %
Al	11100	1960	11123,5	92	0,2	6860	3060	13727,6	84	100,1
Si	689	623	688,2	2,5	0,1	969	643	1095,8	2,6	13,1
P	371	109	376	24,6	1,4	259	48,6	493,7	21,4	90,6
S	263	72,7	262,4	8,4	0,2	0	0	294,4	7,5	0
K	8890	926	8903,8	41,7	0,2	2280	399	2164,3	17,4	5,1
Ca	3090	313	2988,8	25,5	3,3	2630	248	2800,6	28	6,5
Ti	40,6	15,7	40,2	0,4	1	82,5	28,6	37,5	0,4	54,6
Cr	232	22,6	229,8	7,5	0,9	269	21,7	239,8	6,5	10,9
Mn	1370	94	1437,6	35,8	4,9	994	134	1169,8	29,2	17,7
Fe	8850	2480	8814,7	30,5	0,4	4360	524	4732,8	19,9	8,6
Cu	88,4	7,65	87,1	3,4	1,5	263	22,3	187,1	3,2	28,9
Zn	258	24,9	231,3	5,7	10,4	574	53,3	567,4	5,4	1,2
Sr	108	10,7	107,1	1,4	0,8	248	41,7	126,6	0,9	48,9

Técnicas de análise química, mesmo as que são amplamente usadas para relatórios precisos de valores elementares nas indústrias de mineração, geológicas e ambientais, contêm em sua medição, variações devido à representação da amostra, coleta da amostra, preparação e erro analítico. A maioria dos métodos credenciados relatam dados dentro de $\pm 20\%$ das recuperações elementares de valores certificados ou de referência e, às vezes, asseguram a seus clientes que os dados geralmente são precisos com $\pm 10\%$ de erro (ROUILLON; TAYLOR, 2016).

Constata-se que apenas pela análise do padrão CRM051, usando o método de calibração empírica criado a partir do padrão SQC001, obteve-se uma estimativa dentro do erro aceito ($\pm 20\%$) para os elementos: Si, K, Ca, Cr, Mn, Fe e Zn. Desta forma, levando em consideração que a geoprópolis é composta em sua maioria por solo, utilizou-se deste método para obter os valores das concentrações dos elementos que estiveram dentro do erro aceito. Estes resultados estão nas Tabela 2A e Tabela 2.1A., no anexo B.

Assim como no trabalho de FERREIRA et al., 2019, as concentrações determinadas para os elementos em questão, estão dentro das faixas de concentrações que tem se retratado na

literatura. A Tabela 4 traz a comparação da faixa de concentração de minerais encontrados nas amostras deste trabalho e no trabalho de FERREIRA et al., 2019.

Tabela 4: Comparação das concentrações dos minerais presentes nas amostras de geoprópolis

Analito	Concentrações dos minerais determinado por <i>EDXRF</i> (ppm)				Concentrações dos minerais determinados por <i>ICPS – MS</i> no trabalho de FERREIRA et al., 2019 (ppm)	
	Valor máximo	Desvio padrão	Valor mínimo	Desvio padrão	Valor máximo	Valor mínimo
Si	1599	8	12	0	n.d.*	n.d.
K	10208	56	795	4	2268 ± 236	555 ± 102
Ca	23659	19	821	5	n.d.	n.d.
Cr	208	4	6	0	n.d.	n.d.
Mn	28158	167	278	39	n.d.	n.d.
Fe	103097	575	412	5	82524 ± 3318	1316 ± 403
Zn	349	2	28	2	102 ± 4	13 ± 5

*concentração não detectada

Para os minerais essenciais, os intervalos das concentrações foram, K (10208,87-794,90 ppm), Ca (23659,77-821,37 ppm), Mn (28168,91-733,87 ppm), Fe (103097,43-414,40 ppm) e Zn (322,77-27,57 ppm). Já para o Cr a faixa de concentração foi de 208,07-5,63 ppm. Em geral, as concentrações determinadas para os minerais foram altas, mas estão dentro do previsto na literatura para as amostras de geoprópolis (BONSUCCESSO et al., 2018; FERREIRA et al., 2019).

5.3 AVALIAÇÃO DOS MODELOS DE REGRESSÃO LOGÍSTICA

Os modelos de classificação de RL foram desenvolvidos e testados por meio de validação cruzada, e os resultados para a *PAS* são apresentados na Tabela 5. Para o modelo RL, 15 (83,33%) das amostras analisadas foram classificadas corretamente e 3 (16,67%) foram classi-

ficadas incorretamente, mostrando que este possui boa precisão na classificação de amostras de geoprópolis por espécie de abelha, com baixo valor do erro absoluto médio (0,09) e da raiz quadrada do erro médio (0,29).

Tabela 5: Resumo da validação cruzada do modelo de classificação de regressão logística dos dados espectrais da técnica *PAS*

Sumário	
Validação cruzada	18
Classificados corretamente	15
Classificados incorretamente	3
<i>MAE</i>	0,09
<i>RMSE</i>	0,29

A Tabela 6 nos mostra que a validação pelo modelo RL é eficiente para os dados da técnica *PAS*, tendo uma taxa de 88,89% de classificação correta, com baixo valor do *MAE* (0,09) e da *RMSE* (0,29).

Tabela 6: Resumo da validação do modelo de classificação de regressão logística dos dados espectrais da técnica *PAS*

Sumário	
Validação	9
Classificados corretamente	8
Classificados incorretamente	1
<i>MAE</i>	0,07
<i>RMSE</i>	0,26

Com a matriz de confusão da validação do modelo (Tabela 7), vemos que das 9 amostras analisadas, 8 foram classificadas corretamente (verdadeiro positivo) e apenas 1 foi classificada incorretamente (falso positivo).

Tabela 7: Matriz de confusão da regressão logística dos dados espectrais da técnica *PAS* para classificação das espécies de abelhas *M. marginata*, *M. quadrifasciata* e *T. angustula*

	Reais	<i>M. marginata</i>	<i>M. quadrifasciata</i>	<i>T. angustula</i>
Preditos	<i>M. marginata</i>	2	0	0
	<i>M. quadrifasciata</i>	0	3	1
	<i>T. angustula</i>	0	0	3

De acordo com os resultados da modelagem de classificação (Tabela 8), há uma taxa de acerto de 88,90% para a classificação das espécies de abelhas (verdadeiro positivo), refletido também no valor da sensibilidade. A precisão do modelo de classificação foi de 91,70%. Esses resultados indicam que pode haver compostos distintos em geoprópolis produzidas por diferentes espécies de abelhas, porém, que são encontrados na mesma região.

Tabela 8: Precisão detalhada por classe do modelo logístico dos dados espectrais da técnica *PAS*

Taxa <i>TP</i>	Taxa <i>FP</i>	Precisão	<i>Recall</i>	<i>F-Measure</i>	Área <i>ROC</i>	Classe
1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	<i>M. marginata</i>
0,75	0,00	1,00	0,75	0,85	1,00	<i>M. quadrifasciata</i>
1,00	0,16	0,75	1,00	0,85	1,00	<i>T. angustula</i>
0,88	0,05	0,91	0,88	0,88	1,00	Média ponderada

Em geral, os resultados mostram que os classificadores estão atuando de forma eficaz no modelo, com a área sob a curva *ROC* sendo 1,00. Isso sugere que o modelo foi eficiente em discriminar as amostras de geoprópolis das espécies de abelhas *M. quadrifasciata*, *T. angustula* e *M. marginata*, com os valores espectrais da técnica *PAS*.

O modelo LR para os dados qualitativos da técnica *EDXRF* (Tabela 9), 14 (77,78%) das amostras analisadas foram classificadas corretamente e 4 (22,22%) foram classificadas incorretamente.

Tabela 9: Resumo da validação cruzada do modelo de classificação de regressão logística dos dados qualitativos da técnica *EDXRF*

Sumário	
Validação cruzada	18
Classificados corretamente	14
Classificados incorretamente	4
<i>MAE</i>	0,14
<i>RMSE</i>	0,34

Portanto, os resultados da Tabela 9 mostram que o modelo RL para os dados qualitativos da técnica *EDXRF*, possui uma precisão um pouco menor que o modelo RL para os dados da técnica *PAS* (Tabela 5), na classificação de amostras de geoprópolis por espécie de abelha, mas também possui um baixo valor de *MAE* (0,14) e da *RMSE* (0,38), indicando ser um bom modelo.

A Tabela 10 nos mostra que a validação pelo modelo possui uma boa predição, tendo uma taxa de 77,78% de classificação correta, com baixo valor do *MAE* (0,14) e da *RMSE* (0,38).

Tabela 10: Resumo da validação do modelo de classificação de regressão logística dos dados qualitativos da técnica *EDXRF*

Sumário	
Validação	9
Classificados corretamente	7
Classificados incorretamente	2
<i>MAE</i>	0,14
<i>RMSE</i>	0,38

A Tabela 11 nos mostra a matriz de confusão da validação modelo RL dos dados qualitativos da técnica *EDXRF*. Das 9 amostras analisadas, 7 foram classificadas corretamente (verdadeiro positivo) e 2 foram classificadas incorretamente (falso positivo).

Tabela 11: Matriz de confusão da regressão logística dos dados qualitativos da técnica *EDXRF* para classificação das espécies de abelhas *M. marginata*, *M. quadrifasciata* e *T. angustula*

	Reais	<i>M. marginata</i>	<i>M. quadrifasciata</i>	<i>T. angustula</i>
Preditos	<i>M. marginata</i>	1	0	1
	<i>M. quadrifasciata</i>	1	3	0
	<i>T. angustula</i>	0	0	3

A partir dos resultados da modelagem (Tabela 12), há uma taxa de acerto de 77,80% para a classificação das espécies de abelhas (verdadeiro positivo), refletido também no valor da sensibilidade (80,60%), com valores menores que o modelo anterior (Tabela 8). A precisão do modelo de classificação foi de 80,60%.

