

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO - OESTE/ UNICENTRO

CAMILA LIMA DO NASCIMENTO

**COMBINAÇÃO DE FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS E TÉCNICAS
ESPECTROFOTOMÉTRICAS APLICADAS NA ESTIMATIVA DA
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE PRÓPOLIS**

GUARAPUAVA

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO - OESTE/ UNICENTRO

CAMILA LIMA DO NASCIMENTO

**COMBINAÇÃO DE FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS E TÉCNICAS
ESPECTROFOTOMÉTRICAS APLICADAS NA ESTIMATIVA DA
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE PRÓPOLIS**

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Química, Setor de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Estadual do Centro-Oeste, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^a Dr^a Yohandra Reyes Torres

GUARAPUAVA

2022

Catálogo na Publicação
Rede de Bibliotecas da Unicentro

N244c Nascimento, Camila Lima do
Combinação de ferramentas estatísticas e técnicas
espectrofotométricas aplicadas na estimativa da capacidade antioxidante de
própolis / Camila Lima do Nascimento. -- Guarapuava, 2022.
vi, 52 f.: il.; 28 cm

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

Orientadora: Yohandra Reyes Torres

Banca examinadora: Daiane Finger, Patrícia Valderrama

Bibliografia

1. Própolis. 2. Capacidade antioxidante. 3. Regressão PLS. 4. Análise
multivariada. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química.

CDD 540

CAMILA LIMA DO NASCIMENTO

**COMBINAÇÃO DE FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS E TÉCNICAS
ESPECTROFOTOMÉTRICAS APLICADAS NA ESTIMATIVA DA
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE PRÓPOLIS**

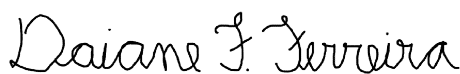
Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Química, Setor de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Estadual do Centro-Oeste, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Yohandra Reyes Torres

Aprovado em 16 de setembro de 2022.



Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Valderrama (UTFPR)



Prof^ª. Dr^ª. Daiane Finger Ferreira (UNICENTRO)



Prof^ª. Dr^ª. Yohandra Reyes Torres

Orientadora

GUARAPUAVA-PR

2022

RESUMO

A própolis é um produto apícola de alto valor científico. Seu controle de qualidade inclui a determinação de seus teores de flavonóides e fenólicos e capacidade antioxidante. Essas propriedades são obtidas por métodos espectrofotométricos que muitas vezes compreendem protocolos analíticos com várias etapas e utilizam solventes orgânicos e reagentes tóxicos. No entanto, esses protocolos incluem procedimentos clássicos e demorados, principalmente quando se analisa grande número de amostras de forma rotineira em laboratórios de controle de qualidade. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um método mais rápido e de menor custo para a determinação de parâmetros de qualidade de própolis, combinando ferramentas quimiométricas e espectroscópicas. Para este trabalho, os espectros de infravermelho médio e ultravioleta dos extratos de própolis foram registrados e os teores de flavonóides e fenólicos e a capacidade antioxidante das amostras pelos métodos DPPH e CUPRAC, foram usados como ensaios de referência. Posteriormente, a Regressão Parcial dos Mínimos Quadrados (Regressão PLS) foi aplicada para modelar a relação entre os dados espectroscópicos e as propriedades da própolis. Todos os modelos de PLS baseados em IR e UV foram adequados para estimar a capacidade antioxidante e os teores de flavonóides totais e fenólicos de amostras de própolis. Os coeficientes de determinação para calibração foram maiores ou iguais a 0,65 ($R^2 \geq 0,65$) e foram obtidos valores adequados para RMSEC, RMSEP, RMSECV e RPD. Conseqüentemente, espectros de IR e UV simples combinados com modelos PLS podem ser potencialmente usados para prever as propriedades estudadas com precisão aceitável. Esta abordagem pode ser empregada no controle de qualidade de extratos de própolis com as vantagens de ser uma metodologia rápida, de baixo custo e verde, reduzindo o manuseio laborioso de amostras, reagentes químicos, solventes, além de diminuir os resíduos químicos e, portanto, o impacto no meio ambiente.

Palavras-chave: Própolis, Capacidade Antioxidante, Regressão PLS, Análise Multivariada.

ABSTRACT

Propolis is an apicultural product of high scientific value. Its quality control includes the determination of its flavonoid and phenolic contents and antioxidant capacity. These properties are obtained by spectrophotometric methods which often comprise analytical protocols with several steps and uses organic solvents and toxic reagents. Then, these protocols are time consuming, especially when large number of samples are analyzed as it is routine in quality control laboratories. In this regard, the present work aimed to develop a faster and lower cost method for the determination of quality parameters of propolis, combining chemometric and spectroscopy tools. To this purpose, mid-IR and UV spectra of propolis extracts were recorded and the flavonoid and phenolic contents and the antioxidant capacity of propolis samples by DPPH and CUPRAC methods were used as references assays. Subsequently, Partial Least Squares Regression (PLS Regression) was applied to model the relationship between spectroscopic data and properties of propolis. All IR-based and UV-based PLS models were appropriate to estimate the antioxidant capacity and total flavonoids and phenolic contents of propolis samples. Determination coefficients for calibration were higher or equal than 0.65 ($R^2 \geq 0.65$) and adequate values for RMSEC, RMSEP, RMSECV, and RPD were obtained. Consequently, simple IR and UV spectra combined with PLS models can be potentially used to predict the studied properties with acceptable accuracy. This approach might be employed in the quality control of propolis extracts with the advantages of being a fast, low cost and green methodology reducing laborious handling of sample, chemical reagents, solvents in addition to decreasing chemical waste and potential environment impact.

Keywords: Propolis; Antioxidant Capacity; Partial Least Squares Regression; Multivariate Data Analysis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GERAL	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1 ABELHAS	11
3.2 PROPOLIS.....	13
3.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	14
3.3.1 Compostos Fenólicos e Flavonoides	15
3.3.2 Métodos de determinação da capacidade antioxidante <i>In vitro</i>	18
3.3.2.1 Fundamentos do Ensaio CUPRAC	18
3.3.2.2 Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) como método para a determinação de capacidade antioxidante	20
3.3.2.3 Compostos Fenólicos Totais e Teor de Flavonoides.....	20
3.4 QUIMIOMETRIA E ANÁLISE MULTIVARIADA	22
4 METODOLOGIA	23
4.1 AMOSTRAS E EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS (EEPS)	23
4.2 TEOR TOTAL DE FLAVONÓIDES.....	24
4.3 CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL	24
4.4 ENSAIO CUPRAC (CUPRIC ION REDUCING ANTIOXIDANT CAPACITY)	25
4.5 ENSAIO DPPH.....	25
4.6 OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE INFRAVERMELHO	26
4.7 OBTENÇÃO DOS ESPECTROS NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA E DO VISÍVEL (UV-VIS).....	26

4.8 MODELOS DE REGRESSÃO PLS	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	27
5.1 TEOR DE FENÓLICOS, FLAVONÓIDES E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA PRÓPOLIS	27
5.2 PERFIL DOS ESPECTROS DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS	32
5.3 MODELOS DE REGRESSÃO OBTIDOS COM O ESPECTRO ULTRAVIOLETA	35
5.4 MODELOS DE REGRESSÃO OBTIDOS COM O ESPECTRO INFRAVERMELHO	41
6 CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1 INTRODUÇÃO

Produzida pelas abelhas africanizadas e por uma parcela de abelhas sem ferrão (tribos Apini e Meliponini), através da mistura do pólen (coletado em flores), com resinas, enzimas (produzidas pelas próprias abelhas) e ceras, a própolis é um produto natural de aspecto resinoso e propriedade adesiva, inicialmente utilizada pelas abelhas com a finalidade de estruturar e proteger suas colméias. Trata-se de um produto natural de composição química rica e complexa, que pode variar de acordo com as fontes botânicas coletadas pelas abelhas ao redor de suas colmeias [1].

Mais de 300 componentes químicos já puderam ser identificados na própolis, sendo os principais pertencentes às classes dos polifenóis, aldeídos fenólicos, cetonas, entre outros [2–5]. Nesse sentido, os extratos de própolis possuem inúmeras propriedades biológicas e farmacológicas como: capacidade antioxidante, atividade antibacteriana, ação antitumoral, entre outras [2,4–7].

A composição complexa da própolis também torna sua padronização química, se não impossível, um desafio. No entanto, um estudo aprofundado das propriedades da própolis coletada em importantes regiões produtoras contribui diretamente para o estabelecimento de perfis químicos e farmacológicos para esse tipo de própolis, agregando valor comercial a este produto. Nesse sentido, a elucidação de seu potencial farmacológico é válida dentro e fora da esfera científica. Mas obter essas informações ainda não é um processo trivial. Outras conclusões requerem protocolos analíticos laboriosos e instrumentação sofisticada quando a cromatografia é empregada no controle de qualidade.

A quimiometria compreende o uso de ferramentas estatísticas e matemáticas para o tratamento de dados químicos, na maioria dos casos dados multivariados, por meio da interpretação do que é realmente significativo e importante [8]. *Softwares* matemáticos e estatísticos atuam cada vez mais como ferramentas poderosas capazes de aprimorar experimentos, reconhecer padrões, desenvolver modelos de classificação, realizar calibração multivariada e até mesmo processar imagens [8,9].

A combinação de ferramentas estatísticas, técnicas analíticas e medidas espectrais para estimar as propriedades químicas da própolis e outros produtos naturais, têm se

mostrado bastante eficaz, permitindo simplicidade, baixo custo, rapidez e redução na geração de resíduos. Entre as ferramentas mais utilizadas destaca-se a obtenção de espectros infravermelhos de amostras, assim como espectros na região ultravioleta-visível e análise multivariada (principalmente regressão PLS), gerando modelos matemáticos capazes de prever as propriedades químicas desejadas [10–12].

A regressão PLS usa combinações lineares de variáveis que predizem a análise, em vez de usar as variáveis originais[8]. Esta análise pode escrever uma relação entre dois conjuntos de dados, onde o primeiro conjunto admite as variáveis independentes (geralmente representadas por dados de espectroscopia), e o segundo, representa as variáveis dependentes (valores quantitativos das mais diversas análises). Na regressão PLS, portanto, as variáveis que tiverem maior correlação com as variáveis de resposta terão maior peso, pois de acordo com o modelo serão mais efetivas na predição [11]. Com base nesses modelos estatísticos capazes de prever dados, o procedimento de obtenção de informações (como a determinação da capacidade antioxidante) é facilitado.

Modelos apropriados demonstrarão que com a simples obtenção de um espectro pode ser possível prever propriedades de uma dada amostra sem a necessidade de um trabalho laborioso em bancada. Este trabalho, portanto, possui o objetivo de contribuir para o desenvolvimento de uma metodologia rápida, verde e de baixo custo para estimar propriedades de qualidade da própolis marrom brasileira, combinando dados de espectroscopia e ferramentas quimiométricas na construção de modelos estatísticos capazes de prever parâmetros de qualidade da própolis.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver modelos estatísticos de predição obtidos pela ferramenta de regressão por mínimos quadrados parciais (regressão PLS) visando criar um método indireto, simples, rápido e de baixo custo para a estimativa da capacidade antioxidante de própolis.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter os dados de referência, que envolvem a determinação da capacidade antioxidante da própolis através dos ensaios CUPRAC e DPPH bem como a quantificação de fenólicos e flavonoides;
- b) Obter as medidas espectrais dos extratos de própolis na região do Infravermelho e Ultravioleta Visível;
- c) Correlacionar os dados dos ensaios de referência às medidas espectrais na região do Ultravioleta Visível e Infravermelho dos extratos através da ferramenta estatística de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), de modo a criar modelos que permitam a estimativa das propriedades moduladas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ABELHAS

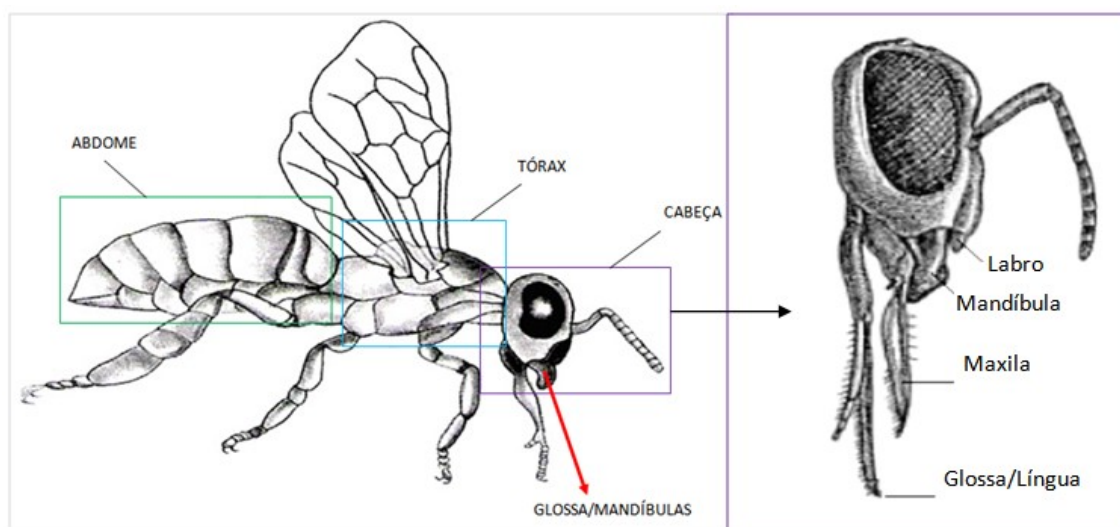
Abelhas são insetos pertencentes ao grupo *Aculeata* da ordem *Hymenoptera*, que apresentam algumas semelhanças físicas e de comportamento às das vespas (pertencentes à mesma ordem), sendo diferenciadas principalmente pelo fato de que coletam pólen e néctar diretamente nas flores para alimentarem suas larvas em vez de fazerem a captura de outros artrópodes para a própria alimentação [13].

Apesar de apresentarem algumas semelhanças a outros insetos pertencentes à mesma ordem, acredita-se que as abelhas constituam um grupo monofilético; o que significa que possam todas ter origem de uma única espécie ancestral e reúnam, portanto, todas as espécies descendentes [13].