Tabela 12: Precisão detalhada por classe do modelo logístico dos dados qualitativos da técnica *EDXRF*

Taxa	Taxa	Precisão	Recall	F-Measure	Área	Classe
<i>TP</i>	<i>FP</i>				<i>ROC</i>	
0,50	0,14	0,50	0,50	0,35	0,83	<i>M. marginata</i>
0,75	0,00	1,00	0,75	0,79	1,00	<i>M. quadrifasciata</i>
1,00	0,16	0,75	1,00	0,79	1,00	<i>T. angustula</i>
0,77	0,08	0,80	0,80	0,77	0,96	Média ponderada

Em geral, os resultados da Tabela 12 mostram que os classificadores, mesmo com um menor número de acerto em relação ao modelo anterior (Tabela 8), atuam bem no modelo, com a área sob a curva *ROC* sendo 0,96. Isso sugere que o modelo RL com os dados qualitativos da técnica *EDXRF* tem uma menor precisão em relação ao modelo RL com os dados da técnica *PAS*, mas também é útil em discriminar as amostras de geoprópolis pelas espécies de abelhas.

Um último modelo LR foi elaborado e testado com os dados quantitativos da técnica *EDXRF*, em prol de avaliar a diferença dos resultados entre o método qualitativo e quantitativo da técnica para a classificação das amostras.

A Tabela 13 apresenta o modelo RL para os dados quantitativos da técnica *EDXRF*. Os resultados mostram que 13 (72,23%) das amostras analisadas foram classificadas corretamente e 5 (27,77%) foram classificadas incorretamente. Uma taxa de acerto de predição ligeiramente menor do que o modelo com os dados qualitativos da técnica *EDXRF* (Tabela 9). Os valores de *MAE* (0,19) e da *RMSE* (0,40), indicam que é um bom modelo.

Tabela 13: Resumo da validação cruzada do modelo de classificação de regressão logística dos dados quantitativos da técnica *EDXRF*

Sumário	
Validação cruzada	18
Classificados corretamente	13
Classificados incorretamente	5
<i>MAE</i>	0,19
<i>RMSE</i>	0,40

Já para a validação (Tabela 14), a taxa de acerto foi de 77,78%, com baixos valores de erro, *MAE* (0,15) e *RMSE* (0,38).

Tabela 14: Resumo da validação do modelo de classificação de regressão logística dos dados quantitativos da técnica *EDXRF*

Sumário	
Validação	9
Classificados corretamente	7
Classificados incorretamente	2
<i>MAE</i>	0,15
<i>RMSE</i>	0,38

Na Tabela 15, a matriz de confusão da validação do modelo RL dos dados quantitativos da técnica de *EDXRF*, nos mostra que das 9 amostras analisadas, 7 foram classificadas corretamente (verdadeiro positivo) e duas foram classificadas incorretamente (falso positivo), assim como no modelo anterior (Tabela 11).

Tabela 15: Matriz de confusão da regressão logística dos dados quantitativos da técnica *EDXRF* para classificação das espécies de abelhas *M. marginata*, *M. quadrifasciata* e *T. angustula*

	Reais	<i>M. marginata</i>	<i>M. quadrifasciata</i>	<i>T. angustula</i>
	<i>M. marginata</i>	1	0	1
Preditos	<i>M. quadrifasciata</i>	1	3	0
	<i>T. angustula</i>	0	0	3

A partir dos resultados da modelagem (Tabela 16), observa-se uma taxa de acerto de 77,80% para a classificação das espécies de abelhas (verdadeiro positivo), com um valor de sensibilidade um pouco menor (77,80%). A precisão do modelo de classificação foi de 80,60%.

Tabela 16: Precisão detalhada por classe do modelo logístico dos dados quantitativos da técnica *EDXRF*

Taxa	Taxa	Precisão	Recall	F-Measure	Área	Classe
<i>TP</i>	<i>FP</i>				<i>ROC</i>	
0,50	0,14	0,50	0,50	0,50	0,78	<i>M. marginata</i>
0,75	0,00	1,00	0,75	0,85	0,85	<i>M. quadrifasciata</i>
1,00	0,16	0,75	1,00	0,85	1,00	<i>T. angustula</i>
0,77	0,08	0,80	0,77	0,77	0,88	Média ponderada

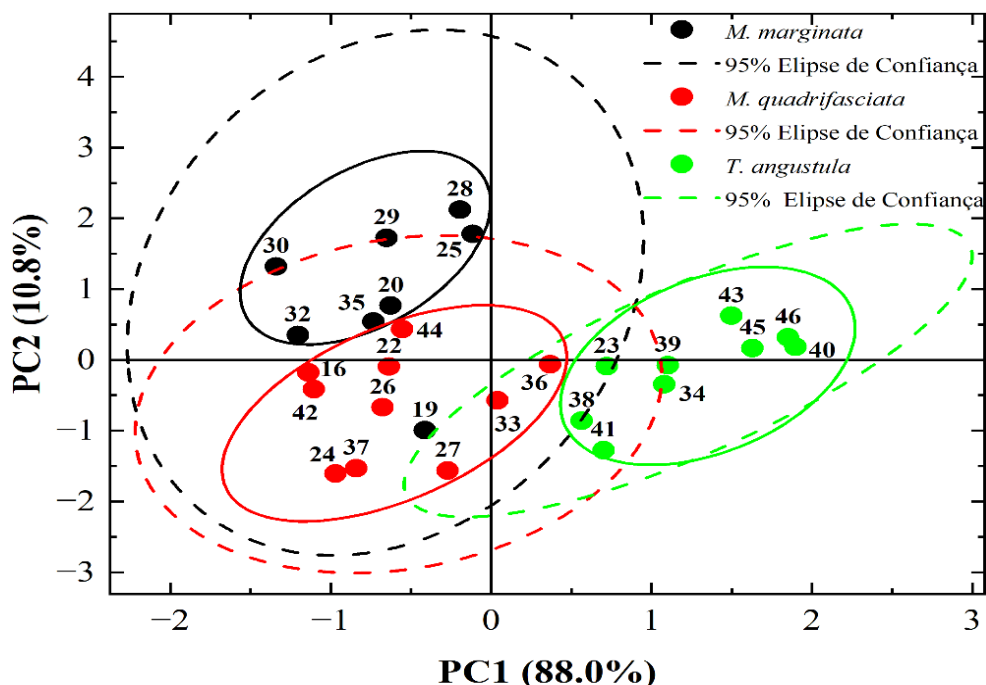
Em geral, os resultados mostram que os classificadores atuam bem no modelo, com a área sob a curva *ROC* sendo 0,88. Isso sugere que o modelo RL com os dados quantitativos da técnica *EDXRF* tem uma menor precisão em relação ao modelo RL com os dados qualitativos, porém, a diferença é pequena e o modelo também consegue discriminar as amostras de forma coerente.

Desta forma, constatamos que todos os modelos de regressão logística elaborados por meio dos dados das técnicas *PAS* e *EDXRF* são úteis para a classificação das amostras de geoprópolis. Ressaltamos que entre estes testes, o melhor modelo foi para a *PAS*. Não houveram diferenças significativas entre os modelos de *EDXRF* (qualitativo e quantitativo), indicando que para fins de classificação o método de análise não tem grandes interferências nos resultados.

5.4 IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE GEOPRÓPOLIS POR ESPÉCIES DE ABELHAS POR MEIO DE ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

A Figura 10 mostra o gráfico *Score* para o primeiro e segundo componente principal (*PC1* e *PC2*), que juntos representam 98,8% da variância dos dados e para os quais o agrupamento de amostras foi estabelecido.

Figura 10: Gráfico *Score* *PC1* e *PC2* baseado nos dados espectrais da técnica *PAS*, classificados de acordo com a espécie de abelha (linhas sólidas) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (linhas tracejadas)



FONTE: O Autor

Houve uma separação entre amostras de geoprópolis de diferentes espécies de abelhas. Isso indica uma forte relação entre as abelhas produtoras e a composição química das amostras, sugerindo que abelhas, mesmo sendo da mesma região, mas de espécies diferentes, tendem a coletar resinas de mais de uma fonte vegetal. A Figura 3A, presente no anexo D, mostra o gráfico *Score* para o primeiro e terceiro componente principal (*PC1* e *PC3*), que juntos representam 88,5% da variância dos dados e para os quais o agrupamento das amostras foi estabelecido conforme o gênero da abelha.

A Figura 4A do anexo D, exibe os gráficos de *loadings* *PC1*, *PC2* e *PC3* baseados nos dados espectrais da técnica *PAS*. Para a *PC1*, o espectro médio de todas as amostras, estão diretamente correlacionadas, com peso maior em torno de 500 nm. Esta correlação positiva é um indício da composição química semelhante nas amostras analisadas, os quais foram citados no tópico 5.1 deste trabalho. Para a *PC2*, de 250 até 450 nm os dados estão

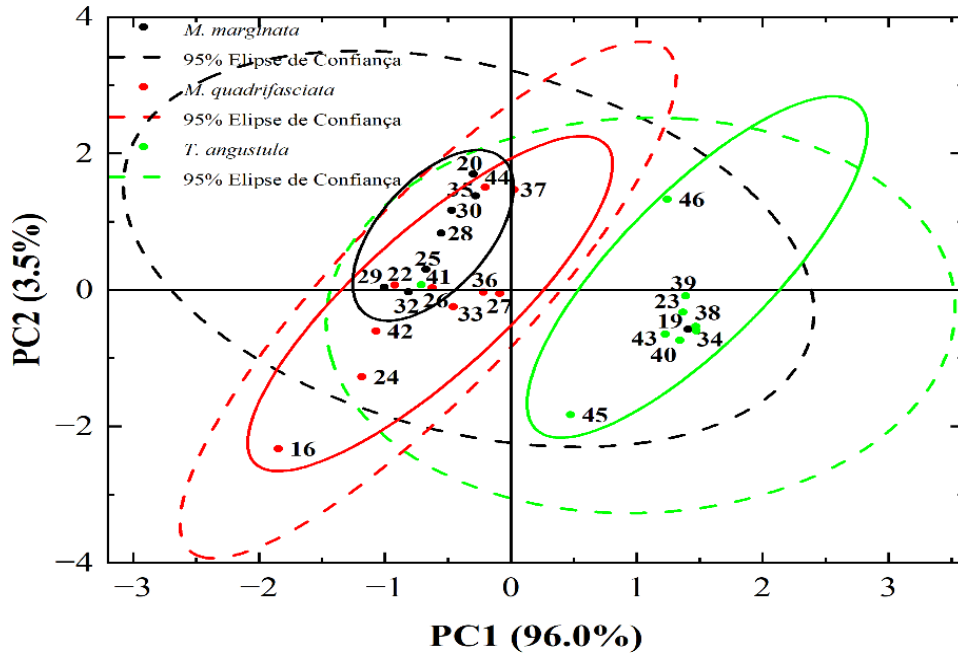
correlacionados inversamente com os dados de 450 a 1000 nm. Na *PC3*, de 250 a 350 nm e de 600 até 1000 nm os dados se correlacionam inversamente com os valores de 350 a 600 nm. Essas inversões podem indicar a diferença entre a composição mineral das amostras, as quais possuem bandas espectrais acima de 450 nm (FORMAGGIO et al., 1996)

As Figuras 11 e 12, mostram, respectivamente, a *PCA* para os dados qualitativos e quantitativos de *EDXRF*. A *PC1* e *PC2* da Figura 11, juntas representam 99,5% da variância dos dados e a *PC1* e *PC2* da Figura 12, juntas representam 99,4% da variância dos dados. Tanto na Figura 11 como na Figura 12, o agrupamento das amostras se deu pelo gênero da abelha, constatando mais uma vez que não há diferenças significativas nos resultados das análises de classificação para os dados de *EDXRF*, provindos do método qualitativo e quantitativo.

As Figuras 5A e 6A do anexo D, exibem os gráficos de *loadings PC1* e *PC2* baseados nos dados qualitativos e quantitativos, respectivamente, da técnica *EDXRF*. Dos dados qualitativos de *EDXRF* (Figura 5A), para a *PC1*, os elementos Al, Si, K, Ca, Ti, Fe e Zr estão diretamente correlacionados entre eles. Por outro lado, estão inversamente correlacionados a P, S e Mn. Para a *PC2*, Al, Si, K e Ti estão diretamente correlacionados entre eles e inversamente correlacionados a P, S, Ca, Mn e Fe. Observamos que existe uma mudança entre os resultados de *PC1* e *PC2* na correlação dos elementos Al, Si, P, S, K, Ti, Mn e Zr, o que pode indicar a variabilidade desses elementos nas amostras. Esses resultados também são observados para os dados quantitativos de *EDXRF* (Figura 6A).

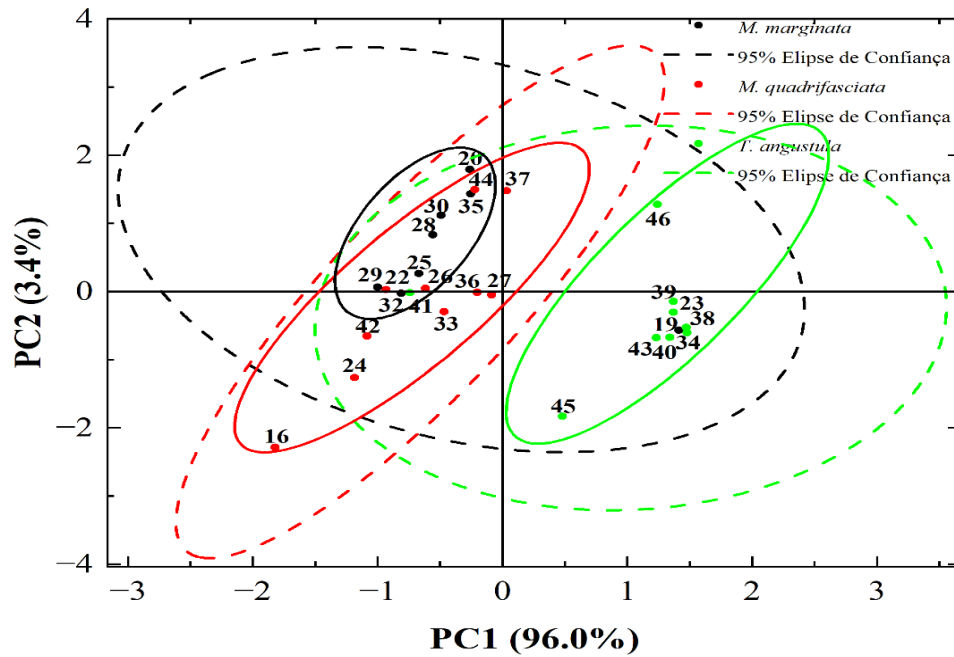
Em comparação das *PCA's* para a *PAS* e *EDXRF*, nota-se que pelos dados da *PAS* existe um melhor agrupamento das amostras. Este resultado pode estar diretamente ligado aos constituintes fitoquímicos, uma vez que, mesmo as amostras sendo de regiões com biomas semelhantes, ainda pode haver o fato de as abelhas coletarem os recursos para o feitiço da geoprópolis de fontes vegetais distintas e que a técnica em questão, é mais apropriada para o estudo/diferenciação destes compostos. Já o agrupamento das *PCA's* de *EDXRF* pode estar relacionado com os elementos minerais presentes nas amostras, que em geral, as variações destes em solos estão na quantidade e não na variabilidade, fazendo com que as amostras se agrupem por gênero e não pela espécie.

Figura 11: Gráfico *Score PC1* e *PC2* baseado nos dados qualitativos da técnica *EDXRF*, classificados de acordo com a espécie de abelha (linhas sólidas) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (linhas tracejadas)



FONTE: O Autor

Figura 12: Gráfico *Score PC1* e *PC2* baseado nos dados quantitativos da técnica *EDXRF*, classificados de acordo com a espécie de abelha (linhas sólidas) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (linhas tracejadas)



FONTE: O Autor

Outros fatores como a localização dos meliponários, onde as amostras foram coletadas, podem estar contribuindo para sua composição e conseqüentemente para a sua classificação. Por exemplo, se há floração abundante ou não, o local estar distante ou próximo de fontes poluidoras como aterros sanitários, lixões, indústrias e áreas de intensa atividade agropecuária são fatores que também podem influenciar na composição da geoprópolis.

Porém, como a maioria das amostras é proveniente de área rural (sendo apenas as amostras 20 e 23, tendo sua região de coleta próxima a áreas urbanas), constatou-se que os fatores ligados a localização, que podem estar contribuindo na composição e classificação das amostras, seriam a flora (fator relacionado aos resultados da técnica *PAS* (Figura 10)) ou áreas rurais com atividade agropecuária (fator relacionado aos resultados da técnica *EDXRF* (Figuras 11 e 12)).

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, amostras de geoprópolis foram analisadas pelas técnicas *PAS* e *EDXRF*, em conjunto de métodos de análises multivariadas. Nos espectros fotoacústicos, foram observadas bandas entre 250 e 350 nm e outras entre 350 e 400 nm, características de alguns compostos fitoquímicos presentes na geoprópolis como a quercitina e kaempferol ou mesmo por compostos fenólicos como o ácido p-cumárico. No entanto, em geral, os espectros fotoacústicos são muito semelhantes, dificultando a distinção de diferentes classes desse tipo de matriz, o que foi superado pelas análises de *RL* e *PCA*.

Foram identificados os seguintes elementos nas amostras de geoprópolis, pela análise qualitativa da técnica de *EDXRF*: Al, Si, P, S, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn, Sr e Zr. Para a análise quantitativa, o método de calibração empírica desenvolvido a partir do material de referência *SQC001* foi validado pela amostra padrão *CRM051*, estimando as concentrações dos elementos Si, K, Ca, Cr, Mn, Fe e Zn dentro da faixa dos 20% de erro. Desta forma, por meio do método quantitativo criado, foram estimadas as concentrações dos minerais presentes na geoprópolis, constatando que os valores foram altos, mas estão dentro do previsto na literatura para estas amostras. Além disso, valores altos na concentração de Cr foram constatados para a maioria das amostras (208,07-5,63ppm), indicando que estas podem ser de regiões com contaminação ambiental.

Para a classificação das amostras, foram utilizadas as abordagens multivariadas *RL* e *PCA*. Tanto os modelos de regressão logística e a *PCA* foram capazes de classificar com precisão amostras de geoprópolis das espécies *M. marginata*, *M. quadrifasciata* e *T. angustula*, com base nos dados das técnicas de *PAS* e *EDXRF*. Os resultados mostraram que tanto os compostos fitoquímicos presentes nas amostras quanto os minerais influenciam na sua classificação. Uma vez que a classificação ocorreu por espécies de abelhas sem ferrão de regiões semelhantes, podemos constatar que essas abelhas podem ser consideradas especialistas. Esse tipo de abelha sempre busca tipos específicos de resinas para compor sua geoprópolis.

Porém, da mesma forma, as concentrações dos elementos minerais encontrados, diferem de uma amostra para outra. Com isso, é possível associar a composição mineral a cada região de amostragem dos meliponários e diferenciar as amostras entre si, avaliando os componentes minerais. Portanto, os fatores que poderiam estar influenciando na classificação são as fontes vegetais dos compostos coletados pelas abelhas e os solos circundantes dos meliponários.