As abelhas são os principais agentes polinizadores de vegetais naturais, já que ao coletarem o néctar presente em flores, espalham o pólen também presente, de forma que a reprodução destas plantas seja facilitada [14]. O néctar admitirá extrema importância no que diz respeito ao bom desenvolvimento das colméias, uma vez que se trata de uma rica fonte de proteínas, importante para o desenvolvimento das abelhas e, portanto, da perpetuação da espécie [8,14].

Elas irão coletar o néctar através da glossa (língua), e a produção da própolis ou geléia real, por exemplo, é inteiramente feita no seu aparelho bucal através da mistura do pólen, néctar e fluídos localizados na sua glossa e mandíbulas [15,16]. Na figura 1 é possível visualizar a representação da morfologia básica da abelha e a localização da glossa no seu aparelho bucal.

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO MORFOLÓGICA BÁSICA DAS ABELHAS



FONTE: Adaptado de RAMOS; CARVALHO (2007) e CAMARGO et al. (2002).

A partir desta interação inseto/vegetal e da então produção do mel, própolis dentre outros produtos naturais, o homem também é beneficiado. Estes produtos já muito utilizados e/ou implementados no dia a dia, inicialmente na forma de alimentos, passam então a ter diversas potenciais aplicações no que diz respeito à saúde humana; tanto é que já são objetos de estudo por inúmeros cientistas no mundo todo [1,17].

Apesar de essencial, todas estas atividades reproduzidas pelas abelhas são atualmente ameaçadas principalmente pelo uso indiscriminado de pesticidas, além da degradação dos ecossistemas e mesmo o aquecimento global; todos estes são fatores que podem levar a extinção das abelhas [18–20]. Nesse sentido a pesquisa e a apicultura passam a ter papéis importantes para que tal problema possa ser prevenido ou amenizado.

O Brasil possui a vantagem de apresentar regiões geográficas com flora e clima bastante variados; isso permite que a Apicultura seja muito favorecida no país, de forma que a coleta de mel e de outros produtos possa ser feita durante o ano todo [8,21]. Além disso, a vegetação bastante variada do país acarreta em produtos de composição química muito rica, o que instiga os pesquisadores a procurarem cada vez mais por novas possibilidades de aplicação [1].

3.2 PROPOLIS

A palavra “própolis” tem origem grega, tendo seu significado dividido em duas partes: “pro” que representa “em defesa de”, e “polis” que significa cidade [22]. Isso porque a própolis tem inicialmente a finalidade de participar na estruturação das colméias, seja dando resistência, seja mantendo a temperatura ou então atuando na sua vedação, evitando sua decomposição ou protegendo a colônia de invasores ou doenças [1,22,23].

Seu aspecto ou formato é variado porque dependerá de muitos fatores. Algumas podem apresentar textura enrijecida enquanto outras podem apresentar propriedades elásticas e/ou adesivas com coloração que pode variar entre o amarelo, marrom, verde ou vermelho, por exemplo [1,2,22,24]. A composição química da própolis por sua vez, dependerá majoritariamente da flora disponível, ou seja, isso influenciará de forma qualitativa na própolis; fatores como estação do ano e região de coleta, influenciarão na sua produção de forma quantitativa [1,5,25,26].

A própolis apresenta uma variabilidade química bastante grande e chama a atenção por tal característica. E é por causa dessa complexidade na sua composição que acaba por desempenhar diversas propriedades como: a capacidade antioxidante, a atividade anti-inflamatória, antibacteriana, antitumoral, anticancerígena, dentre outras [2,4–7]. Contudo, sua atividade anticancerígena se deve aos compostos antioxidantes presentes na sua composição [2]. De acordo com Martinotti e Ranzato (2015), são os flavonoides presentes na própolis capazes de agir contra cânceres, como o de pulmão, pele, dentre outros [23].

Sua composição complexa exige também muito cuidado na sua extração, sendo necessário, por exemplo, um estudo em cima dos solventes que serão utilizados para tal. Diversos solventes podem ser utilizados mas diferentes solventes solubilizarão e extrairão compostos diferentes; sendo assim, o método de preparo de extratos também influencia na atividade biológica do produto [1,27–29]. Dentre os solventes mais utilizados estão os etanólicos, os hidroalcoólicos e os metanólicos.

3.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Atividade antioxidante é o termo usado para descrever a cinética da ação antioxidante em eliminar espécies reativas, geralmente sendo expressa através de reações de velocidade ou porcentagens de eliminação por unidade de tempo, já a capacidade antioxidante está relacionada com a eficiência termodinâmica de um antioxidante em converter espécies reativas, podendo ser descrita pelo número de mols de espécies reativas que são eliminadas por mol de antioxidante durante um determinado período [30].

Os compostos antioxidantes são responsáveis por retardar o efeito de radicais livres, que são moléculas com spins desemparelhados e bastante reativas, presentes em várias situações do dia a dia, porém muitas vezes de forma prejudicial. Os radicais livres são responsáveis pelo ranço que ocorre em alimentos, pela degradação de plásticos à luz solar, e acredita-se também, que essas espécies estão relacionadas ao envelhecimento humano, e à origem de doenças [31].

Os radicais surgem naturalmente no corpo humano como subprodutos do metabolismo e adquirem funções importantes, mas podem vir a causar problemas ao organismo caso não sejam eliminados quando não são mais necessários. Na maioria das vezes apresentam átomos de oxigênio com elétrons desemparelhados, que por sua vez, podem oxidar moléculas de gorduras que formam membranas celulares dentre outros tecidos vitais[31]. Tecidos ou membranas que são afetadas pela ação dos radicais não são mais capazes de proteger células contra doenças; ácidos nucleicos como DNA e RNA também são afetados passando a não conseguirem se replicar de forma ideal, o que produz células defeituosas e com menor proteção contra doenças como o câncer, por exemplo [31].

Os antioxidantes são moléculas com alto potencial de oxidarem-se e, por sua vez tendem a reagir com os radicais livres antes que eles possam atingir outras moléculas no organismo. O corpo humano necessita de um número considerável de compostos antioxidantes, como por exemplo, as vitaminas C e E que são comumente encontradas em alimentos, que conseguem inibir os efeitos dos radicais. Entretanto, em situações de estresse oxidativo, causadas principalmente pelo contato com poluição, má alimentação, fumaça de cigarro, dentre outras, a concentração dos radicais aumenta de forma

desordenada no corpo, e estando em concentrações relativamente altas no organismo, os antioxidantes normalmente consumidos não conseguem retardar os efeitos danosos provocados [31].

Por isso a ingestão de compostos antioxidantes se torna necessária, sendo uma alternativa para quem deseja ter uma alimentação equilibrada e saudável. O uso de compostos antioxidantes já se tornou bastante comum, sendo aplicados na formulação de muitos cosméticos, suplementos e, sobretudo, estas espécies podem ser encontradas em produtos naturais como: frutas, chás, produtos apícolas (como o mel e a própolis) dentre outros, que ganham vantagem com relação aos demais por serem produtos mais saudáveis e, portanto, mais convenientes para o consumo [32,33].

3.3.1 Compostos Fenólicos e Flavonoides

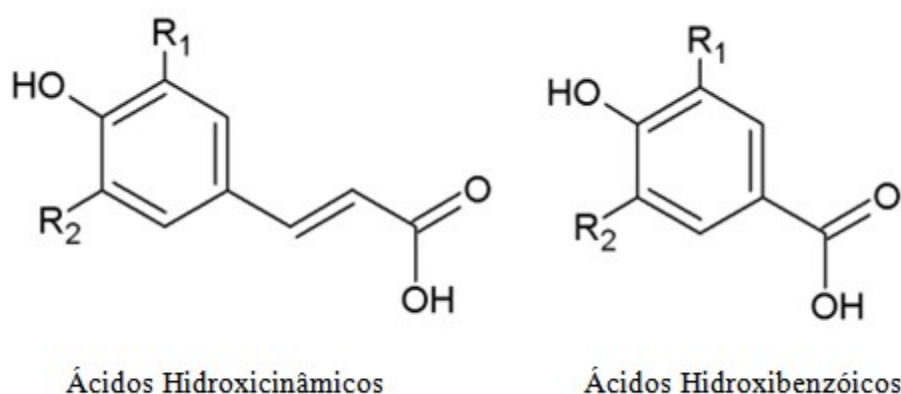
Compostos fenólicos são todas aquelas substâncias que possuem várias funções fenol (outro nome dado ao hidroxibenzeno) ligadas a estruturas aromáticas ou alifáticas; têm origem no mundo vegetal sendo dos principais metabólitos secundários das plantas [33,34]. Nas plantas irão atuar como compostos que as defendem de ataques de fungos ou bactérias e também contribuirão na sua pigmentação bem como na pigmentação de futuros frutos [34]. Quando estes fenóis são oxidados, transformam-se em quinonas, que, por sua vez, se apresentam como a coloração marrom nos alimentos, muitas vezes indesejável [34].

Os compostos fenólicos apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, e são estas estruturas que lhes conferirão o potencial antioxidante [35]. Esses compostos podem ser naturais ou sintéticos sendo que, quando presentes em vegetais podem estar em formas livres ou ligadas a açúcares e proteínas [33,35]. Dentre eles, destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos e os taninos como os antioxidantes fenólicos mais comuns de fonte natural.

Os ácidos fenólicos são derivados hidroxilados de ácidos carboxílicos aromáticos dos grupos ácido hidroxibenzoico (que possuem em sua estrutura um núcleo comum de C6 – C1) e ácido hidroxicinâmico (compostos aromáticos com três carbonos que formam uma lateral de C6- C3 [35]. A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e de

seus derivados dependerá diretamente do número de grupos hidroxila ligados ao anel aromático, da posição destes, além do tipo de substituinte [36]. A capacidade antioxidante será modulada conforme à capacidade que os substituintes têm de doar seus átomos de hidrogênio [36]. A figura 2 traz a representação estrutural dos grupos citados anteriormente.

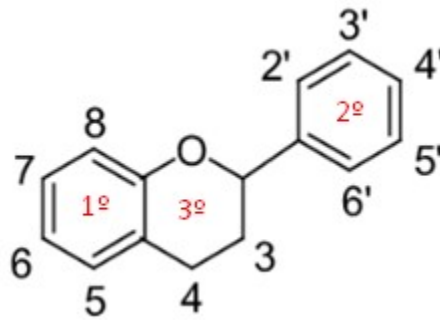
FIGURA 2. ESTRUTURAS QUÍMICAS REFERENTES AOS ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS E HIDROXIBENZÓICOS



FONTE: A autora.

Quanto aos flavonoides, sua estrutura química consiste basicamente em três anéis, sendo dois deles aromáticos unidos por um terceiro anel heterocíclico (Figura 3). O primeiro anel (1^o) se origina do ciclo do acetato ou malonato, e o segundo anel (2^o) é derivado da fenilalanina. Quando estes são então substituídos por diferentes mecanismos, novos compostos dentro da classe flavonoides são formados. Quando o anel heterocíclico (3^o) é substituído, surgem os flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, isoflavonas e antocianidinas [8,35,36].

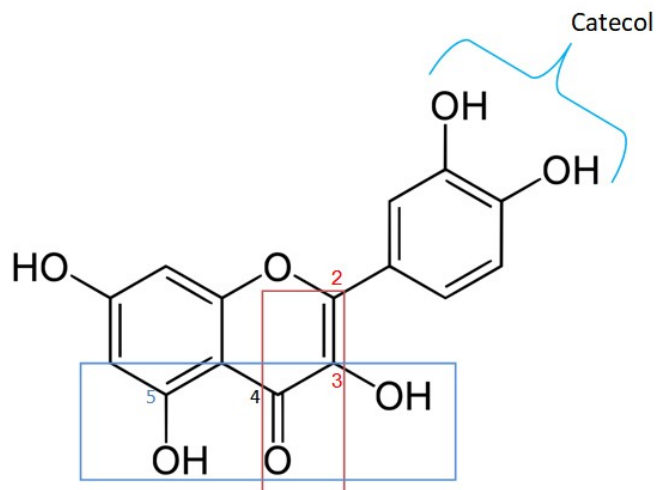
FIGURA 3. ESTRUTURA DOS FLAVONOIDES



FONTE: A autora.

Existem três características principais que irão ditar a potencial atividade antioxidante dos flavonoides; a primeira diz respeito à presença de uma unidade catecol no segundo anel aromático, a segunda trata-se da ligação dupla 2,3 conjugada com a função 4-oxo de um grupo carbonil no anel central, e por último, a presença de hidroxilas nas posições 3 e 5 [36]. A quercetina, exemplo de um antioxidante bastante comum, apresenta todas estas características e por isso se destaca (Figura 4).

FIGURA 4. ESTRUTURA QUÍMICA DA QUERCETINA



FONTE: A autora.

3.3.2 Métodos de determinação da capacidade antioxidante *In vitro*

Existem vários métodos já empregados na determinação da capacidade antioxidante de diversos analitos com mecanismos diversos, que envolvem desde ensaios químicos com substratos lipídicos até ensaios com as mais diversas técnicas instrumentais. Dentre os mais conhecidos encontram-se os métodos ABTS, DPPH, FRAP, CUPRAC, dentre outros, cada um com suas particularidades em seus mecanismos de reação, mas todos com uma lógica semelhante. No presente trabalho foram testados dois métodos: DPPH e CUPRAC.