Desta forma, este trabalho mostrou que a caracterização de amostras de geoprópolis pelas técnicas de *PAS* e *EDXRF* podem ser úteis para o estudo das suas composições química e mineral. A combinação destas técnicas com análises multivariadas, amplia o poder de investigação, classificando as amostras com base nas espécies de abelhadas estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAUJO, MARIA; BUFALO, MICHELLE; CONTI, BRUNO; JR, ARY; TRUSHEVA, BORYANA; BANKOVA, VASSYA; SFORCIN, JOSE. The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in northeast Brazil. **Journal of Molecular Pathophysiology**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 12, 2015. DOI: 10.5455/jmp.20150204115607.
- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; MARCUCCI, C.; POPOV, S. Constituents of Brazilian geopropolis. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, [S. l.], v. 53, n. 5–6, p. 402–406, 1998. DOI: 10.1515/znc-1998-5-616.
- BECKMANN, Marcelo; LIMA, Beatriz S. L. P. De; EBECKEN, Nelson. PRÉ-PROCESSAMENTO PARA O APRENDIZADO DE MÁQUINA EM CONJUNTOS DE DADOS DESBALANCEADOS. [S. l.], n. November, 2009.
- BONSUCESSO, Josemário S.; GLOAGUEN, Thomas V.; DO NASCIMENTO, Andreia S.; DE CARVALHO, Carlos Alfredo L.; DE S. DIAS, Fabio. Metals in geopropolis from beehive of *Melipona scutellaris* in urban environments. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 634, p. 687–694, 2018. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.022>.
- CARDOZO, Danielle V.; MOKOCHINSKI, João B.; MACHADO, Christiane S.; SAWAYA, Alexandra Christine Helena F.; CAETANO, Isis K.; FELSNER, Maria Lurdes; TORRES, Yohandra R. Chemical variability of geopropolis from Jataí, Mandaçaia and mandurí stingless bees. **Revista Virtual de Química**, [S. l.], v. 7, n. 6, p. 2457–2474, 2015. DOI: 10.5935/1984-6835.20150146.
- CHANG, Roberto; CHANG, Roberto. Estudo Químico de Própolis do Estado de Minas Gerais Estudo Químico de Própolis do Estado de Minas. [S. l.], 2005.
- DUTRA, Richard Pereira; BEZERRA, Jeamile Lima; SILVA, Mayara Cristina Pinto Da; BATISTA, Marisa Cristina Aranha; PATRÍCIO, Fernando José Brito; NASCIMENTO, Flavia Raquel Fernandes; RIBEIRO, Maria Nilce Sousa; GUERRA, Rosane Nassar Meireles. Antileishmanial activity and chemical composition from Brazilian geopropolis produced by stingless bee *Melipona fasciculata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 287–293, 2019. DOI: 10.1016/j.bjp.2019.02.009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.02.009>.
- ELEUSIS, Gabriel; BIASI, Vicente De. Análise de Água e Sedimento de Pontos Turísticos da

Cidade de Guarapuava , PR por Fluorescência de Raios X com Dispersão em Energia (EDXRF) Water and Sediment Analysis of Touristic Places in Guarapuava , PR by means of Energy Dispersive X-ray Fluorescen. [S. l.], [s.d.].

FAUSTO VAZ DE OLIVEIRA Campina Grande – Paraíba - Brasil Março, 2014. [S. l.], 2014.

FERREIRA, Bruno Luís; GONZAGA, Luciano Valdemiro; VITALI, Luciano; MICKE, Gustavo Amadeu; MALTEZ, Heloisa França; RESSUREIÇÃO, Carolina; COSTA, Ana Carolina Oliveira; FETT, Roseane. Southern-Brazilian geopropolis: A potential source of polyphenolic compounds and assessment of mineral composition. **Food Research International**, [S. l.], v. 126, p. 108683, 2019. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.108683. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108683>.

FERREIRA, Patrick. Uso de técnicas de machine learning para análise de risco de crédito. [S. l.], 2022.

FIAMEGOS, Yiannis; DUMITRASCU, Catalina; GHIDOTTI, Michele; DE LA CALLE GUNTIÑAS, Maria Beatriz. Use of energy-dispersive X-ray fluorescence combined with chemometric modelling to classify honey according to botanical variety and geographical origin. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S. l.], v. 412, n. 2, p. 463–472, 2020. DOI: 10.1007/s00216-019-02255-6.

FIGUEIRA, Cleonis Viater. Modelos De Regressão Logística. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, [S. l.], p. 138, 2006.

FINGER, Daiane; FILHO, Irineo Kelte; TORRES, Yohandra Reyes; QUINÁIA, Sueli Pércio. Propolis as an indicator of environmental contamination by metals. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, [S. l.], v. 92, n. 3, p. 259–264, 2014. DOI: 10.1007/s00128-014-1199-4.

FORMAGGIO, A.; EPIPHANIO, J.; VALERIANO, M.; OLIVEIRA, J. Comportamento espectral (450-2.450 nm) de solos Tropicals de Sao Paulo. **Revista Brasileira De Ciencia Do Solo**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 467–474, 1996.

GARDANA, Claudio; SCAGLIANTI, Martina; PIETTA, Piergiorgio; SIMONETTI, Paolo. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S. l.], v. 45, n. 3, p. 390–399, 2007. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.06.022.

HERNANDEZ-AGUILAR, C.; DOMINGUEZ-PACHECO, A.; VALDERRAMA-BRAVO, C.; CRUZ-OREA, A.; MARTÍNEZ ORTIZ, E.; ORDONEZ-MIRANDA, J. Photoacoustic Spectroscopy in the Characterization of Bread with Turmeric Addition. **Food and Bioprocess**

- Technology**, [S. l.], v. 13, n. 12, p. 2104–2119, 2020. DOI: 10.1007/s11947-020-02546-2.
- HOKURA, Akiko. **X-ray Fluorescence Spectrometry**. [s.l.: s.n.]. v. 37 DOI: 10.2116/ANALSCI.HIGHLIGHTS2101.
- HONGYU, Kuang; SANDANIELO, Vera L. M.; OLIVEIRA-JR, Gilmar J. Análise de Componentes Principais: resumo teórico, aplicação e interpretação Principal Component Analysis: theory, interpretations and applications. **E&S - Engineering and Science**, [S. l.], v. 1, n. August, p. 83–90, 2015. DOI: 10.18607/ES20165053.
- INMACULADA GONZÁLEZ-MARTÍN, M.; ESCUREDO, Olga; REVILLA, Isabel; VIVAR-QUINTANA, Ana M.; CARMEN COELLO, M.; RIOCEREZO, Carlos Palacios; MONCADA, Guillermo Wells. Determination of the mineral composition and toxic element contents of propolis by near infrared spectroscopy. **Sensors (Switzerland)**, [S. l.], v. 15, n. 11, p. 27854–27868, 2015. DOI: 10.3390/s151127854.
- KIM, Jong Joo; KIM, You Sam; KUMAR, Vijay. Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, [S. l.], v. 54, n. May, p. 226–231, 2019. DOI: 10.1016/j.jtemb.2019.05.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.05.003>.
- LAVINAS, Flavia C. et al. Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: promising sources of biologically active compounds. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 389–399, 2019. DOI: 10.1016/j.bjp.2018.11.007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.11.007>.
- LEAL, Luís Guilherme M.; ZAMBONI, Cibele B.; NASCIMENTO, Roberto M.; RONALDO, Z. Characterization of the Scaptotrigona aff. Postica bee from Brazil using analytical techniques. [S. l.], p. 2879–2882, 2019.
- MANOHARA, B.; BELAGALI, S. L. Evaluation of energy dispersive scanning electron microscopy and X-ray fluorescence techniques for analysis of compost quality. **Analytical Methods**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 253–258, 2017. DOI: 10.1039/c6ay02586b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/C6AY02586B>.
- MARCUCCI, MC C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 83–99, 1995. DOI: 10.1051/apido:19950202.
- MARGARET, Prameela. Original Research Article Original Research Article Open Access. [S. l.], v. 07, n. 12, p. 17531–17535, 2017.
- MATOS, Ellen; RODRIGUES, Luciana; SOUZA, Pamella; SILVA, Renato; FARIA JR, Roberto. Espectroscopia Fotoacústica Para Analisar a Fertilidade De Solos Tratados Com

Biochar E Micorriza. **Química Nova**, [S. l.], v. 2018, n. 9, p. 989–998, 2018. DOI: 10.21577/0100-4042.20170270.

MEIRA, Carla Larissa Costa; NOVAES, Cleber Galvão; NOVAIS, Franciele Castro; DE JESUS, Vilisaimon da Silva; DE OLIVEIRA, Djalma Menezes; AGUIAR, Rosane Moura. Application of principal component analysis for the evaluation of the chemical constituents of *Mimosa tenuiflora* methanolic extract by DLLME/GC–MS. **Microchemical Journal**, [S. l.], v. 152, n. June 2019, p. 104284, 2020. DOI: 10.1016/j.microc.2019.104284. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104284>.

MELLO, W. L. de. ...; LÓIO, D. ...; VIANA, J. H. ... Aplicação da espectroscopia Fotoacústica na identificação De componentes do solo. **Comunicado Técnico**, [S. l.], v. 1, p. 8, 2010. Disponível em: <http://www.springerlink.com/index/10.1140/epjst/e2008-00503-8>.

NAGATA, Noemi; BUENO, Maria Izabel M. S.; PERALTA-ZAMORA, Patricio G. Mathematical methods to correct spectral interferences and interelemental effects in x-ray fluorescence quantitative analysis. **Química Nova**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 531–539, 2001.

NOVACOSKI, Ezequiel José; KAMINSKI CAETANO, Ísis; MELQUIADES, Fabio Luiz; MARQUES GENÚ, Aline; REYES TORRES, Yohandra; GONZÁLEZ-BORRERO, Pedro Pablo. Spectroscopic based partial least-squares models to estimate soil features. **Microchemical Journal**, [S. l.], v. 180, n. April, 2022. DOI: 10.1016/j.microc.2022.107617.

OROIAN, Mircea; DRANCA, Florina; URSACHI, Florin. Comparative evaluation of maceration, microwave and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from propolis. **Journal of Food Science and Technology**, [S. l.], v. 57, n. 1, p. 70–78, 2020. DOI: 10.1007/s13197-019-04031-x. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04031-x>.

ROTICH, Evalyne Jepkorir. Physicochemical Characterization of Honey from Selected Counties in Kenya. [S. l.], 2019. Disponível em: <http://41.204.161.209/handle/11295/109666%0Ahttp://erepository.uonbi.ac.ke/handle/11295/109663>.

ROUILLON, Marek; TAYLOR, Mark P. Can field portable X-ray fluorescence (pXRF) produce high quality data for application in environmental contamination research? **Environmental Pollution**, [S. l.], v. 214, p. 255–264, 2016. DOI: 10.1016/j.envpol.2016.03.055. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.055>.

SANTOS, E. S.; GAMA, E. M.; FRANÇA, R. DA S.; SOUZA, A. S.; MATOS, R. P. Espectrometria de Fluorescência de Raios-X na Determinação de Espécies Químicas. **Enciclopédia Biofera**, [S. l.], v. 9, n. 17, p. 3413–3432, 2013. Disponível em:

<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2013b/MULTIDISCIPLINAR/espectrometria.pdf>.

SCHIMIDT, Fernando; BUENO, Maria Izabel M. S.; POPPI, Ronei J. Aplicação de alguns modelos quimiométricos à espectroscopia de fluorescência de raios-X de energia dispersiva. **Química Nova**, [S. l.], v. 25, n. 6a, p. 949–956, 2002. DOI: 10.1590/s0100-40422002000600012.

SFORCIN, José Maurício. **Própolis E Geopropolis Uma Herança Das Abelhas**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://editoraunesp.com.br/catalogo/9788595461819,propolis-e-geopropolis>.

SHIMADZU CORPORATION. Shimadzu Energy Dispersive X-Ray Fluorescence Spectrometer Edx Series. [S. l.], n. May, 2010.

SILVA, Gustavo; MARILDÁ, Danna; APRENDENDO, Fernandes; MARME, Fernanda. CAPÍTULO 3 INTRODUÇÃO AOS ALGORITMOS GENÉTICOS Related papers. [S. l.], [s.d.].

SMOLLE, Christian et al. Complications in tissue expansion: A logistic regression analysis for risk factors. **Burns**, [S. l.], v. 43, n. 6, p. 1195–1202, 2017. DOI: 10.1016/j.burns.2016.08.030. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2016.08.030>.

SUREK, Monica; COBRE, Alexandre de Fátima; FACHI, Mariana Millan; SANTOS, Thalita Gilda; PONTAROLO, Roberto; CRISMA, Amanda Rabello; FELIPE, Karina Bettega; SOUZA, Wesley Maurício De. Propolis authentication of stingless bees by mid-infrared spectroscopy and chemometric analysis. **Lwt**, [S. l.], v. 161, n. March, p. 113370, 2022. DOI: 10.1016/j.lwt.2022.113370.

TORRES, A. R.; SANDJO, L. P.; FRIEDEMANN, M. T.; TOMAZZOLI, M. M.; MARASCHIN, M.; MELLO, C. F.; SANTOS, A. R. S. Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *tetragonisca angustula* stingless bees. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [S. l.], v. 51, n. 6, p. 1–10, 2018. DOI: 10.1590/1414-431X20187118.

TSIMOGLIANNIS, Dimitrios; SAMIOTAKI, Martina; PANAYOTOU, George; OREOPOULOU, Vassiliki. Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. **Molecules**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 593–606, 2007. DOI: 10.3390/12030593.

TURCO, João F.; DO NASCIMENTO, Camila L.; DE LIMA, Vanderlei A.; TORRES, Yohandra R. Could antioxidant capacity and flavonoid content of ethanolic extracts of geopropolis from Brazilian native bees be estimated from digital photos and NIR Spectra? **Microchemical Journal**, [S. l.], v. 157, n. May, p. 105031, 2020. DOI: 10.1016/j.microc.2020.105031. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105031>.

TURCO, João Fábio. Estimação do Teor de Flavonoides e Capacidade Antioxidante de Extratos de Geoprópolis por Análise de Imagens, Infravermelho e Quimiometria. *[S. l.]*, p. 97, 2019.

VARELLA, Carlos Alberto Alves. Análise de Componentes Principais. *[S. l.]*, p. 12, 2008.

VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; MARCUCCI, M. C.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian Meliponinae. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, *[S. l.]*, v. 55, n. 9–10, p. 785–789, 2000. DOI: 10.1515/znc-2000-9-1018.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. **Journal of Food Science**, *[S. l.]*, v. 73, n. 9, p. 117–124, 2008. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2008.00966.x.

WASTOWSKI, Arci Dirceu; DA ROSA, Genesio Mario; CHERUBIN, Maurício Roberto; RIGON, João Paulo Gonsiorkiewicz. Caracterização dos níveis de elementos químicos em solo, submetido a diferentes sistemas de uso e manejo, utilizando espectrometria de Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva (EDXRF). **Química Nova**, *[S. l.]*, v. 33, n. 7, p. 1449–1452, 2010. DOI: 10.1590/S0100-40422010000700005.

ANEXO A

Tabela 1A: Identificação das amostras de geoprópolis estudadas neste trabalho

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>Tetrágona 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 marginata</i>	Curitiba	PR	Mata Atlântica
21	<i>Melipona scutellaris</i>	Curitiba	PR	Mata Atlântica
22	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Curitiba	PR	Mata Atlântica
23	<i>Tetragonisca angustula</i>	Prudentópolis	PR	Mata Atlântica
24	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Prudentópolis	PR	Mata Atlântica
25	<i>Melipona marginata</i>	Prudentópolis	PR	Mata Atlântica
26	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Prudentópolis	PR	Mata Atlântica
27	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Prudentópolis	PR	Mata Atlântica
28	<i>Melipona marginata</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 bicolor</i>	Prudentópolis	PR	Mata Atlântica
32	<i>Melipona marginata</i>	Prudentópolis	PR	Mata Atlântica
33	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Prudentópolis	PR	Mata Atlântica
34	<i>Tetragonisca angustula</i>	Prudentópolis	PR	Mata Atlântica
35	<i>Melipona marginata</i>	Prudentópolis	PR	Mata Atlântica
36	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Prudentópolis	PR	Mata Atlântica
37	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Prudentópolis	PR	Mata Atlântica
38	<i>Tetragonisca angustula</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>Tetragonisca angustula</i>	Quarto Centenário	PR	Mata Atlântica
46	<i>Tetragonisca angustula</i>	Curitiba	PR	Mata Atlântica

ANEXO B

Tabela 2A: Valores das concentrações dos elementos Si, K, Ca, Cr, Mn, Fe e Zn medidas para as amostras de geoprópolis por meio do método de parâmetros fundamentais com amostra padrão SQC001, pela técnica de *EDXRF*.

Amostras	Si (ppm)	Variância	Desvio Padrão	K (ppm)	Variância	Desvio Padrão	Ca (ppm)	Variância	Desvio Padrão	Cr (ppm)	Variância	Desvio Padrão
1	714	0	0	2450	108	10	23660	354	19	92	23	5
2	965	0	0	1222	19	4	821	28	5	58	0	0
3	601	1	1	1178	40	6	4715	56183	237	49	1	1
4	1177	32	6	1214	51	7	5900	86	9	50	0	1
5	751	3	2	1087	1	1	4819	73	9	32	3	2
6	804	0	0	1949	64	8	1451	54	7	36	4	2
7	1219	0	0	2944	73	9	5396	50	7	111	9	3
8	1174	2	1	2870	58	8	1794	40	6	53	1	1
9	19	0	0	1995	6	2	5287	339	18	15	1	1
10	1600	68	8	5679	1903	44	8613	5034	71	208	16	4
11	14	0	0	6352	32	6	3826	65	8	8	4	2
12	780	0	0	1556	19	4	2533	69	8	43	4	2
13	269	0	0	2185	187	14	3051	122	11	22	0	1
14	831	0	1	1317	6	3	1461	34	6	34	1	1
15	14	0	0	1145	24	5	2022	23	5	7	0	1
16	510	0	1	3624	152	12	3502	268	16	89	1	1
17	22	0	0	10209	3152	56	12920	2220	47	11	7	3
18	1045	1	1	1583	14	4	1329	91	10	48	0	0
19	17	0	0	795	17	4	4900	54	7	7	3	2
20	1072	0	0	2756	127	11	4514	215	15	75	16	4
21	1134	2	1	3382	190	14	3963	143	12	65	13	4

22	871	13	4	2995	39	6	7050	143	12	75	1	1
23	19	0	0	2175	8	3	1904	172	13	9	0	0
24	528	5	2	2257	278	17	3598	228	15	110	4	2
25	674	2	1	2269	15	4	4164	117	11	53	10	3
26	602	0	0	2050	3	2	3046	211	15	40	2	2
27	325	0	0	1464	10	3	3010	37	6	23	8	3
28	884	0	0	2529	12	3	2662	88	9	42	0	1
29	1024	1	1	2297	32	6	4596	206	14	63	6	2
30	1025	1	1	2806	22	5	3339	397	20	45	0	0
31	717	41	6	2578	20	4	2153	13	4	32	6	3
32	661	1	1	1981	59	8	4414	69	8	49	4	2
33	403	0	1	1635	49	7	3396	20	4	32	12	3
34	12	0	0	1293	38	6	1560	120	11	6	0	1
35	839	0	1	3577	101	10	2172	2	1	34	9	3
36	303	1	1	1153	27	5	3374	272	16	26	5	2
37	732	2	1	2835	103	10	1178	19	4	29	2	1
38	13	0	0	1397	4	2	1777	133	12	6	0	0
39	15	0	0	1238	21	5	1682	8	3	20	4	2
40	23	0	0	1232	15	4	1658	174	13	6	0	0
41	569	1	1	4426	44	7	1864	26	5	41	1	1
42	733	2	1	1863	36	6	3710	144	12	61	4	2
43	26	0	0	1598	7	3	2362	87	9	6	2	2
44	872	0	1	3118	8	3	1847	109	10	34	1	1
45	49	0	0	995	15	4	2671	106	10	16	10	3
46	17	0	0	1480	33	6	1786	73	9	8	1	1

Tabela 2.1A: Valores das concentrações dos elementos Si, K, Ca, Cr, Mn, Fe e Zn medidas para as amostras de geoprópolis por meio do método de parâmetros fundamentais com amostra padrão SQC001, pela técnica de *EDXRF*.