3.3.2.1 Fundamentos do Ensaio CUPRAC

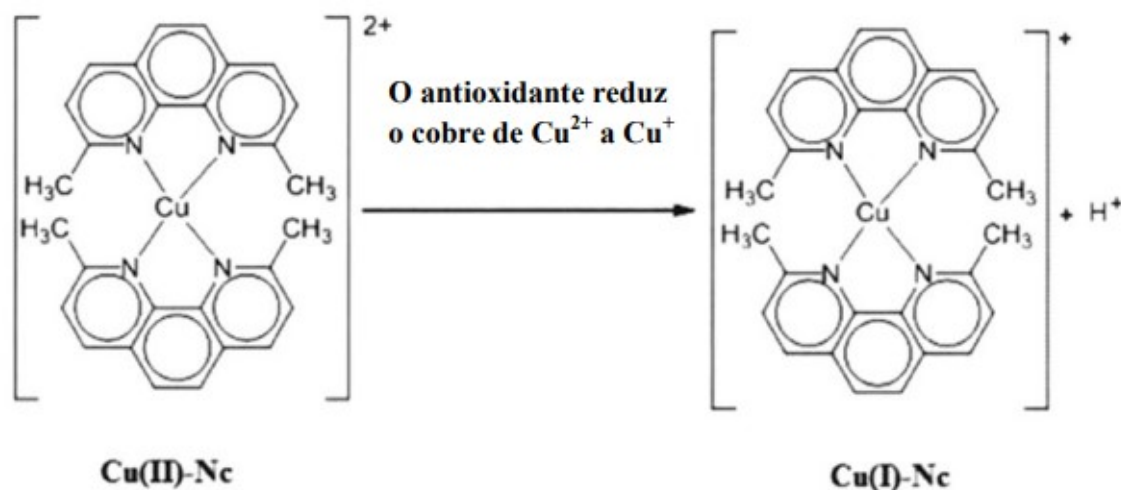
O ensaio CUPRAC (*Cupric Ion Reducing Capacity*), desenvolvido por Apak et al. (2004), é um ensaio utilizado na determinação de capacidade antioxidante de diversos tipos de amostras. Foi desenvolvido a partir da necessidade de se criar um método de simples execução, com maior potencial de aplicação e determinação de um número amplo de compostos antioxidantes. O método se baseia em um mecanismo de transferência de elétrons semelhante a ensaios conhecidos como o método da redução do íon férrico (FRAP, *Ferric Reducing Antioxidant Power*) e o método de inibição do radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), sendo o último também, por vezes, considerado como um mecanismo que se baseia na transferência de átomos de hidrogênio [30,37].

O ensaio também é descrito como um método espectrofotométrico, que mede a capacidade antioxidante de determinada amostra a partir da sua capacidade em reduzir um reagente cromogênico, que altera sua cor quando reduzido, e, sendo assim, o grau de mudança na coloração, assim como o acréscimo ou o decréscimo no valor da absorvância dada por determinado comprimento de onda, é correlacionado com a concentração de antioxidantes presentes em uma amostra [30]. O reagente cromogênico utilizado neste ensaio é o cátion bis-neocuproína-cobre (II) (Cu(II)-Nc) que atua na transferência de elétrons e após a reação redox é transformado em um quelato de cobre

(I) (Cu(I)-Nc), denominado reagente cromóforo da reação, e sua absorvância é medida a 450 nm após 30 minutos de reação [30].

Segundo Özyürek et al. (2011), na reação que ocorre durante o ensaio CUPRAC, os compostos antioxidantes, como por exemplo, grupos de compostos fenólicos (Ar-OH), são oxidados às suas respectivas quinonas (Ar=O) e o complexo Cu(II)-Nc é reduzido ao quelato $\text{Cu}(\text{Nc})_2^+$ (Figura 5). Os prótons produzidos são, por fim, neutralizados com a adição de um tampão acetato de amônio.

FIGURA 5. MECANISMO DE REAÇÃO DO ENSAIO CUPRAC



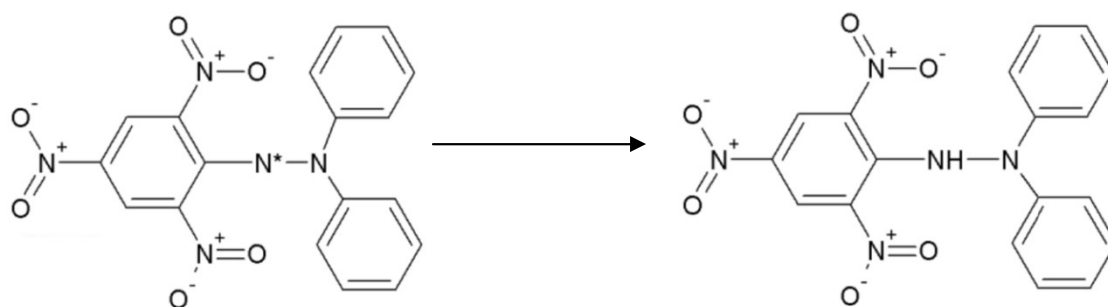
FONTE: Adaptada de ÖZYÜREK et al. (2011).

O ensaio CUPRAC, apresenta outras vantagens como reação rápida, reagentes estáveis e acessíveis e também seletividade desempenhada pelo par redox do cobre que apresentam potencial redox baixo, de forma que não oxidam compostos como açúcares e ácidos cítricos, por exemplo, não considerados como “antioxidantes verdadeiros”, dentre outros fatores [30].

3.3.2.2 Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) como método para a determinação de capacidade antioxidante

A molécula DPPH trata-se de um radical livre estável devido a deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula; essa deslocalização também é responsável por conferir à molécula uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 520 nm [38]. Quando esta molécula é reduzida a hidrazina passa a ter coloração amarela; o grau dessa descoloração determinará a capacidade antioxidante de determinada amostra. Esta redução será provocada pelos antioxidantes presentes em determinada substância (Figura 6) [38,39].

FIGURA 6. ESTRUTURAS RADICALAR E NÃO RADICALAR DO DPPH



FONTE: Adaptada de ALVES et al. (2010)

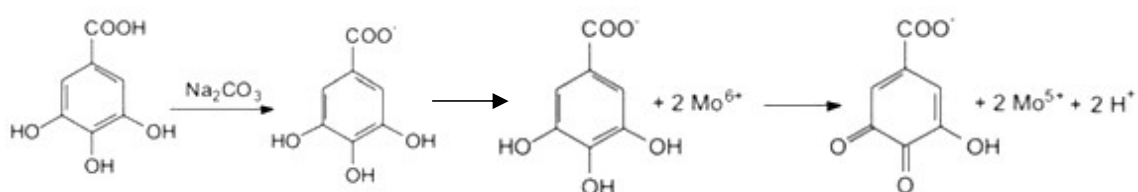
3.3.2.3 Compostos Fenólicos Totais e Teor de Flavonoides

Fenólicos e flavonoides também podem ser quantificados através de análises *In vitro*; o ensaio mais comum se baseia na capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteu. O mecanismo deste ensaio consiste na transferência de elétrons de compostos fenólicos para o reagente Folin-Ciocalteu em meio básico [36,40]. Da mesma forma que nos ensaios antioxidantes, a reação dos compostos fenólicos pode ser mensurada pelo

grau de mudança de coloração das soluções, sendo esta mudança de coloração quantificada espectrofotometricamente.

A figura 7 traz a representação do ácido gálico (ácido fenólico) com o molibdênio VI (o reagente *Folin-Ciocalteu* é constituído por ácidos de molibdênio e tungstênio), e sua reação formando o molibdênio V, este mensurado através de espectrofotômetro.

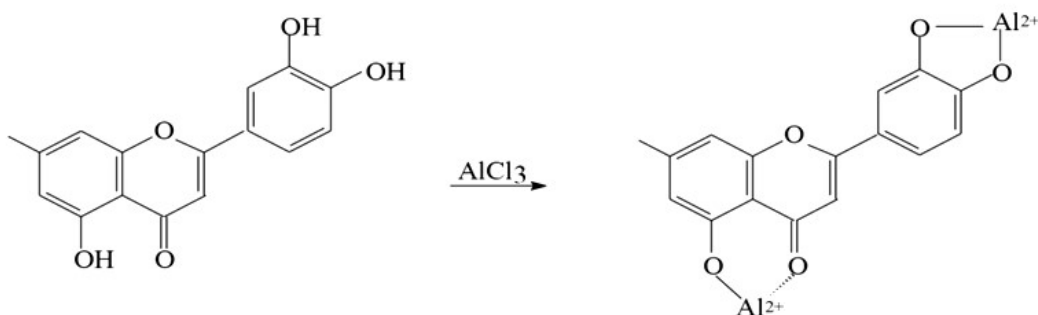
FIGURA 7. REAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS REDUTORAS COM REAGENTE DE FOLIN-CIOCALTEU



FONTE: Adaptada de PIRES et al. (2017)

Para a quantificação de flavonoides, usualmente, a complexação destes é feita com metais, principalmente com o íon alumínio (Al^{3+}), (Figura 8); e, os dados matemáticos originam-se posteriormente de medidas espectroscópicas [41].

FIGURA 8. MECANISMO DE REAÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES



FONTE: Adaptada de MARCUCCI et al. (2021)

3.4 QUIMIOMETRIA E ANÁLISE MULTIVARIADA

Sabe-se, portanto, que a própolis trata-se de um produto natural de composição química complexa e que sua padronização, se não é impossível, é um desafio. A quimiometria e a análise multivariada surgem então como ferramentas capazes de facilitar esse processo de entendimento e de estudo acerca das propriedades químicas da própolis.

Quimiometria é o termo utilizado para descrever o uso de ferramentas estatísticas e matemáticas empregadas nas análises químicas de determinado produto ou material, com o objetivo de extrair o máximo possível de informações a respeito de sua característica e composição química [42]. É comum que a quimiometria complemente e aperfeiçoe o tratamento de dados obtidos através de técnicas instrumentais de análise como a cromatografia, técnicas espectroscópicas, voltametria, dentre outras. Os dados obtidos através de técnicas instrumentais como a espectroscopia na região do infravermelho ou do ultravioleta-visível, apresentam alto grau de complexidade, por isso, a quimiometria pode auxiliar sua interpretação também pode ajudar a aumentar o grau de confiabilidade das análises [24].

A regressão PLS (do inglês: *Partial Least Squares*) é uma ferramenta já comumente utilizada na quimiometria, considerada por muitos autores como uma técnica robusta de regressão linear comparada a outros modelos matemáticos [24,43]. A regressão PLS irá encontrar qual a relação entre uma matriz, que pode conter os dados de espectro de infravermelho próximo ou ultravioleta-visível, com outra matriz resposta correspondente às respectivas medidas experimentais (como os dados obtidos nos ensaios CUPRAC e DPPH, por exemplo) [24].

A regressão PLS consiste de duas etapas. Primeiro, as características de um método (como o ensaio CUPRAC) ou instrumento são investigadas e então, ocorre a tentativa de se encontrar um modelo que descreva o comportamento dessas características (um modelo é uma relação entre dois grupos de variáveis, geralmente chamados dependente e independente). Esta etapa é denominada de calibração. O conjunto de dados usado para esta etapa é chamado de conjunto de calibração. Os parâmetros do modelo são

chamados de coeficientes de regressão ou sensibilidades [43]. No segundo passo, as variáveis independentes são obtidas para uma ou mais amostras (como os dados espectrais ou de imagem). Eles são usados juntamente com as sensibilidades para prever valores para as variáveis dependentes. Esta é a etapa denominada como etapa de predição ou validação. O conjunto de dados usado nesta etapa é o conjunto de predição ou validação. Os termos: bloco dependente e bloco independente são introduzidos para os blocos de variáveis dependentes e independentes, respectivamente [43].

Os dados precisam passar por um processo de validação, já que os modelos podem não ser verdadeiros em suas capacidades de predição, ou seja, pode ocorrer que dados espectrais não sejam capazes de predizer a propriedade de interesse para uma amostra; essa capacidade de predição é avaliada através do coeficiente de determinação (R^2) e dos erros de calibração (RMSEC, *Root Mean Square Error of Calibration*), predição (RMSEP, *Root Mean Square Error of Prediction*) e validação cruzada (RMSECV, *Root Mean Square Error of Cross Validation*). O valor de R^2 representa a proporção da variância no conjunto dos dados de referência; é o quadrado do coeficiente de correlação de Pearson (r) [11,24,43,44]. Um modelo de calibração é selecionado buscando sempre a diminuir ao máximo o valor do erro de validação cruzada, que é a medida quantitativa da exatidão alcançada pelo modelo de predição [24].

4 METODOLOGIA

4.1 AMOSTRAS E EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS (EEPS)

Foram utilizadas 40 amostras de própolis produzidas por abelhas *Apis mellifera*, fornecidas por apicultores do Estado do Paraná, sul do Brasil. Apenas uma amostra foi coletada no estado de Santa Catarina. As amostras foram coletadas de janeiro a março de 2011 durante o verão e posteriormente armazenadas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a extração [45,46].

Os extratos de própolis foram preparados a partir da maceração de 1 g de própolis com 25 mL de etanol por 24 horas, em incubadora TECNAL, com RPM 160 e temperatura constante de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, os extratos foram filtrados a vácuo e

armazenados em freezer durante uma noite. Em seguida, foram filtradas para retirada da cera e o volume ajustado com etanol em balão volumétrico de 25 mL. Em seguida, a solução foi transferida para frascos âmbar para serem novamente armazenadas no freezer. Todos os extratos foram preparados em triplicatas autênticas, gerando um grande número de amostras e uma complexidade de dados que se enquadra no requerido para estudos estatísticos.

4.2 TEOR TOTAL DE FLAVONÓIDES

As concentrações de flavonóides foram determinadas usando reagente cloreto de alumínio dihidratado (Biotec® 98%) 5% m/v em etanol. As soluções padrão para a curva analítica foram preparadas a partir de uma solução estoque de quercetina 1000 mg.L⁻¹. Para a reação de complexação, 500 µL da solução padrão de quercetina, 250 µL de cloreto de alumínio e etanol foram misturados em frascos de 5 mL. Após 30 minutos a leitura foi realizada em 425 nm. Para análise dos extratos, foram utilizados 100 µL de cada solução de extrato, 250 µL de cloreto de alumínio e o volume foi completado com etanol em frasco de 5 ml. Após 30 minutos, as leituras de absorvância foram feitas a 425 nm. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas reais.

4.3 CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL

O conteúdo fenólico total foi determinado pelo método espectrofotométrico usando o reagente de *Folin-ciocalteau*. As soluções padrão para a curva analítica foram construídas a partir de uma solução estoque de ácido gálico 1000 mg.L⁻¹ em etanol. A reação entre o reagente de Folin e os compostos fenólicos foi realizada em um frasco de 5 ml, onde foram adicionados 50 µL de extrato previamente diluído em 950 µL de etanol, 500 µL da solução tampão carbonato/tartarato e 500 µL de Folin, o frasco foi completado com água ultrapura. Após 30 minutos de repouso, a leitura da absorvância foi feita em 760 nm. Cada extrato foi analisado em triplicata usando 100 µL do extrato

diluído. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico por grama de extrato e por grama de própolis bruta m/m.