Amostras	Mn	Variância	Desvio Padrão	Fe	Variância	Desvio Padrão	Zn	Variância	Desvio Padrão
1	934	46	7	28833	432	21	105	52	7
2	675	108	10	25253	2270	48	53	6	3
3	406	3	2	9203	1	1	86	20	4
4	442	32	6	10855	10	3	86	0	1
5	313	50	7	5215	17	4	59	2	2
6	1448	1286	36	12937	381	20	45	1	1
7	1400	39	6	48042	9561	98	157	5	2
8	1401	891	30	17638	257	16	42	2	1
9	28159	27755	167	1447	151	12	142	34	6
10	7020	42267	206	103098	331093	575	323	75	9
11	927	824	29	1004	42	6	50	2	1
12	1118	83	9	18532	604	25	55	6	2
13	734	86	9	9357	59	8	45	1	1
14	927	101	10	9498	101	10	28	5	2
15	3249	271	16	646	16	4	54	2	1
16	4846	28961	170	58286	86518	294	156	40	6
17	278	1522	39	498	19	4	34	1	1
18	1454	37	6	12651	157	13	29	2	1
19	6945	130	11	1004	6	2	59	0	1
20	1138	154	12	16212	874	30	63	4	2
21	2078	169	13	19031	188	14	105	2	1
22	2472	2097	46	33728	776	28	201	13	4
23	2485	66	8	940	25	5	60	1	1

24	2848	449	21	35697	152740	391	146	13	4
25	1199	385	20	23535	1619	40	118	10	3
26	1868	2434	49	21778	659	26	82	3	2
27	1957	3298	57	13391	165	13	57	7	3
28	1046	617	25	20204	639	25	70	1	1
29	1047	832	29	32117	3025	55	349	4	2
30	1269	147	12	20165	1509	39	70	1	1
31	854	12	3	14544	521	23	55	2	1
32	1457	2638	51	26426	3749	61	121	11	3
33	1565	3183	56	19182	64	8	95	25	5
34	3207	302	17	414	9	3	39	2	1
35	1861	4902	70	15559	3142	56	63	1	1
36	1566	77	9	14680	794	28	70	21	5
37	1265	728	27	10894	251	16	48	4	2
38	2982	255	16	412	28	5	42	8	3
39	2076	436	21	780	35	6	78	14	4
40	976	300	17	1130	9	3	50	10	3
41	1083	1359	37	24738	2432	49	95	0	1
42	1454	421	21	33253	5944	77	129	10	3
43	2152	654	26	1967	1	1	60	2	1
44	1763	5955	77	14643	2461	50	60	8	3
45	982	2233	47	7937	767	28	100	9	3
46	1316	3	2	860	32	6	65	4	2

ANEXO C

Figura 1A: Certificado de análise da amostra padrão SQC001


Certificate of Analysis
Metals in Soil

Number SQC001-50G
 Lot 017309
 Solvent (Matrix) Soil
 Hazard Imitant
 Storage & Handling Store at room temperature
 Expiration Date See Sample Label
 Certification Date: 7/24/2012
 Certified By:  Christopher Rucinski - QA Director

Analyte	Units	Certified ⁴ Value	k ⁵	Standard ² Deviation	Acceptance Limits ³	
Antimony, Sb 1305	Traceable to: NIST SRM 3102a	mg/Kg	125 ± 17.7	1.96	63.0	24.4 to 314
Arsenic, As 1010	Traceable to: NIST SRM 3103a Lot 010713	mg/Kg	202 ± 4.71	1.96	19.5	143 to 265
Barium, Ba 1015	Traceable to: NIST SRM 3104a Lot 070222	mg/Kg	662 ± 12.5	1.96	55.9	495 to 830
Beryllium, Be 1020	Traceable to: NIST SRM 3105a	mg/Kg	328 ± 5.60	1.96	26.3	249 to 406
Bronze, B 1025	Traceable to: NIST SRM 3107	mg/Kg	90.8 ± 3.38	1.96	12.7	42.6 to 119
Cadmium, Cd 1030	Traceable to: NIST SRM 3108 Lot 060531	mg/Kg	265 ± 3.92	1.96	23.4	194 to 335
Calcium, Ca 1035	Traceable to: NIST SRM 3109a Lot 050825	mg/Kg	3,090 ± 60.1	1.96	313	2,150 to 4,030
Chromium, Cr (total) 1040	Traceable to: NIST SRM 3112a Lot 990607	mg/Kg	232 ± 4.01	1.96	22.6	165 to 300
Cobalt, Co 1050	Traceable to: NIST SRM 3113 Lot 000630	mg/Kg	314 ± 5.75	1.96	26.8	234 to 394
Copper, Cu 1055	Traceable to: NIST SRM 3114 Lot 991811	mg/Kg	88.4 ± 1.50	1.96	7.65	65.4 to 111
Iron, Fe 1070	Traceable to: NIST SRM 3126a Lot 051031	mg/Kg	8,650 ± 310	1.96	2,480	1,420 to 16,300
Lead, Pb 1075	Traceable to: NIST SRM 3128 Lot 030721	mg/Kg	55.9 ± 1.34	1.96	6.49	35.4 to 75.4
Lithium, Li 1080	Traceable to: NIST SRM 3129a	mg/Kg	91.1 ± 6.10	1.96	16.8	40.8 to 141
Magnesium, Mg 1085	Traceable to: NIST SRM 3131a Lot 050302	mg/Kg	1,890 ± 54.1	1.96	253	1,100 to 2,680
Manganese, Mn 1090	Traceable to: NIST SRM 3132	mg/Kg	1,370 ± 48.0	1.96	94.0	1,090 to 1,660
Mercury, Hg 1095	Traceable to: NIST SRM 3133 Lot 061204	mg/Kg	22.9 ± 0.586	1.96	3.70	11.8 to 34.0
Molybdenum, Mo 1100	Traceable to: NIST SRM 3134	mg/Kg	181 ± 4.66	1.96	17.3	129 to 233
Nickel, Ni 1125	Traceable to: NIST SRM 3136 Lot 000612	mg/Kg	76.5 ± 1.45	1.96	7.31	54.6 to 98.4
Potassium, K 1125	Traceable to: NIST SRM 3141a Lot 051220	mg/Kg	8,890 ± 192	1.96	926	6,110 to 11,700
Selenium, Se 1140	Traceable to: NIST SRM 3149 Lot 992106	mg/Kg	144 ± 5.17	1.96	15.7	96.5 to 207
Silver, Ag 1150	Traceable to: NIST SRM 3151 Lot 952212	mg/Kg	55.9 ± 1.37	1.96	3.20	37.3 to 74.5
Sodium, Na 1155	Traceable to: NIST SRM 3152a Lot 010728	mg/Kg	4,890 ± 92.7	1.96	534	3,290 to 6,500
Strontium, Sr 1160	Traceable to: NIST SRM 3153a Lot 990908	mg/Kg	108 ± 10.7	1.96	10.7	76.0 to 140
Thallium, Tl 1165	Traceable to: NIST SRM 3158 Lot 993012	mg/Kg	118 ± 2.71	1.96	12.8	79.9 to 157
Tin, Sn 1175	Traceable to: NIST SRM 3161a Lot 070330	mg/Kg	154 ± 5.68	1.96	20.5	92.5 to 216
Titanium, Ti 1180	Traceable to: NIST SRM 3162a Lot 060808	mg/Kg	40.6 ± 4.57	1.96	15.7	0.00 to 87.8
Vanadium, V 1185	Traceable to: NIST SRM 3165	mg/Kg	220 ± 4.37	1.96	18.9	163 to 276
Zinc, Zn 1190	Traceable to: NIST SRM 3158a Lot 001402	mg/Kg	258 ± 4.41	1.96	24.9	183 to 333



REFERENCE MATERIAL PRODUCER



TESTING

Page 1 of 2



2931 Soldier Springs Road
 Laramie, WY 82070
 Phone: 307.742.5452
 Fax: 307.745.7936
 Web: www.RT-Corp.com



Certificate of Analysis

Metals in Soil

Number SQC001-50G
 Lot 017309
 Solvent (Matrix) Soil
 Hazard Irritant
 Storage & Handling Store at room temperature.
 Expiration Date See Sample Label
 Certification Date: 7/24/2012

Certified By: 

Christopher Rucinski - QA Director

Analyte	Units	Certified ⁴ Value	k ⁵	Standard ² Deviation	Acceptance Limits ³
Phosphorus, P 1910 Traceable to: NIST SRM 3139a	mg/Kg	371 ± 48.8	2.06	109	45.4 to 697
Sulfur, S 2017	mg/Kg	263 ± 49.3	2.15	72.7	45.0 to 481
Aluminum, Al 1000 Traceable to: NIST SRM 3101a	mg/Kg	11,100 ± 1,390	1.96	1,960	5,240 to 17,000
Silicon, Si 1145 Traceable to: NIST SRM 3150	mg/Kg	689 ± 244	2.07	623	0.00 to 2,560

Additional Information

Description

- A total sample size of 50g is provided.
- The sample has been heat sterilized.
- This sample should be digested using USEPA method 3050, 3051 or equivalent methods.

Preparation Instructions

- Perform the sample digestion on an appropriate amount of sample according to the selected digestion procedure. The recommended minimum sampling size is 0.5 grams.
- Determination of the percent moisture content of the material is required.
- All results are reported on a dry weight basis.
- It is recommended that approximately one gram of the soil be digested.

Impresso Certification Products, Inc. 800-828-9888 or UNICENTRO

¹ Certified value - based on a prepared to value and analytically verified by RTC with associated uncertainties from the preparation and analytical procedures.

² The standard deviation is the robust statistical standard deviation from the round robin interlaboratory study.

³ Acceptance limits are based on US EPA RCRA, WS, and WP Interlaboratory Study Results. These ranges are recommendations only.

⁴ Ucrm - Uncertainty values in this document are expressed as Expanded Uncertainty (Ucrm) corresponding to the 95% confidence interval. Ucrm is derived from the combined standard uncertainty multiplied by the coverage factor k, which is obtained from a t-distribution and degrees of freedom. The components of combined standard uncertainty include the uncertainties due to characterization, homogeneity, long term stability, and short term stability (transport). The components due to stability are generally considered to be negligible unless otherwise indicated by stability studies.

⁵ k: Coverage factor derived from a t-distribution table, based on the degrees of freedom of the data set. Confidence interval = 95%

Traceability: The standard was manufactured under an ISO/IEC 17025:2005 certified quality system. The balance used to weigh raw materials is accurate to +/- 0.0001g and calibrated regularly using mass standards traceable to NIST. All dilutions were performed gravimetrically. Additionally, individual analytes are traceable to NIST SRMs where available and specified above.

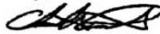
Homogeneity: Homogeneity was assessed in accordance with ISO Guide 35. Completed units were sampled using a random stratified sampling protocol. The results of chemical analysis were then compared using a one-way analysis of variance approach as described by TNI EL-V3-2009 Appendix A.2. See Instructions for minimum sub-sample size.