4.4 ENSAIO CUPRAC (CUPRIC ION REDUCING ANTIOXIDANT CAPACITY)

Este ensaio compreendeu a metodologia proposta por Apak et al. (2004) com poucas adaptações. Inicialmente foi feito o preparo das soluções que compõem o reagente CUPRAC: Solução de cloreto de cobre (CuCl_2 1×10^{-2} M), solução tampão de acetato de amônio (NH_4Ac 1 M) e solução de neocuproína (Nc $7,5 \times 10^{-3}$ M). Como a própolis é pouco solúvel em água, tanto os extratos como as soluções reagentes foram preparadas em etanol P.A.

O reagente CUPRAC foi feito na proporção de 1:1:1 das soluções acima e, posteriormente, 3 mL do reagente CUPRAC são adicionados aos tubos de ensaio. Depois disso, x quantidade de amostra ou solução padrão é adicionada. O volume final foi completado para 4,1 mL com etanol. As misturas foram homogeneizadas em Vortex e mantidas em repouso por trinta minutos para garantir a completa reação. Após esse tempo, a absorbância foi lida a 450 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu® UV-1800) contra um branco contendo todos os reagentes exceto própolis ou padrão. O ácido ascórbico foi usado como referência padrão antioxidante. Foi feita uma solução estoque (1×10^{-3} M) e a partir desta foram realizadas diluições seriadas para construir uma curva analítica. O poder antioxidante da própolis foi expresso em mg de ácido ascórbico equivalente por g de própolis in natura.

4.5 ENSAIO DPPH

Este ensaio compreendeu a metodologia proposta por Brand-Williams et al. (1995), e adaptada por Kim et al. (2002). No período das análises, foi preparada uma solução do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila, Sigma-Aldrich® 99,9%) 20 mg/L em etanol (F. Maia® 99%), com absorbância próxima de 0,7 à 517 nm[24]. Alíquotas de cada amostra extraída foram adicionadas à porções da solução de DPPH, sendo estas soluções posteriormente agitadas e homogeneizadas em vortex e deixadas sob ausência

de luz. Após o tempo reacional, as amostras foram submetidas à leitura de absorvância em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu® UV-1800).

As porcentagens de inibição do radical estável DPPH, motivado por cada extrato de própolis, foram devidamente calculadas. A curva analítica de referência foi feita utilizando o ácido ascórbico (Vitamina C) como padrão, segundo metodologia prescrita por Kim et al. (2002), com certas adaptações. Uma solução estoque de ácido ascórbico foi utilizada para o preparo de diversas soluções padrões em diferentes concentrações, com um ajuste posterior de etanol para um volume total nos tubos para 3 mL. Então foi feita a leitura de absorvância no espectrofotômetro a 517 nm, contra um branco de etanol. Os procedimentos foram realizados em triplicata.

4.6 OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE INFRAVERMELHO

A medida foi feita em triplicata através de Espectrômetro *Agilent Cary 630 FTIR Spectrometer* da marca *Agilent Technologies*. As análises foram realizadas na região do infravermelho médio entre 4000 e 400 cm^{-1} , utilizando janela de fluoreto de cálcio (CaF_2), com 32 scans e resolução de 2 cm^{-1} .

4.7 OBTENÇÃO DOS ESPECTROS NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA E DO VISÍVEL (UV-VIS)

As triplicatas das soluções dos extratos de própolis na concentração 250 mg/ml foram analisadas em espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu® UV-1800) na faixa de comprimento de onda de 240 a 800 nm. O branco analítico foi constituído apenas pelo solvente etanol [47].

4.8 MODELOS DE REGRESSÃO PLS

Para investigar as correlações entre os dados espectrais e os valores obtidos durante os testes químicos de referência utilizou-se a regressão de mínimos quadrados parciais

como ferramenta estatística para análise multivariada dos dados utilizando o software de licença livre ChemoStat® V2 [48] e também o software The Unscrambler X 10.4.

Antes de realizar a Regressão PLS, vários pré-tratamentos de espectros como Savitzky-Golay, SNV, MSC, 1ª derivada, entre outros, foram testados. Isso é necessário porque os dados espectrais contêm grande quantidade de informações, muitas delas às vezes não relevantes para a construção dos modelos de calibração, e não estão relacionadas com as informações que realmente representam as amostras [9].

A seleção das amostras para compor os conjuntos de calibração e validação foi feita por meio do algoritmo Kennard-Stone (K-S). Este algoritmo utiliza como critério de seleção a maior distância entre as amostras já selecionadas, garantindo uma distribuição uniforme na seleção das amostras [49] e desta forma o conjunto de calibração compreende a maior variabilidade dos dados.

Os outliers, por sua vez, foram detectados por meio da análise dos gráficos de distribuição de T^2 da Leverage/Hotelling. Amostras além do limite de confiança (95% ou 99%) foram consideradas anômalas ou discrepantes. A estatística Hotelling, introduzida pela primeira vez por Hotelling [50] é a estatística mais popular usada em gráficos de controle multivariados para monitorar vários dados qualitativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 TEOR DE FENÓLICOS, FLAVONÓIDES E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA PRÓPOLIS

Os níveis de flavonóides (TFC), compostos fenólicos totais (TPC) e a capacidade antioxidante das amostras de própolis expressos como valores médios estão descritos na Tabela 1.

TABELA 1. ORIGEM GEOGRÁFICA, NÍVEIS MÉDIOS DE FENÓLICOS, FLAVONOIDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA PRÓPOLIS

Amostra	Região*	TFC	TPC	CUPRAC	DPPH
1	Guarapuava	0,59	7,89	-	0,68
2	Colônia Vitória – Guarapuava	0,49	9,32	5,25	0,63
3	Guarapuava	0,58	11,49	6,41	0,68
7	Guairacá – Guarapuava	-	5,49	3,49	0,50
8	Tijuco Preto – Prudentópolis	0,38	5,87	4,03	0,63
9	Prudentópolis	0,39	9,75	7,87	0,65
10	Pitanga	0,80	14,12	7,58	0,67
11	São Sebastião – Prudentópolis	0,66	12,38	6,56	0,69
12	São João do Rio Claro – Prudentópolis	1,13	13,52	9,92	0,68
13	Santa Maria do Oeste	0,69	10,95	8,42	0,49
14	Inspetor Carvalho – Prudentópolis	0,87	11,42	7,94	0,48
15	Guarapuava	0,44	7,57	5,43	0,52
16	Colônia Vitória – Guarapuava	0,39	12,98	5,70	0,61
17	Criciúma –SC	1,01	14,23	8,94	0,63
18	Cruz Machado	0,26	11,41	5,21	0,46
19	Santa Maria do Oeste	0,53	12,44	6,88	0,52
20	Cruz Machado	0,22	7,40	5,75	0,13
21	Juranda	0,70	9,87	5,14	0,48
22	Quarto Centenário	0,21	4,61	1,50	0,10
23	Quarto Centenário	0,51	4,46	7,12	0,27
24	Chopinzinho	0,28	10,76	6,79	0,43
25	Chopinzinho	0,59	10,59	3,22	0,44
26	Mandirituba	0,08	3,02	1,03	0,07
28	Serra do mar	0,04	-	-	0,08
29	Serra do mar	0,08	2,84	2,55	0,14
30	Maringá	0,85	9,80	6,70	0,50
31	Goioerê	1,08	8,91	4,35	0,29
32	Bocaiúva do Sul	0,33	8,31	9,38	0,31
33	Lapa	0,90	15,02	4,14	0,29
34	Campina Grande	0,18	6,47	5,36	0,26
35	Adrianópolis	0,41	11,18	3,96	0,13
36	Piraquara	1,00	10,15	7,60	0,09

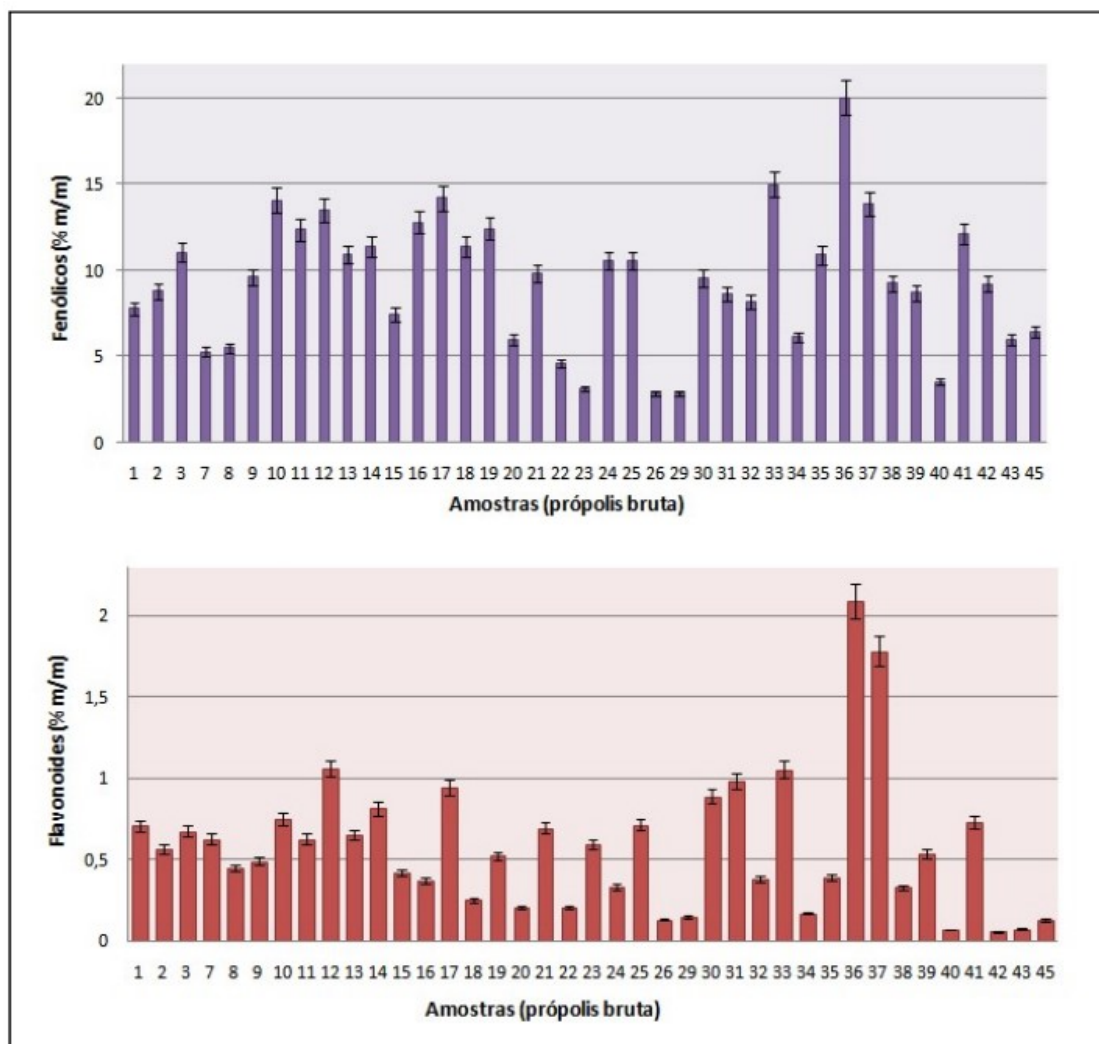
37	São João do Triunfo	1,78	13,97	4,02	0,46
38	Bocaiuva do Sul	0,34	9,38	5,05	0,21
39	Sengés/ Rio Verde	0,56	9,04	3,17	0,63
40	Sengés/Rio Verde	0,06	3,69	2,82	0,30
41	Sengés/Rio Verde	0,77	12,15	5,55	0,67
42	Adrianópolis	0,07	9,74	1,32	0,29
43	Mandirituba	0,07	6,28	3,63	0,28
45	Prudentópolis	0,13	6,91	4,49	0,19

Valores expressos em % (m/m). Os valores não descritos correspondem aos valores abaixo do LQ. * Todas as própolis foram coletadas no estado do paraná, exceto a amostra 17, do estado de Santa Catarina.

FONTE: Dados da pesquisa.

Para melhor exposi o dos resultados foram construídos dois gráficos que mostram os teores de flavonoides e fenólicos encontrados para cada amostra de própolis bruta (Figura 9). As barras verticais em preto representam o erro padrão de cada medida em um intervalo de 95% de confiança; essa medida ajuda a verificar a confiabilidade da média amostral calculada. A amostra 28, cujo valor ficou abaixo do limite de quantifica o, não fez parte do gráfico.

FIGURA 9. TEORES DE FENÓLICOS E FLAVONOIDES CORRESPONDENTES POR AMOSTRA DE PRÓPOLIS BRUTA



FONTE: Dados da pesquisa.

Segundo o Regulamento de Identidade e Qualidade de Extrato de Própolis do Ministério da Agricultura e do Abastecimento descrito (no Anexo VII da Instrução Normativa nº 3), são estabelecidos como requisitos de qualidade para os extratos de própolis um teor mínimo de flavonoides de 0,25% m/m e de fenóis totais de 0,50% m/m [51]. Uma vez que a porcentagem de flavonoides da maioria das amostras de própolis variou entre 0,25 e 1% m/m, e que a porcentagem de compostos fenólicos totais da maioria das amostras de própolis variou entre 0,5 e 15% m/m, observa-se que, apesar da diferença estatística encontrada, a maioria das amostras de própolis marrom do Paraná

corresponde com os parâmetros de qualidade estabelecidos pela legislação brasileira, no que diz respeito a teores de compostos bioativos.

Schmidt et al. [29], analisaram a atividade antirradicalar da própolis brasileira, da mesma região do presente trabalho, por meio da quimioluminescência do sistema e o teste DPPH. O estudo mostrou que ambos os ensaios antirradicais foram fortemente correlacionados além de apresentar correlações positivas para os níveis de fenólicos e flavonóides mostrando que todos os compostos fenólicos são importantes para a atividade antirradicalar da própolis brasileira.

Em extratos etanólicos de geoprópolis brasileira da mesma região, semelhanças de resultados puderam ser observadas em relação à atividade antioxidante [52]; Para o ensaio DPPH, foram relatados valores médios variando de aproximadamente 0,01 a 6,90 mg/g. Para o ensaio CUPRAC, os resultados também foram ligeiramente superiores, variando de 0,14 a 127,0 mg/g [52]. Trazendo para a mesma unidade de medida, os valores do teste DPPH obtidos para o presente estudo variaram de 0,71 a 6,87 mg/g (em média); e para o teste CUPRAC de 10,31 a 99,24 mg/g.

O uso do ensaio CUPRAC para avaliar a capacidade antioxidante da própolis é menos comum. Este ensaio, no entanto, apresenta várias vantagens sobre outros ensaios baseados em transferência de elétrons, tais como: 1) é realizado em pH fisiológico enquanto os métodos Folin e FRAP necessitam de pH alcalino e ácido, respectivamente; 2) maior aplicabilidade, pois é capaz de detectar tanto antioxidantes hidrofílicos quanto lipofílicos; 3) este ensaio realiza a conclusão de reações redox para os flavonóides mais comuns e a oxidação seletiva de compostos antioxidantes sem a interferência de açúcares e ácido cítrico, comumente contidos em alimentos; 4) é sensível a antioxidantes contendo grupos -SH [30,37,53]. A maior sensibilidade do ensaio CUPRAC já pode ser evidenciada em nossos estudos anteriores ao avaliar a atividade antioxidante da geoprópolis brasileira através do ensaio CUPRAC [52].

Existe um estudo que avaliou e comparou a atividade antioxidante da própolis verde e vermelha do Brasil através dos ensaios CUPRAC, FRAP, ABTS e DPPH. Quatro extratos de própolis foram analisados: dois extratos etanólicos de própolis verde, um extrato aquoso de própolis verde e um extrato etanólico de própolis vermelha [54]. As maiores quantidades totais de compostos fenólicos, flavonóides e derivados do ácido hidroxicinâmico foram encontradas em um dos extratos etanólicos de própolis verde.

Esta amostra apresentou a maior atividade antioxidante que foi determinada usando os métodos CUPRAC, FRAP, ABTS com o padrão Trolox, expressos em mmol de equivalentes de trolox por litro ($336,04 \text{ mmol ET/L}$; $71,67 \pm 5,78 \text{ mmol ET/L}$; $382,63 \pm 17,42 \text{ mmol ET/L}$, $p < 0,05$, respectivamente). Já foi demonstrado que a própolis acaba sendo pouco ativa quando se utiliza água em sua extração, pois possui muitos compostos bioativos não solúveis em água [54]. Aqui também se observa que os resultados foram maiores para os ensaios CUPRAC e ABTS.

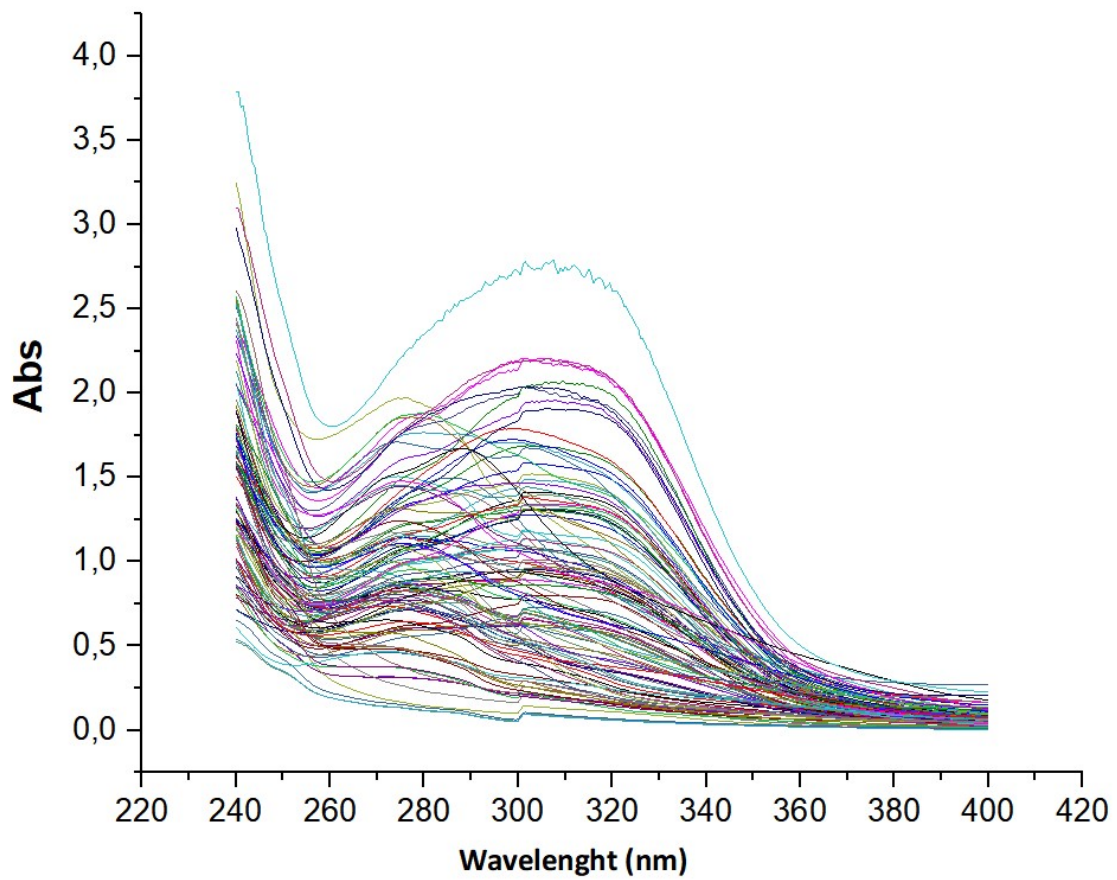
Ainda neste estudo, a maior atividade antirradicalar (medida pelo método DPPH) mostrou que tanto o extrato etanólico quanto o extrato aquoso de própolis verde obtiveram $18,68 \pm 0,033 \text{ mmol ET/L}$ e $18,27 \pm 0,14 \text{ mmol ET/L}$, $p < 0,05$, respectivamente [54]. Novamente, os resultados do teste DPPH foram inferiores aos demais testes, o que não significa que as amostras não tenham atividade antioxidante relevante. Esses são apenas mecanismos de reação diferentes que acabam não apresentando a mesma sensibilidade na detecção de compostos antioxidantes.

5.2 PERFIL DOS ESPECTROS DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS

O perfil de absorção UV da grande maioria dos extratos de própolis mostra uma ou duas bandas de absorção entre 250 e 360 nm com um máximo de absorção em aproximadamente 300/310 nm (Figura 10). Essas bandas são devidas à presença de flavonóides e ácidos fenólicos. As bandas de absorção em flavonóides são comumente observadas nas faixas de 240-285 nm e 300-400 nm. Por exemplo, em flavonóis, como a quercetina, a absorção devido ao anel B (Banda I) é observada entre 300-380 nm e a absorção devido ao anel A (Banda II) ocorre entre 240-280 nm [55].

Ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico, como o ácido p-cumárico, apresentam bandas de absorção características na região entre 310-330 nm. Por outro lado, os ácidos fenólicos derivados do ácido benzóico apresentam absorção máxima entre 270 e 290 nm. Além disso, os ácidos cafeoilquínicos, muito abundantes na própolis marrom, absorvem fortemente em regiões entre 270 e 360 nm [56].

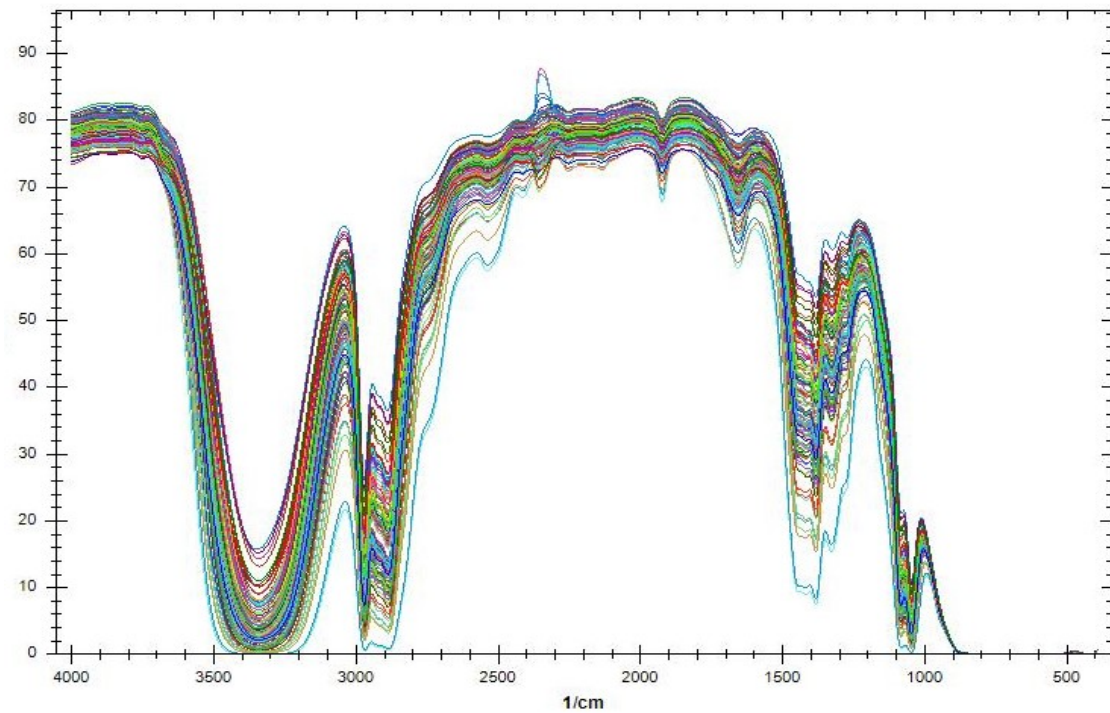
FIGURA 10. ESPECTRO UV DAS AMOSTRAS DE PROPOLIS



FONTE: Dados da pesquisa.

Quanto ao espectro infravermelho das amostras de própolis, estes foram obtidos na região do infravermelho médio, variando de 400 a 4000 cm^{-1} (Figura 11).

FIGURA 11. ESPECTRO INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS DE PROPOLIS



FONTE: Dados da pesquisa.

Todas as amostras apresentaram perfil espectral semelhante, com bandas de absorção nas faixas de aproximadamente 2990 – 3500, 2890 – 2990, 1800 – 2000, 1600 – 1700, 1100 – 1300 e 900 a 1050 cm^{-1} , diferindo apenas em suas intensidades. O pico vibracional intenso e amplo centrado em 3350 cm^{-1} corresponde à banda de estiramento axial do grupo funcional O–H presente em compostos fenólicos.

As bandas vibracionais de ligações C–H são observadas dentro de 2800 – 2990 cm^{-1} . Aquelas referentes ao grupo carbonila C=O podem ser encontradas na região entre 1650 a 1800 cm^{-1} . A região abaixo de 1600 cm^{-1} contém informações sobre a presença de ligações duplas em anel aromático C=C (1550 a 1650 cm^{-1}) e outros grupos funcionais com ligações C – O (1000 a 1550 cm^{-1}) [56].

5.3 MODELOS DE REGRESSÃO OBTIDOS COM O ESPECTRO ULTRAVIOLETA

Para que seja possível construir e validar os modelos PLS, o conjunto de amostras é separado, através do algoritmo de Kennard-Stone, em um grupo de calibração e outro de validação. A estatística descritiva destes grupos é apresentada na tabela 2.

TABELA 2. ESTATÍSTICA DESCRITIVA PARA O CONJUNTO DE DADOS DOS MODELOS UV/ENSAIOS DE REFERÊNCIA

Ensaio (mg/g)	Calibração					Validação externa				
	Min	Max	Média	DP	CV	Min	Max	Média	DP	CV
Flavonoides	0,54	20,54	5,79	4,09	70,64	0,66	12,60	4,53	2,91	64,24
Fenólicos	25,17	181,34	94,66	34,82	36,78	29,83	190,0	91,72	40,0	43,61
CUPRAC^a	10,56	140,18	54,96	27,38	49,82	9,24	88,01	51,30	19,34	37,70
DPPH^b	0,44	6,93	3,98	2,0	50,25	1,18	6,86	4,72	1,97	41,74

DP = Desvio Padrão; CV= Coeficiente de Variação.

^aexpresso como mg de ácido ascórbico equivalente por g de própolis *in natura*; ^b expresso como mg de quercetina equivalente por g de própolis *in natura*.

FONTE: Dados da pesquisa.

Os coeficientes de variação (CV) calculados para os resultados dos testes de referência apresentaram ampla faixa de variação, confirmando a variabilidade amostral e a necessidade de critério estatístico para escolha criteriosa das amostras de calibração e validação para garantir um modelo PLS representativo.

Os modelos mais robustos para modular a relação entre a absorção de UV e o conteúdo de flavonóides, atividades antirradicais CUPRAC e DPPH foram aqueles correlacionando a faixa completa de absorção de UV.

Embora vários pré-tratamentos de espectro UV (Savitzky-Golay, SNV, MSC, 1ª, 2ª e 3ª derivada) tenham sido tentados, os melhores modelos para estimar flavonóides e fenólicos na própolis foram obtidos sem qualquer pré-tratamento ou transformação de espectro (Tabela 3). Já para os modelos de ensaios de espectros UV/antioxidantes, foram aplicados pré-tratamentos como SNV, filtro mediano (MF), normalização média (MN) e 1ª derivada.

TABELA 3. MODELOS UV/ENSAIOS DE REFERÊNCIA

Figuras de Mérito		Flavonoides	Fenólicos	CUPRAC	DPPH
Faixa espectral (nm)		Completa	Completa	Completa	Completa
Pré-tratamento		-	-	SNV+MF	MN + SNV + 1ª derivada
Número de VLs		9	7	14	14
Outliers		-	-	-	-
Exatidão	RMSEC	1,67	19,77	14,95	0,81
	RMSEP	1,42	20,10	15,26	1,15
RMSECV		2.18	22,93	22,88	1,44
RMSEP/RMSECV		0.65	0,88	0,67	0,80
Cal	R ²	0,83	0,66	0,7	0,83
	RPD	2,45	1,76	1,83	2,47
Val	R ²	0,76	0,66	0,60	0,65
	RPD	2,05	1,99	1,27	1,71

FONTE: Dados da Pesquisa.