THIS PRODUCT WAS DESIGNED, PRODUCED AND VERIFIED FOR ACCURACY AND STABILITY IN ACCORDANCE WITH ISO/IEC 17025:2005 (AClass Cert AT-1467) and ISO GUIDE 34:2009 (AClass Cert AR-1470).

MSDS reports for components comprising greater than 1.0% of the solution or 0.1% for components known to be carcinogens are available upon request.

Figura 2A: Certificado de análise da amostra padrão CRM051

Certificate of Analysis
CERTIFIED REFERENCE MATERIAL

Trace Metals -Clay 2
Number CRM051-50G
Lot 018501
Solvent (Matrix) Clay Soil
Hazard Irritant
Storage & Handling Store in a cool dry environment.
Expiration Date See Sample Label
Certification Date: May 03, 2012
Certified By:  Christopher Rucinski - QA Director

ISO Guide 34
Cert# AR-1470

ISO/IEC 17025
Cert# AT-1467

Analyte	Units	Certified ^{1,4} Value	k ⁵	Standard ² Deviation	Confidence Interval	Prediction Interval
Aluminum, Al <small>Traceable to: NIST SRM 3101a Lot 992003</small>	mg/Kg	6,860 ± 773	1.96	3,060	6,070 - 7,640	816 - 12,900
Antimony, Sb <small>Traceable to: NIST SRM 3102a Lot 061229</small>	mg/Kg	76.3 ± 8.99	1.96	36.6	67.2 - 85.5	4.09 - 149
Arsenic, As <small>Traceable to: NIST SRM 3103a Lot 010713</small>	mg/Kg	84.1 ± 1.69	1.96	7.08	82.5 - 85.8	70.2 - 98.1
Barium, Ba <small>Traceable to: NIST SRM 3104a Lot 070222</small>	mg/Kg	517 ± 12.7	1.96	51.3	504 - 529	415 - 618
Beryllium, Be <small>Traceable to: NIST SRM 3105a Lot 892707</small>	mg/Kg	153 ± 2.56	1.96	10.1	150 - 155	133 - 173
Boron, B <small>Traceable to: NIST SRM 3107 Lot 070514</small>	mg/Kg	134 ± 4.15	1.96	14.1	130 - 138	106 - 162
Cadmium, Cd <small>Traceable to: NIST SRM 3108 Lot 060531</small>	mg/Kg	42.0 ± 0.997	1.96	4.26	41.0 - 43.0	33.6 - 50.4
Calcium, Ca <small>Traceable to: NIST SRM 3109a Lot 050825</small>	mg/Kg	2,630 ± 65.8	1.96	248	2,570 - 2,700	2,140 - 3,120
Chromium, Cr (total) <small>Traceable to: NIST SRM 3112a Lot 990607</small>	mg/Kg	269 ± 5.18	1.96	21.7	264 - 274	226 - 312
Cobalt, Co <small>Traceable to: NIST SRM 3113 Lot 000630</small>	mg/Kg	323 ± 6.54	1.96	25.9	316 - 329	271 - 374
Copper, Cu <small>Traceable to: NIST SRM 3114 Lot 891811</small>	mg/Kg	263 ± 5.36	1.96	22.3	257 - 268	219 - 307
Iron, Fe <small>Traceable to: NIST SRM 3126a Lot 051031</small>	mg/Kg	4,360 ± 135	1.96	524	4,220 - 4,490	3,320 - 5,390
Lead, Pb <small>Traceable to: NIST SRM 3128 Lot 030721</small>	mg/Kg	280 ± 6.66	1.96	28.4	274 - 287	224 - 336
Lithium, Li <small>Traceable to: NIST SRM 3129e</small>	mg/Kg	75.2 ± 5.74	1.96	15.7	69.3 - 81.0	43.8 - 107
Magnesium, Mg <small>Traceable to: NIST SRM 3101a Lot 050302</small>	mg/Kg	2,340 ± 68.6	1.96	258	2,280 - 2,410	1,830 - 2,850
Manganese, Mn <small>Traceable to: NIST SRM 3132 Lot 050429</small>	mg/Kg	994 ± 33.4	1.96	134	961 - 1,030	728 - 1,260
Mercury, Hg <small>Traceable to: NIST SRM 3133 Lot 061204</small>	mg/Kg	11.8 ± 0.351	1.96	1.32	11.4 - 12.1	9.15 - 14.4
Molybdenum, Mo <small>Traceable to: NIST SRM 3134 Lot 891307</small>	mg/Kg	215 ± 6.88	1.96	26.7	208 - 222	162 - 268
Nickel, Ni <small>Traceable to: NIST SRM 3136 Lot 000612</small>	mg/Kg	106 ± 2.30	1.96	9.60	103 - 108	86.7 - 125
Potassium, K <small>Traceable to: NIST SRM 3141a Lot 051220</small>	mg/Kg	2,280 ± 105	1.96	399	2,180 - 2,390	1,490 - 3,070
Selenium, Se <small>Traceable to: NIST SRM 3149 Lot 992106</small>	mg/Kg	138 ± 4.02	1.96	16.9	134 - 142	104 - 171
Silicon, Si <small>Traceable to: NIST SRM 3150</small>	mg/Kg	969 ± 304	2.06	643	666 - 1,270	0.00 - 2,330

Page 1 of 3

Analyte	Units	Certified ^{1,4} Value	K ⁵	Standard ² Deviation	Confidence Interval	Prediction Interval
Silver, Ag Traceable to: NIST SRM 3151 Lot 992212	mg/Kg	50.4 ± 1.12	1.96	4.28	49.3 - 51.5	41.9 - 58.8
Sodium, Na Traceable to: NIST SRM 3152a Lot 010728	mg/Kg	255 ± 12.0	1.96	45.8	243 - 267	165 - 345
Strontium, Sr Traceable to: NIST SRM 3153a Lot 990906	mg/Kg	248 ± 12.5	1.96	41.7	236 - 261	166 - 331
Thallium, Tl Traceable to: NIST SRM 3158 Lot 993012	mg/Kg	331 ± 9.36	1.96	36.8	322 - 340	258 - 404
Tin, Sn Traceable to: NIST SRM 3161a Lot 070330	mg/Kg	101 ± 2.73	1.96	8.94	98.5 - 104	83.4 - 119
Titanium, Ti Traceable to: NIST SRM 3162a Lot 060808	mg/Kg	82.5 ± 8.66	1.96	28.6	73.6 - 91.4	25.8 - 139
Vanadium, V Traceable to: NIST SRM 3165 Lot 992706	mg/Kg	142 ± 3.13	1.96	12.7	139 - 145	117 - 167
Zinc, Zn Traceable to: NIST SRM 3168a Lot 001402	mg/Kg	574 ± 12.8	1.96	53.3	561 - 586	469 - 679
Phosphorus, P Traceable to: NIST SRM 3139a	mg/Kg	259 ± 21.8	2.06	48.6	236 - 281	156 - 361

Additional Information

Description

- A total sample size of 50 g is provided.
- The sample has been heat sterilized.
- This sample should be digested using USEPA method 3050, 3051 or equivalent methods.

Preparation Instructions

- Perform the sample digestion on an appropriate amount of sample according to the selected digestion procedure. The recommended minimum sampling size is 1.0 grams.
- Determination of the percent moisture content of the material is required.
- All results are reported on a dry weight basis.

Storage

- The sample should be stored at 18°C (Room temperature) in a dark dry location. It has been determined to be stable for the duration of the expiration date.
- After sub-sampling replace cap securely and store remaining sample at 18°C.
- The shelf life of the product was determined by historic stability of similar CRM's. RTC may extended the expiration date based on stock and popularity upon successful stability testing by a 17025 accredited laboratory.
- Stability and shelf life after opening must be determined by the user, taking into account sampling frequency/volume and all local conditions.

Scope and Application

The Metals in Soil Certified Reference Material (CRM) consists of a single polypropylene sample jar containing approximately 50 grams of metals contaminated soil from a site located in the Western United States. Being a natural matrix waste sample the analyst is challenged by the same preparation problems, analytical interferences, etc. as is typical for similar matrices received by the laboratory for analysis. Rigorous analyses identified, quantified, and certified the metals which are listed on the enclosed Certificate of Analysis. The Reference Values were determined by USEPA SW846 (3rd edition) Methods 3050/3051 and 6010/6020, except for Arsenic (7060A), Mercury (7471A), Selenium (7740). The sample is suitable for other 3000-series metals digestion procedures and 7000-series spectroscopic methods. The sample has been analyzed by 32 independent laboratories in a round-robin to meet the requirements specified by the ISO Guides 34 and 35, and ISO 17025.

Evaluation of Results

The Reference Value, 95% confidence interval (C.I.) for the Reference Value and 95% Prediction Interval (P.I.) around the Reference Value were obtained by the methods identified in the 'Scope and Application' section of this Certificate of Analysis. Samples were selected in a random fashion from the beginning to the end of the bottling sequence and sent for analysis by an independent laboratory round-robin. The data produced in the round-robin was used to calculate reference values by the USEPA EMSL-CINN's computer program "BIWEIGHT".

The generated BIWEIGHT mean, BIWEIGHT standard deviation and BIWEIGHT standard deviation of the mean are used to calculate the 95% Confidence Interval (CI) for the mean and the 95% Prediction Interval (PI). For normally distributed data, the BIWEIGHT 95% CI compares well to the classical calculation method used to generate a 95% CI. For non-Gaussian data sets, the BIWEIGHT method is more robust in data treatment.



Certificate of Analysis

CERTIFIED REFERENCE MATERIAL

Trace Metals -Clay 2

Number CRM051-50G
 Lot 018501
 Solvent (Matrix) Clay Soil
 Hazard Irritant
 Storage & Handling Store in a cool dry environment.
 Expiration Date See Sample Label
 Certification Date: May 03, 2012
 Certified By:  Christopher Rucinski - QA Director

Evaluation of Results

BIWEIGHT data are also used to calculate a 95% PI. The 95% PI compares well to a 95% tolerance limit calculated using classical methods. For normally distributed data, the BIWEIGHT 95% PI typically represents approximately a ± 2 BIWEIGHT standard deviation window around the BIWEIGHT mean. Again, the BIWEIGHT method is more robust than classical methods when handling non-Gaussian data sets.