Para avaliar a qualidade dos modelos PLS quanto à sua capacidade preditiva, os principais parâmetros de mérito devem ser considerados, tais como: coeficientes de determinação (R²), RMSECV (Root Mean Square Error of Cross Validation), RMSEC (Root Mean Square Error of Calibration), valores RMSEP (Root Mean Square Error of

Prediction) e RPD (Residual Predictive Deviation). R^2 indica a variância nos dados de referência; expressa a capacidade preditiva do modelo [57]. RMSECV expressa o desvio padrão entre os valores do conjunto de amostras de validação cruzada e os dados espectrais obtidos [44,57]. Este parâmetro fornece um erro de previsão da calibração [39,57]. Os fatores RMSEC e RMSEP, por sua vez, indicam os erros relacionados aos modelos de calibração e validação respectivamente [10,58].

Além disso, valores de RPD superiores a 1,5 significam que o modelo discrimina dos valores mais baixos aos mais altos das variáveis de resposta [57,59]. Adicionalmente, uma razão RMSEP/RMSECV próxima de 1 significa que o modelo é robusto [60]. A robustez consiste em testar o desempenho do modelo de calibração multivariado frente a alguns tipos de variações e verificar se estas são significativas ou não [58,61].

Em resumo, um modelo de regressão PLS pode ser considerado adequado quando descrito ou representado por valores mínimos de erro (RMSECV, RMSEC e RMSEP), valores maiores de RPD e R^2 e ainda que o valor da razão RMSEP/RMSECV seja igual ou próximo de 1 [10,12,62,63]. Todos esses parâmetros devem ser analisados em conjunto para se chegar à conclusão da boa capacidade preditiva de um determinado modelo, principalmente quando se trata de análise de amostras biológicas e ensaios de referências que compreendem muitas etapas, como é o caso dos testes referentes aos modelos da tabela 3.

Modelos baseados em UV para flavonóides e fenólicos atenderam às premissas acima, indicando boa precisão para estimar os teores de flavonóides e fenólicos de extratos de própolis produzidos no Paraná a partir de seus espectros de UV. O modelo UV/fenólicos apresentou $R^2 \geq 0,66$ e o valor de RMSEP/RMSEC aproximou-se de 1. Adicionalmente, o valor de RPD se aproximou do desejado. Os valores de erro são maiores porque desvios padrão maiores são observados no ensaio de Folin-Ciocalteu, mais do que no ensaio espectrofotométrico de complexação de $AlCl_3$ para medir flavonóides. De acordo com a literatura, valores de R^2 entre aproximadamente 0,66 a 0,81 são adequados e indicativos de modelos com boa capacidade preditiva [64,65].

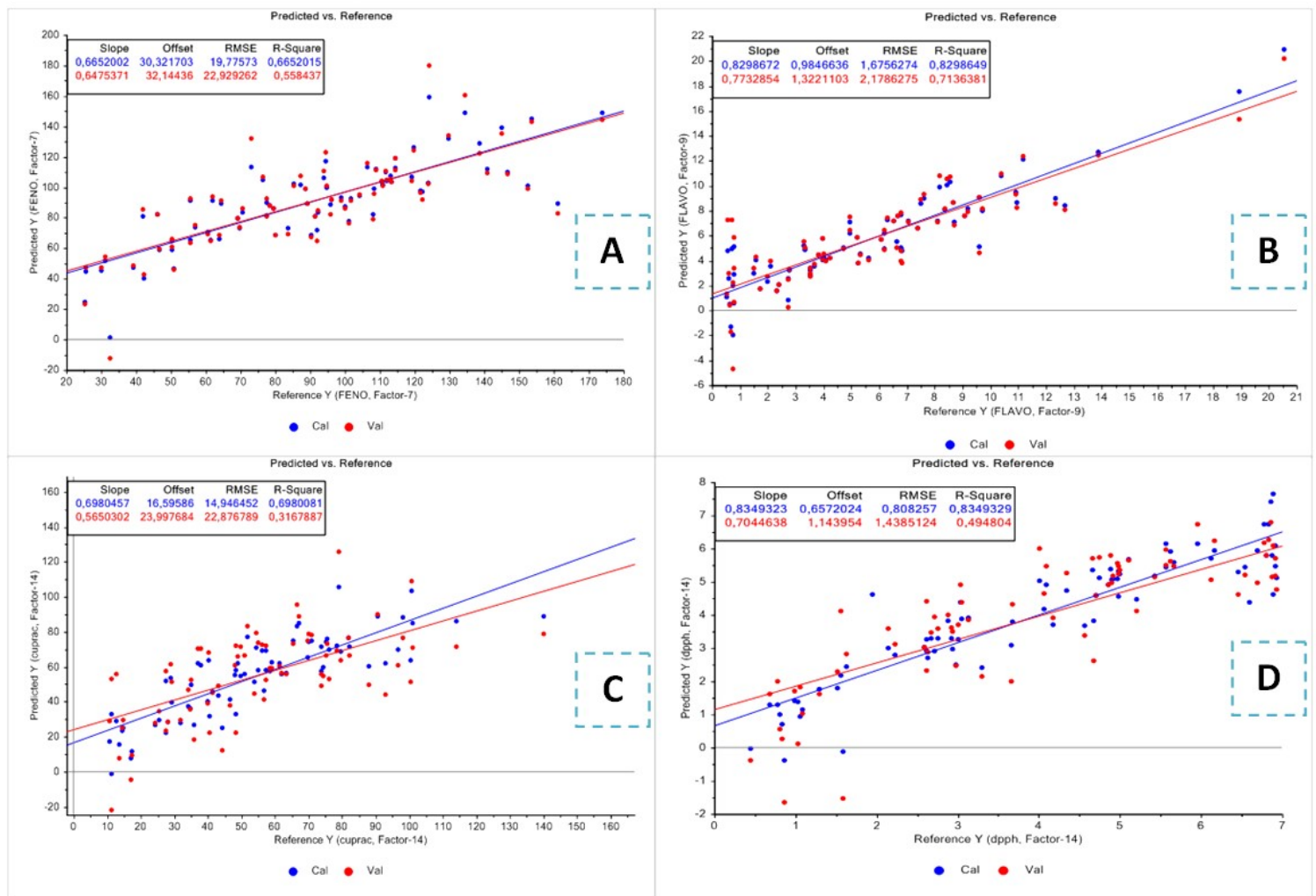
Em relação aos ensaios antioxidantes, pode-se dizer também que o perfil de absorção de UV correlacionou-se adequadamente com os resultados antioxidantes dos ensaios DPPH e CUPRAC, obtendo-se $R^2 \geq 0,67$ para calibração e $R^2 \geq 0,6$ para validação externa além de valores de RPD que giram em torno do ideal.

Os valores de RPD considerados excelentes em modelos preditivos são os de $RPD \geq 2$, mas, segundo a literatura, há um segundo intervalo (1,5 - 2) em que esse parâmetro pode ser considerado, de modo que caracterizam modelos com menor capacidade preditiva, mas que ainda admitem utilidade [65,66]. Assim, o modelo apresentado para fenólicos pode ser considerado adequado em sua capacidade preditiva desse parâmetro para novos extratos de própolis de amostras do Paraná.

Os gráficos de calibração que mostram a relação entre os valores medidos e estimados dos teores de fenólicos e flavonóides e a capacidade antioxidante das amostras de própolis no conjunto de calibração e validação são mostrados nas figuras 12 e 13 respectivamente.

Os ajustes de calibração e validação demonstraram baixa dispersão entre os valores medidos e preditos, o que indica que os modelos de análise multivariada UV apresentam boa capacidade de prever valores de capacidade antioxidante, teores de fenólicos e flavonóides em extratos de própolis oriundos do Paraná.

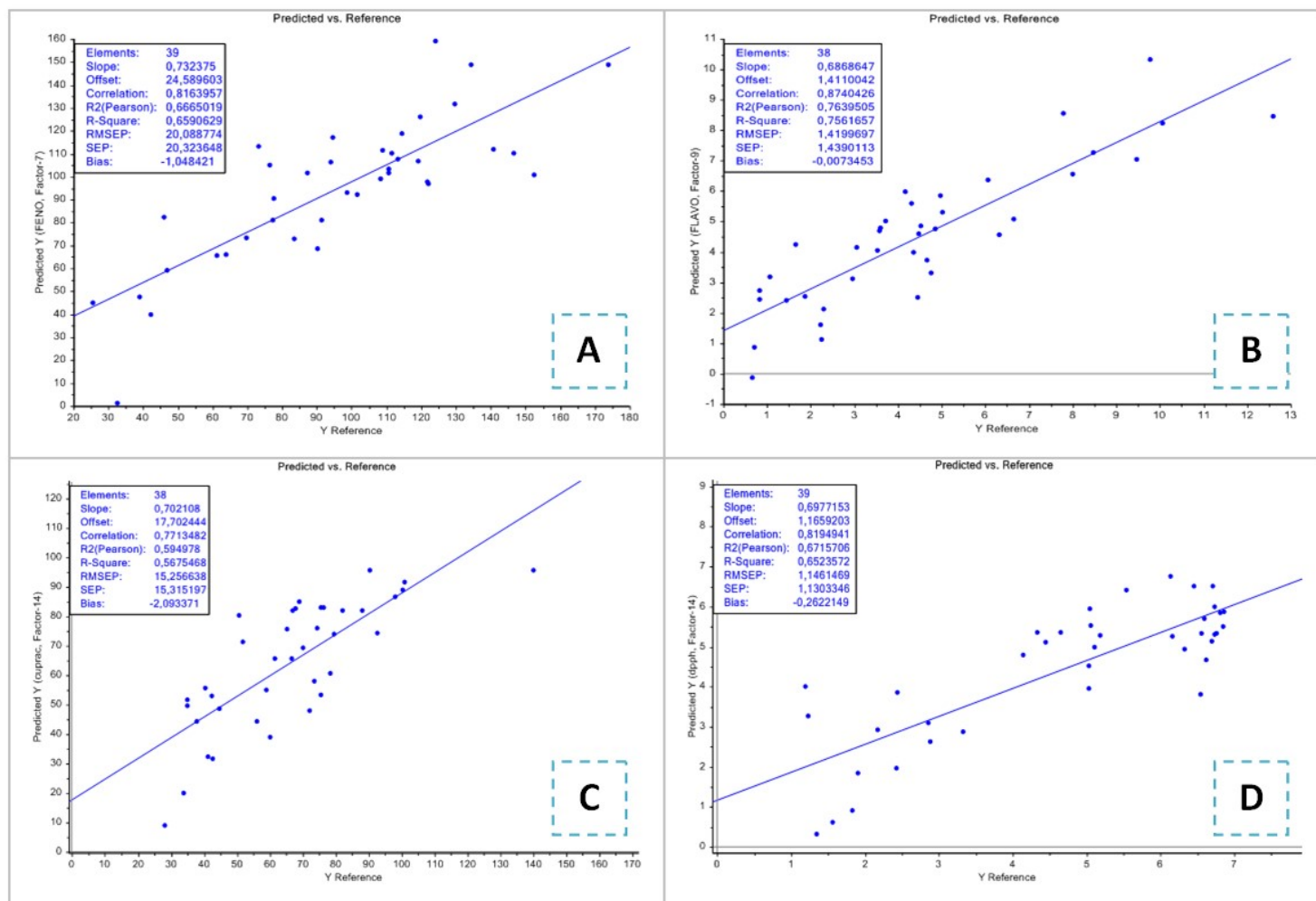
FIGURA 12. VALORES EXPERIMENTAIS E PREDITOS PARA FENÓLICOS (A), FLAVONOIDES (B), CUPRAC (C), DPPH (D) OBTIDOS PARA OS MODELOS UV/ENSAIOS DE REFERÊNCIA



FONTE: Dados da pesquisa.

A Figura 13, por sua vez, representa o ajuste obtido durante o teste de validação externa do modelo PLS, que é feito para o grupo de amostras utilizado apenas para fins de validação. Dessa forma, a validação externa é um teste mais confiável para demonstrar se o modelo de calibração obtido anteriormente é realmente capaz de prever as propriedades químicas investigadas em um novo conjunto de amostras.

FIGURA 13. GRÁFICOS DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA FENÓLICOS (A), FLAVONOIDES (B), CUPRAC (C) E DPPH (D) OBTIDOS PARA OS MODELOS UV/ENSAIOS DE REFERÊNCIA



FONTE: Dados da pesquisa.

Como se trata de amostras biológicas e, sobretudo, réplicas verdadeiras, os ajustes novamente se mostraram adequadas e condizentes com a dispersão. É possível notar uma tendência nos valores que comprovam que os modelos possuem boa capacidade de predição das propriedades químicas da própolis. Além disso, por meio deste gráfico é possível observar que o coeficiente de correlação entre os valores calibrados e de referência foram relevantes, estando todos entre 0,77 e 0,87.

5.4 MODELOS DE REGRESSÃO OBTIDOS COM O ESPECTRO INFRAVERMELHO

A Tabela 4 inclui os valores máximos, mínimos e médios de ensaios de flavonóides, fenólicos e antioxidantes para o conjunto de amostras de calibração e o conjunto de amostras de validação externa aplicadas em modelos de regressão PLS em que o espectro IV foi empregado.

TABELA 4. ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS CONJUNTOS DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO EXTERNA UTILIZADOS NOS MODELOS IV/ENSAIOS DE REFERÊNCIA

Ensaio (mg/g)	Calibração					Validação Externa				
	Min	Max	Média	DP	CV	Min	Max	Média	DP	CV
Flavonoides	0,29	20,54	5,41	4,08	75,42	0,38	13,86	4,89	3,20	65,44
Fenólicos	25,17	173,82	90,60	34,40	37,97	29,83	190,0	99,92	40,06	40,09
CUPRAC^a	9,24	140,18	55,28	25,28	45,73	11,12	100,69	50,66	24,34	48,05
DPPH^b	0,44	6,93	4,21	2,10	49,88	0,83	6,88	4,00	1,99	49,75

DP = Desvio Padrão; CV= Coeficiente de Variação.

^aexpresso como mg de ácido ascórbico equivalente por g de própolis *in natura*; ^b expresso como mg de quercetina equivalente por g de própolis *in natura*.

FONTE: Dados da pesquisa.

As figuras de mérito para os melhores modelos de regressão PLS baseados em IR obtidos estão descritos na Tabela 5. Os melhores resultados foram aqueles em que o espectro IV completo foi utilizado; para os fenólicos e o ensaio CUPRAC foram aqueles

seguidos de algumas transformações como 1ª derivada, 3ª derivada e normalização média dos dados.