Laboratories performing the same analytical procedures on a sample whose values have been determined by the BIWEIGHT method can assume that the true mean, as determined by the method, is within the 95% CI window. Laboratories analyzing the sample should have results within the 95% PI window 19 out of 20 analyses. Laboratories should use the PI as guidance for laboratory performance.

Additional information on the program may be obtained by referring to the reference or by downloading the program from the EMSL-CINN web site. Additionally contact RTC for additional guidance - 1(307)742-5452 - support@rt-corp.com - www.rt-corp.com

Health and Safety Information

All RTC Certified Reference Materials are intended only for professional use by properly trained laboratory personnel. This CRM has been reviewed for both health and safety and shipping risks. It is classified as non hazardous and is not classified as hazardous goods for shipping by road, sea or air transport.

A full international MSDS as a downloadable pdf file is available at www.rt-corp.com

1 Certified values are the robust statistical mean when prepared according to instructions from an Interlaboratory Study and internal rigorous testing.
 2 The standard deviation is the robust statistical standard deviation from the round robin interlaboratory study.

4 Expanded Uncertainty (U_{cr}m) - All uncertainty values in this document expressed as \pm value are expanded uncertainties.

5 k: Coverage factor derived from a t-distribution table, based on the degrees of freedom of the data set. **Confidence interval = 95%**

TRACEABILITY: The standard was manufactured under an ISO 17025 certified quality system. The balance used to weigh raw materials is accurate to ± 0.0001 g and calibrated regularly using mass standards traceable to NIST. All dilutions were performed gravimetrically. Additionally, individual analytes are traceable to NIST SRMs where available and specified above.

HOMOGENEITY ASSESSMENT: Between-bottle homogeneity was assessed in accordance with ISO Guide 35. Completed units were sampled over the course of the bottling operation. Samples were taken in the following manner: the units produced in the bottling operation were divided into three chronological groups, those from the Early third, the Middle third, and the Late third (Groups). A pre-determined number of sample units were then randomly selected from each group. A subset of each group was then randomly selected for chemical analysis. The results of the chemical analysis were then compared by Single Factor Analysis of Variance (ANOVA).

UNCERTAINTY STATEMENT: Uncertainty values in this document are expressed as Expanded Uncertainty (U_{cr}m) corresponding to the 95% confidence interval. U_{cr}m is derived from the combined standard uncertainty multiplied by the coverage factor k, which is obtained from a t-distribution and degrees of freedom. The components of combined standard uncertainty include the uncertainties due to characterization, homogeneity, long term stability, and short term stability (transport). The components due to stability are generally considered to be negligible unless otherwise indicated by stability studies.

THIS PRODUCT WAS DESIGNED, PRODUCED AND VERIFIED FOR ACCURACY AND STABILITY IN ACCORDANCE WITH ISO 17025 (A Class Cert AT-1467) and ISO GUIDE 34 (A Class Cert AR-1470).

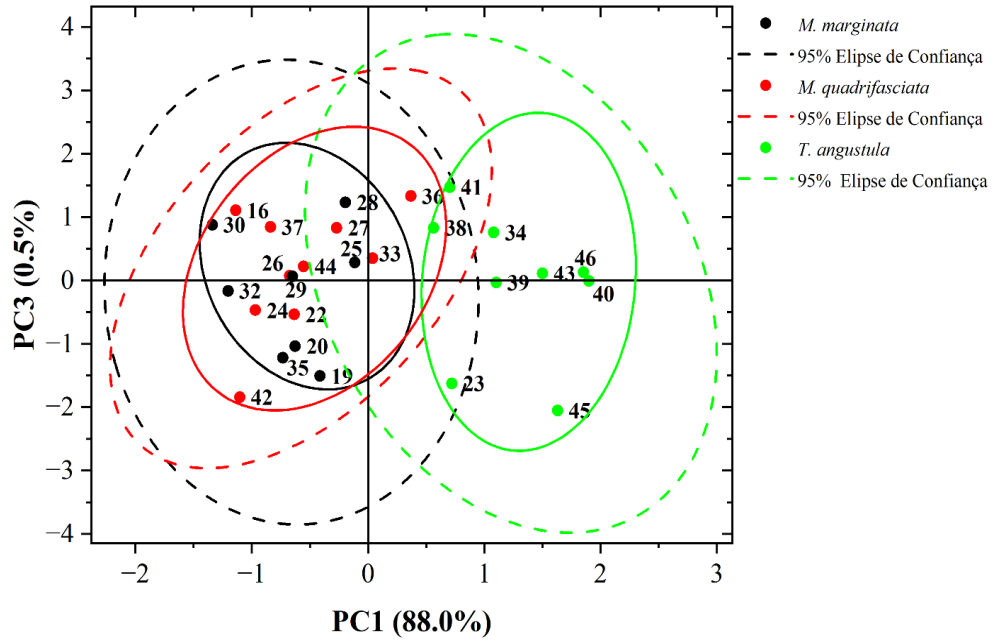
MSDS reports for components comprising greater than 1.0% of the solution or 0.1% for components known to be carcinogens are available upon request.

Manufactured and certified by Sigma-Aldrich RTC, Inc.

242 - 77

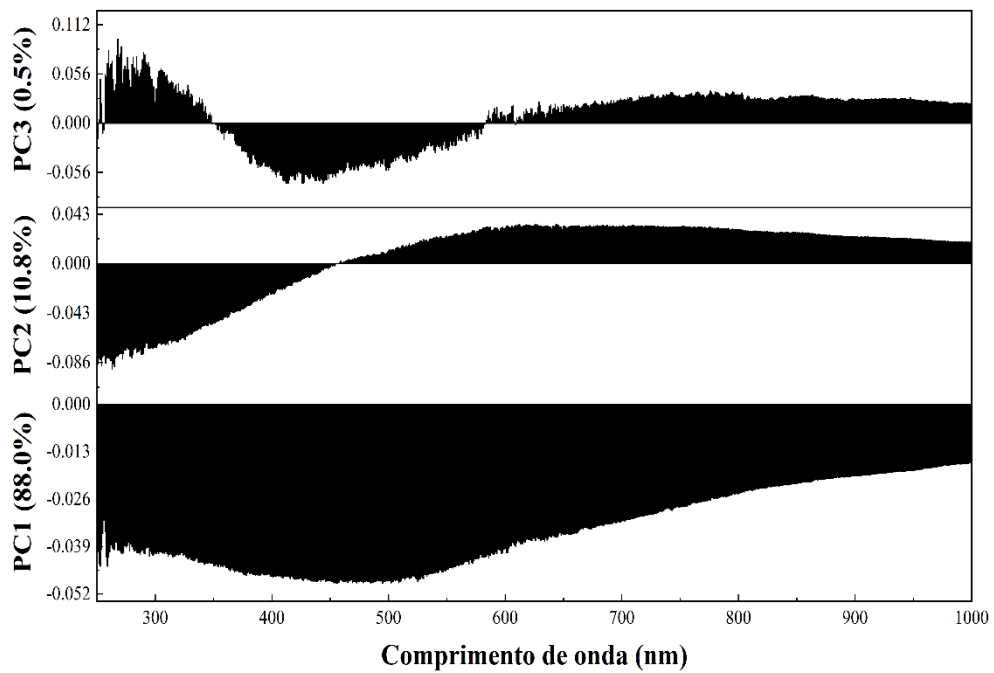
ANEXO D

Figura 3A: Gráfico *Score PC1 e PC3* baseado nos dados espectrais da técnica *PAS*, classificados de acordo com a espécie de abelha (linhas sólidas) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (linhas tracejadas)

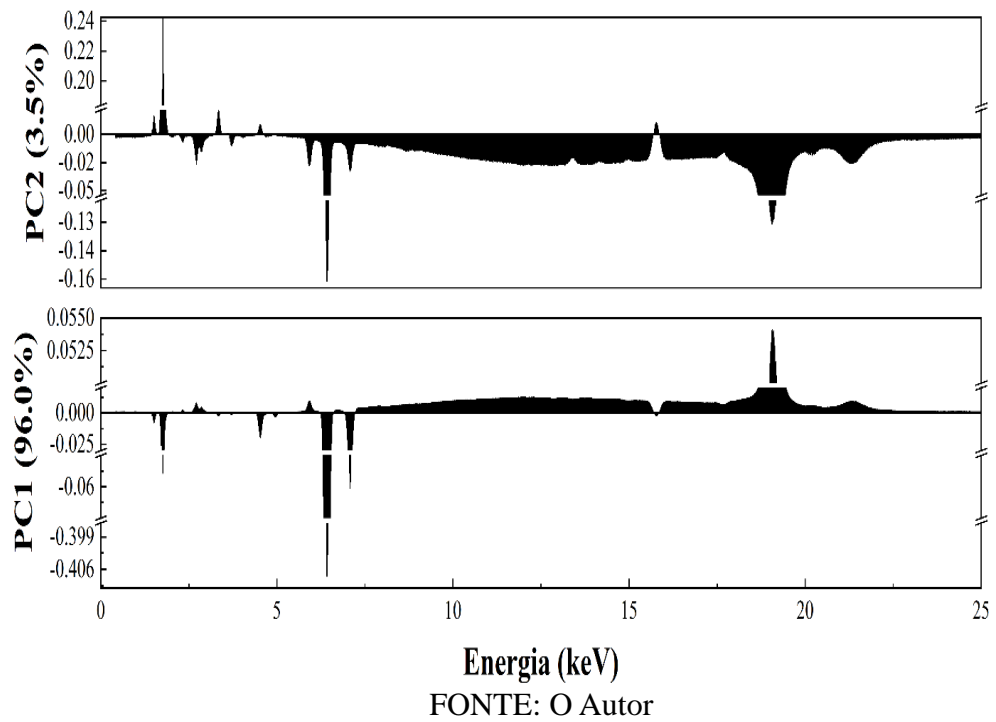


FONTE: O Autor

Figura 4A: Gráficos de *loadings PC1, PC2 e PC3* baseados nos dados espectrais da técnica *PAS*



FONTE: O Autor

Figura 5A: Gráficos de *loadings* PC1 e PC2 baseados nos dados qualitativos da técnica*EDXRF***Figura 6A:** Gráficos de *loadings* PC1 e PC2 baseados nos dados quantitativos da técnica*EDXRF*