TABELA 5. MODELOS IV/ENSAIOS DE REFERÊNCIA

Figuras de Mérito		Flavonoides	Fenólicos	CUPRAC	DPPH
Faixa Espectral(cm ⁻¹)		Completa	Completa	Completa	Completa
Pré-tratamento		-	3ª derivada	1ª derivada	-
Número de VLs		13	17	10	7
Outliers		-	-	-	-
Exatidão	RMSEC	1.49	10.02	14.27	1.20
	RMSEP	1.85	25.25	15.99	1.18
RMSECV		2.06	24.06	20.64	1.50
RMSEP/RMSECV		0.90	1.05	0.77	0.79
Cal	R ²	0.86	0.91	0.70	0.65
	RPD	2.45	3.43	1.77	1.75
Val	R ²	0.66	0.60	0.60	0.62
	RPD	2.05	1.59	1.52	1.68

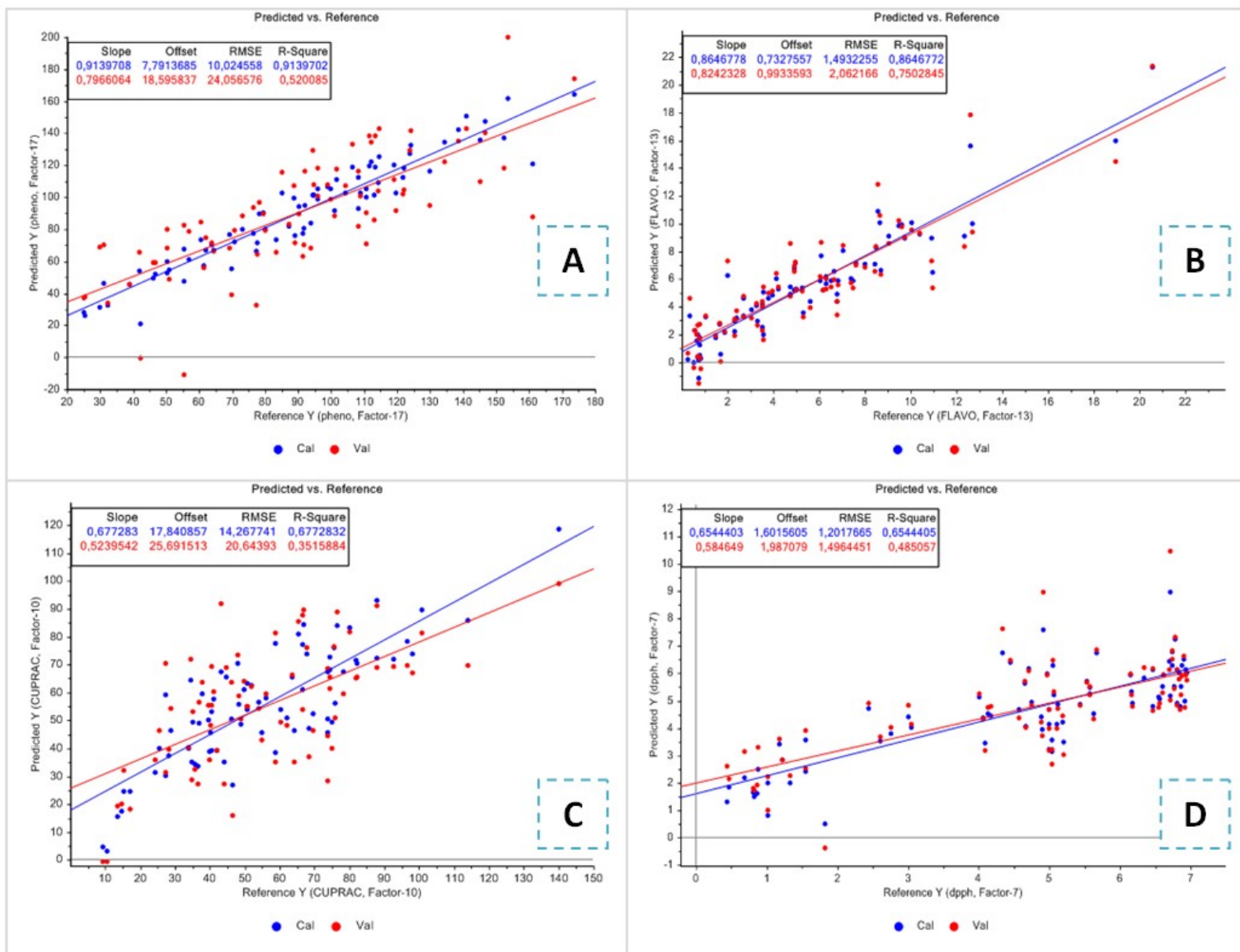
FONTE: Dados da pesquisa

De acordo com os parâmetros previamente estabelecidos, pode-se dizer que os modelos de regressão PLS baseados em IV têm boa capacidade preditiva para estimar flavonóides, fenólicos e capacidade antioxidante em extratos de própolis, uma vez que apresentaram altos valores de R², mesma magnitude numérica para RMSECV, RMSEC, e valores de RMSEP e RPD muito próximos do ideal.

Novamente, muitos pré-tratamentos de dados foram testados e os melhores resultados para flavonóides foram obtidos sem aplicar pré-tratamento matemático à faixa de espectros, enquanto para fenólicos, CUPRAC e DPPH, os melhores resultados giraram em torno de modelos nos quais alguns pré-tratamentos foram usados.

A relação RMSEP/RMSECV próxima de 1 indica modulação de interferência semelhante nos conjuntos de calibração e validação. Para melhor exposição dos resultados, os gráficos de calibração, validação interna e externa obtidos para os modelos de regressão PLS baseados em IV estão representados nas figuras 14 e 15.

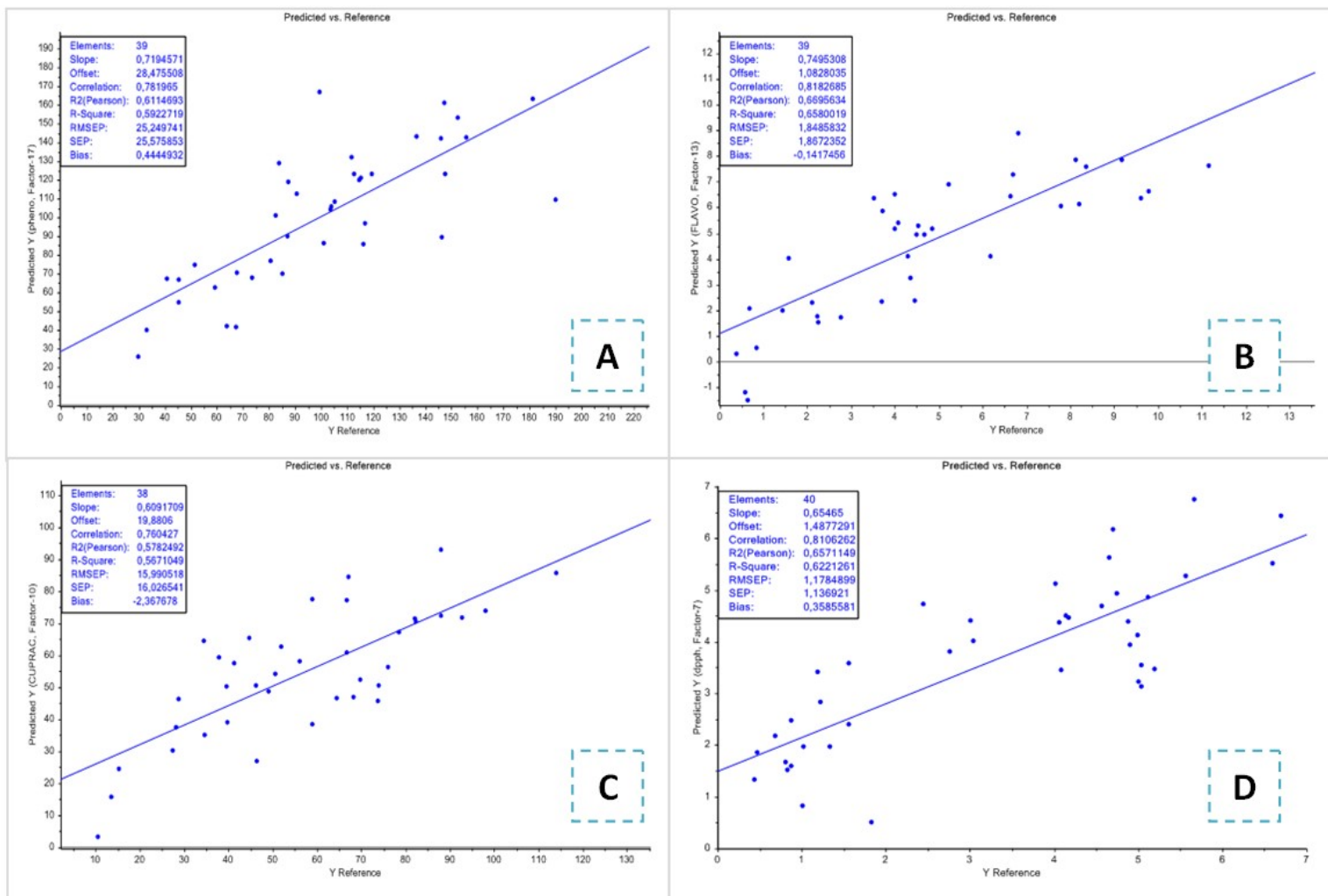
FIGURA 14. VALORES EXPERIMENTAIS E PREDITOS PARA FENÓLICOS (A), FLAVONOIDES (B), CUPRAC (C), DPPH (D) OBTIDOS PARA OS MODELOS IV/ENSAIOS DE REFERÊNCIA



FONTE: Dados da pesquisa.

Novamente, os ajustes de calibração e validação demonstraram dispersão baixa ou razoável entre os valores medidos e previstos indicando que os modelos de análise multivariada de IV apresentam boa capacidade de prever valores de capacidade antioxidante, teores de fenólicos e flavonóides nos extratos de própolis. A Figura 15, por sua vez, mostra a representação gráfica relacionada à validação externa dos modelos. Observa-se uma boa linearidade dos dados, bem como coeficientes de correlação adequados, o que comprova a capacidade preditiva dos modelos baseados em IV.

FIGURA 15. GRÁFICOS DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA FENÓLICOS (A), FLAVONOIDES (B), CUPRAC (C) E DPPH (D) OBTIDOS PARA OS MODELOS IV/ENSAIOS DE REFERÊNCIA



FONTE: Dados da pesquisa.

Encontrar trabalhos que utilizem exatamente as mesmas ferramentas e parâmetros aplicados à análise da própolis marrom do Paraná, é uma tarefa difícil. No entanto, ainda é possível realizar algumas comparações de resultados com técnicas próximas às utilizadas no presente estudo.

Da Silva et al (2018) [66] realizaram uma pesquisa que também buscou encontrar correlações da atividade antioxidante de extratos hidroalcoólicos da própolis do sudoeste do Paraná, com espectroscopia de infravermelho médio por transformada de Fourier equipada com reflectância total atenuada (FTIR-ATR). Através deste estudo, conseguiram obter bons e adequados parâmetros de mérito para a calibração dos

modelos, e parâmetros de validação externa inferiores (de 0,59 a 0,74) mas ainda adequados no que diz respeito à capacidade preditiva dos modelos [66].

Há também outro trabalho com o mesmo objetivo que, por sua vez, utiliza espectros do infravermelho próximo para prever a atividade antioxidante de própolis do Paraná e Santa Catarina [11]. Este estudo utilizou amostras de diferentes formas: extrato etanólico bruto, extrato etanólico macerado e concentrado. O melhor resultado de atividade antioxidante obtido foi em relação às amostras de própolis maceradas e analisadas pelo ensaio FRAP, obtendo valores próximos a $1,8 \times 10^3 \mu\text{mol de Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$ [11]. Essas amostras foram as mesmas que apresentaram melhores valores para modelos de calibração com R^2 de calibração de 0,87 e R^2 de validação de 0,63 [11]. Mesmo não se tratando exatamente dos mesmos parâmetros, pode-se dizer que a própolis desta região desempenha atividade antioxidante importante e uma tendência de boas correlações com seus respectivos espectros através da regressão PLS.

6 CONCLUSÃO

Os dados dos ensaios de referência foram calibrados com sucesso por modelos de regressão PLS usando espectros de IR e UV como dados preditivos. Portanto, pode-se dizer que modelos de regressão PLS baseados em UV e IR podem ser usados em análises preliminares de amostras desconhecidas de própolis do estado do Paraná para estimar rapidamente seus teores totais de flavonóides e fenólicos e atividade antioxidante.

A vantagem desta metodologia é que, uma vez que você tenha um modelo construído, a necessidade de se realizar testes clássicos é amenizada. O tempo de análise, o uso de solventes orgânicos e reagentes químicos podem ser economizados e a exposição do analista reduzida. Essa metodologia é promissora no que diz respeito ao controle de qualidade de extratos para comercialização. Este é um método simples e direto e, além disso, é um método que possui harmonia com os princípios da química verde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] J.M. Sforcin, B.J. Conti, K.B. Santiago, *Própolis e geoprópolis*, 2017.
- [2] S.I. Anjum, A. Ullah, K.A. Khan, M. Attaullah, H. Khan, H. Ali, M.A. Bashir, M. Tahir, M.J. Ansari, H.A. Ghramh, N. Adgaba, C.K. Dash, Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review, *Saudi J. Biol. Sci.* 26 (2019) 1695–1703. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.08.013>.
- [3] V. Bankova, M. Popova, B. Trusheva, Propolis volatile compounds: Chemical diversity and biological activity: A review, *Chem. Cent. J.* 8 (2014) 1–8. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-8-28>.
- [4] V.R. Pasupuleti, L. Sammugam, N. Ramesh, S.H. Gan, Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017 (2017). <https://doi.org/10.1155/2017/1259510>.
- [5] V.C. Toreti, H.H. Sato, G.M. Pastore, Y.K. Park, Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2013 (2013). <https://doi.org/10.1155/2013/697390>.
- [6] V.D. Wagh, Propolis: A wonder bees product and its pharmacological potentials, *Adv. Pharmacol. Sci.* 2013 (2013). <https://doi.org/10.1155/2013/308249>.
- [7] H. Xuan, Z. Li, H. Yan, Q. Sang, K. Wang, Q. He, Y. Wang, F. Hu, Antitumor activity of Chinese propolis in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2014 (2014). <https://doi.org/10.1155/2014/280120>.
- [8] M.A. Calegari, *Espectroscopia Na Região Do Infravermelho Próximo (Nir) E Calibração Multivariada : Desenvolvimento De Modelos Pls Para a Determinação Da Atividade Antioxidante Em Amostras De Própolis*, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2018.
- [9] P. Valderrama, J.W.B. Braga, R.J. Poppi, Variable Selection, Outlier Detection, and Figures of Merit Estimation in a Partial Least-Squares Regression Multivariate Calibration Model. A Case Study for the Determination of Quality Parameters in the Alcohol Industry by Near-Infrared Spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 8331–8338.

- [10] A. Prasniewski, Desenvolvimento de modelos de calibração multivariada para determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante em extrato etanólico de própolis utilizando a técnica ft-nir, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2015.
- [11] M.A. Calegari, B.B. Ayres, L.M. dos Santos Tonial, S.M. de Alencar, T.L.C. Oldoni, Fourier transform near infrared spectroscopy as a tool for predicting antioxidant activity of propolis, *J. King Saud Univ. - Sci.* 32 (2020) 784–790. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.02.006>.
- [12] E. Shawky, R.S. Ibrahim, Bioprofiling for the quality control of Egyptian propolis using an integrated NIR-HPTLC-image analysis strategy, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1095 (2018) 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.07.029>.
- [13] F.A. Silveira, G.A.R. Melo, E.A.B. Almeida, ABELHAS BRASILEIRAS - Sistemática e Identificação, 2002.
- [14] D.L. Souza, A. Evangelista-Rodrigues, M. do S. de C. Pinto, As Abelhas Como Agentes Polinizadores (The Bees Agents Pollinizer's), *Redvet.* VII (2007) 1–7. <https://www.redalyc.org/pdf/636/63613302010.pdf>.
- [15] J.M. RAMOS, N.C. de CARVALHO, ESTUDO MORFOLÓGICO E BIOLÓGICO DAS FASES DE DESENVOLVIMENTO DE *Apis mellifera*, *Rev. Científica Eletrônica Eng. Florest.* 10 (2007) 21.
- [16] R.C.R. Camargo, F. de M. Pereira, M.T. do R. Lopes, Produção de Mel, 2002.
- [17] D.B. BARBOSA, E.F. CRUPINSKI, R.N. SILVEIRA, D.C.H. LIMBERGER, As abelhas e seu serviço ecossistêmico de polinização, *Rev. Eletrônica Científica Da UERGS.* 3 (2017) 694–703. <https://doi.org/10.21674/2448-0479.34.694-703>.
- [18] C.D. Michener, *The Bees of the World*, 2000. [https://doi.org/10.1016/0047-2484\(91\)90057-3](https://doi.org/10.1016/0047-2484(91)90057-3).
- [19] R. de O. Orsi, L.M.R.C. Barreto, S.M.A. Gomes, S.M. Kadri, Pesticidas na própolis do Estado de São Paulo, Brasil, *Acta Sci. - Anim. Sci.* 34 (2012) 433–436. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v34i4.15859>.
- [20] C.M. Pittella, Determinação de resíduos de pesticidas em mel de abelhas (*Apis* sp) por cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massas, 3 *Congr. Bras. Espectrometria Massas.* (2009) 117.
- [21] C.G.R. Lopes, D.C.C. Beirão, L.A. Pereira, L.C. Alencar, Levantamento da flora apícola em área de cerrado no município de Floriano, estado do Piauí, Brasil,

- (2016).
- [22] A. Salatino, É.W. Teixeira, G. Negri, D. Message, Origin and chemical variation of Brazilian propolis, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2 (2005) 33–38. <https://doi.org/10.1093/ecam/neh060>.
- [23] S. Martinotti, E. Ranzato, Propolis: A new frontier for wound healing?, *Burn. Trauma.* 3 (2015) 1–7. <https://doi.org/10.1186/s41038-015-0010-z>.
- [24] J.F. Turco, Estimacão do Teor de Flavonoides e Capacidade Antioxidante de Extratos de Geoprópolis por Análise de Imagens, Infravermelho e Quimiometria, (2019) 97.
- [25] V. Bankova, Chemical diversity of propolis and the problem of standardization, *J. Ethnopharmacol.* 100 (2005) 114–117. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.004>.
- [26] H. Menezes, Própolis: Uma Revisão Dos Recentes Estudos De Suas Propriedades Farmacológicas, *Arq. Inst. Biol.* (2005) 405–411.
- [27] D.O. Kim, K.W. Lee, H.J. Lee, C.Y. Lee, Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 3713–3717. <https://doi.org/10.1021/jf020071c>.
- [28] A.A. Carvalho, D. Finger, C.S. MacHado, E.M. Schmidt, P.M. Da Costa, A.P.N.N. Alves, T.M.F. Morais, M.G.R. De Queiroz, S.P. Quináia, M.R. Da Rosa, J.M.T. Dos Santos, C. Pessoa, M.O. De Moraes, L.V. Costa-Lotufo, A.C.H.F. Sawaya, M.N. Eberlin, Y.R. Torres, In vivo antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis, *Food Chem.* 126 (2011) 1239–1245. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.035>.
- [29] E.M. Schmidt, C.D.S. Santos, D. Stock, D. Finger, W.J. Baader, I.K. Caetano, S.P. Quináia, A.C.H. Frankland Sawaya, M.N. Eberlin, Y.R. Torres, Effect of extraction solvent on antiradical activity of the obtained propolis extracts, *J. Apic. Res.* 53 (2014) 91–100. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.1.09>.
- [30] M. Özyürek, K. Güçlü, E. Tütem, K.S. Bakan, E. Erçağ, S. Esin Çelik, S. Baki, L. Yildiz, Ş. Karaman, R. Apak, A comprehensive review of CUPRAC methodology, *Anal. Methods.* 3 (2011) 2439–2453. <https://doi.org/10.1039/c1ay05320e>.
- [31] P. Atkins, L. Jones, *Princípios de Química*, 2012.
- [32] S.A.M. e Silva, M.F.C. Valarini, M. Chorilli, A. Venturini, G.R. Leonardi, Atividade antioxidante do extrato seco de cacau orgânico (theobroma cacao)-

- Estudo de estabilidade e teste de aceitação de cremes acrescidos deste extrato, *Rev. Ciências Farm. Básica e Apl.* 34 (2013) 493–501.
- [33] A.C. De Oliveira, I.B. Valentim, M.O.F. Goulart, C.A. Silva, E.J.H. Bechara, M.T.S. Trevisan, Vegetals as natural sources of antioxidants, *Quim. Nova.* 32 (2009) 689–702. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422009000300013>.
- [34] E.G. Creus, *Ámbito Farmacético, Offarm.* 23 (2004). <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-compuestos-fenolicos-un-analisis-sus-13063508>.
- [35] P. Milene ANGELO, N. Jorge, Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão, *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* 66 (2007) 1–9.
- [36] I. Gülçin, Antioxidant activity of food constituents: An overview, *Arch. Toxicol.* 86 (2012) 345–391. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0774-2>.
- [37] R. Apak, K. Güçlü, M. Özyürek, S.E. Çelik, Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay, *Microchim. Acta.* 160 (2008) 413–419. <https://doi.org/10.1007/s00604-007-0777-0>.
- [38] C.Q. Alves, J.M. David, J.P. David, M. V. Bahia, R.M. Aguiar, Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos, *Quim. Nova.* 33 (2010) 2202–2210. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010001000033>.
- [39] S. Kumar, *Analytical techniques for natural product research*, 2016. <https://doi.org/10.1079/9781780644738.0000>.
- [40] J.S. Pires, P.B. Torres, D.Y.A.C. Santos, F. Chow, Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas, *Inst. Biociências, Univ. São Paulo.* (2017) 1–5. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.29127.80809>.
- [41] M.C. Marcucci, A. Salatino, L.F.A. De Magalhães Oliveira, C.P. Gonçalves, Accessible methodologies for quantification of flavonoids and total phenols in propolis, *Rev. Virtual Quim.* 13 (2021) 61–73. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200131>.
- [42] T.O. Folha, *Uso da espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) para a avaliação de parâmetros de qualidade de farinhas de mandioca* *Uso da espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) para a avaliação de parâmetros de qualidade de farinhas de mandioca*, (2014) 101.
- [43] P. Geladi, B.R. Kowalski, *Partial Least Squares Regression: A Tutorial*, J.

- Optoelectron. Adv. Mater. 185 (1986) 1–17.
- [44] P. Valderrama, J.W.B. Braga, R.J. Poppi, ESTADO DA ARTE DE FIGURAS DE MÉRITO EM CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA, *Quim. Nova.* 32 (2009) 1278–1287.
- [45] C.S. Machado, J.B. Mokochinski, T.O. De Lira, F.D.C.E. De Oliveira, M.V. Cardoso, R.G. Ferreira, A.C.H.F. Sawaya, A.G. Ferreira, C. Pessoa, O. Cuesta-Rubio, M.C. Monteiro, M.S. De Campos, Y.R. Torres, Comparative Study of Chemical Composition and Biological Activity of Yellow, Green, Brown, and Red Brazilian Propolis, Evidence-Based Complement. *Altern. Med.* 2016 (2016). <https://doi.org/10.1155/2016/6057650>.
- [46] C.S. Machado, D. Finger, M.L. Felsner, Y.R. Torres, In house validation of an HPLC-DAD method for the simultaneous determination of specific bioactive compounds in southern Brazilian propolis, *J. Apic. Res.* 58 (2019) 104–113. <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1501857>.
- [47] D.G. Salvalaio, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2019.
- [48] G.A. Helfer, F. Bock, L. Marder, J.C. Furtado, A.B. Da Costa, M.F. Ferrão, Chemostat, um software gratuito para análise exploratória de dados multivariados, *Quim. Nova.* 38 (2015) 575–579. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150063>.
- [49] R.W. Kennard, L.A. Stone, Computer Aided Design of Experiments, *Technometrics.* 11 (1969) 137–148. <https://doi.org/10.2307/1266219>.
- [50] H. Hotelling, The Generalization of Student ' s Ratio, *Biometrika.* 6 (1908) 1.
- [51] Instrução normativa SDA nº 03, de 19-01-2001, in: Ministério Da Agric. Pecuária e Abast. - MAPA, 2001: p. 18. <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/suasa/regulamentos-tecnicos-de-identidade-e-qualidade-de-produtos-de-origem-animal-1/rtiq-mel-e-produtos-apicolas>.
- [52] J.F. Turco, C.L. do Nascimento, V.A. de Lima, Y.R. Torres, Could antioxidant capacity and flavonoid content of ethanolic extracts of geopropolis from Brazilian native bees be estimated from digital photos and NIR Spectra?, *Microchem. J.* 157 (2020) 105031. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105031>.
- [53] R. Apak, K. Güçlü, B. Demirata, M. Özyürek, S.E. Çelik, B. Bektaşoğlu, K.I. Berker, D. Özyurt, Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay, *Molecules.* 12 (2007) 1496–1547. <https://doi.org/10.3390/12071496>.

- [54] R. Rupeikaitė, M. Liaudanskas, V. Žvikas, S. Trumbeckaitė, Investigation of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Brazilian Green and Red Propolis Preparations, (2021) 82.
- [55] Ø.M. Andersen, K.R. Markham, Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications, 2006.
- [56] et al. Pavia, Donald L., Introduction to Spectroscopy, 3rd ed., Cengage Learning, United States, 2015. <https://doi.org/10.1201/9781439894651-21>.
- [57] N. Sinelli, A. Spinardi, V. Di Egidio, I. Mignani, E. Casiraghi, Evaluation of quality and nutraceutical content of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) by near and mid-infrared spectroscopy, *Postharvest Biol. Technol.* 50 (2008) 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.03.013>.
- [58] P.C. Williams, K.H. Norris, Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries, 2001. <https://doi.org/10.1255/nirn.679>.
- [59] W. Li, L. Xing, Y. Cai, H. Qu, Classification and quantification analysis of *Radix scutellariae* from different origins with near infrared diffuse reflection spectroscopy, *Vib. Spectrosc.* 55 (2011) 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2010.07.004>.
- [60] Eurachem/CITAC, Guide to quality in analytical chemistry - An aid to accreditation, 2016. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25174426>.
- [61] A.S.S. PINTO, Monitoramento por Espectroscopia dos Compostos Fenólicos e Furaldeídos Gerados no Processamento de Biomassa Lignocelulósica, Universidade Federal de São Carlos, 2017.
- [62] E. Elfadl, C. Reinbrecht, W. Claupein, Development of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) calibration model for estimation of oil content in a worldwide safflower germplasm collection, *Int. J. Plant Prod.* 4 (2010) 259–270. <https://doi.org/10.22069/ijpp.2012.709>.
- [63] B.W. Dunn, H.G. Beecher, G.D. Batten, S. Ciavarella, The potential of near-infrared reflectance spectroscopy for soil analysis - A case study from the Riverine Plain of south-eastern Australia, *Aust. J. Exp. Agric.* 42 (2002) 607–614. <https://doi.org/10.1071/EA01172>.
- [64] W. Saeys, A.M. Mouazen, H. Ramon, Potential for onsite and online analysis of pig manure using visible and near infrared reflectance spectroscopy, *Biosyst. Eng.* 91 (2005) 393–402. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2005.05.001>.
- [65] M.L. Chicati, R.B. de Oliveira, M.R. Nanni, E. César, J.A.M. Demattê,

Comparação de métodos estatísticos para avaliação espectral de atributos de solo, An. XVI Simpósio Bras. Sensoriamento Remoto - SBSR, Foz Do Iguaçu, PR, Bras. 13 a 18 Abril 2013, INPE. (2013) 7265–7272.

- [66] C. da Silva, A. Prasniewski, M.A. Calegari, V.A. de Lima, T.L.C. Oldoni, Determination of Total Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Ethanolic Extracts of Propolis Using ATR–FT-IR Spectroscopy and Chemometrics, *Food Anal. Methods*. 11 (2018) 2013–2021.
<https://doi.org/10.1007/s12161-018-1161-x>.