

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Instituto de Ciências Exatas  
Departamento de Química

Rosilene Silva Nascimento Paganotti

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA  
A ANÁLISE DE PRÓPOLIS UTILIZANDO TÉCNICAS  
ESPECTROMÉTRICAS E ANÁLISE MULTIVARIADA**

Belo Horizonte  
2013

UFMG/ICEx/DQ. 963<sup>a</sup>

T. 435<sup>a</sup>

Rosilene Silva Nascimento Paganotti

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA  
A ANÁLISE DE PRÓPOLIS UTILIZANDO TÉCNICAS  
ESPECTROMÉTRICAS E ANÁLISE MULTIVARIADA**

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências – Química.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Jorge Sanches Barbeira

Belo Horizonte

2013

P131d  
2013  
T

Paganotti, Rosilene Silva Nascimento

Desenvolvimento de métodos analíticos para a análise de própolis utilizando técnicas espectrométricas e análise multivariada. / Rosilene Silva Nascimento Paganotti. 2013.  
165 f. : il.

Orientador: Paulo Jorge Sanches Barbeira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química.  
Bibliografia: f. 151-165.

1. Química analítica - Teses 2. Própolis - Técnicas espectrométricas - Teses 3. Análise multivariada - Teses I. Barbeira, Paulo Jorge Sanches, Orientador. II. Título.

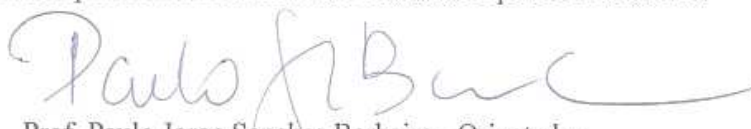
CDU 043

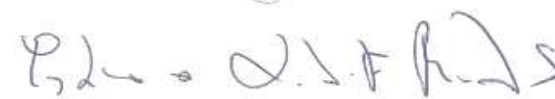


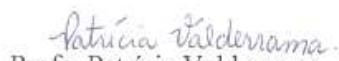
**"Desenvolvimento de Métodos Analíticos para a Análise de Própolis utilizando  
Técnicas Espectrométricas e Análise Multivariada"**

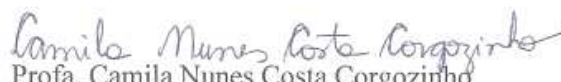
**Rosilene Silva Nascimento Paganotti**

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

  
Prof. Paulo Jorge Sanches Barbeira - Orientador  
UFMG

  
Dra. Esther Margarida Alves Ferreira Bastos  
Fundação Ezequiel Dias

  
Profa. Patricia Valderrama  
UTFPR

  
Profa. Camila Nunes Costa Corgozinho  
UFMG

  
Profa. Leticia Malta Costa  
UFMG

Belo Horizonte, 24 de maio de 2013.

*Pequena é a abelha entre os seres alados, mas o que ela produz é o que há de mais doce e nobre. (Eclesiástico 11, 3)*

Ao meu querido e amado esposo Arilson  
Aos meus pais Aldeide e Irani

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, pelo dom da vida, amor e luz.

Ao professor Paulo Barbeira, pela orientação, estímulo e por acreditar no meu trabalho.

Ao meu marido Arilson, por todo amor, carinho e compreensão nos momentos difíceis.

Aos meus pais Aldeide e Irani, por todo apoio e carinho incondicionais.

Às amigas Cristina, Jaqueline e Ariane por todo apoio, pelos sorrisos e lágrimas compartilhados, pelas trocas de conhecimento, por tudo, muito obrigada.

Aos familiares Claudinei, André, Naiara, Maria, Alexandre, Fernanda e Maria Vitória.

A todos do LIMA: Valmir, Jeob, Helga, Gisele, Conny, Pedro, pelos momentos compartilhados.

Às estagiárias Thália, Lívia, Keroli, Thaís, e à Pérola por todo auxílio na parte experimental.

Ao Júlio César por toda ajuda e disponibilidade nos estudos cromatográficos.

À professora Luiza de Marillac pelos ensinamentos e auxílio nos estudos de difração de raios X.

Aos companheiros da analítica: Helvécio, Frank, Júnia, Júlio, Maria José (Bulé), Isabela, Luciano, Silvéria, Leonel, Patrícia, Deyse, Liliane, Bruno, Roberta e Leandro. Obrigada pela convivência e amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFMG por todo apoio concedido.

A todos os professores do DQ/UFMG que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação.

Às secretárias Paulete, Lilian e Kátia pela atenção e disponibilidade com a parte burocrática.

Às agências de fomento CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

## RESUMO

Neste trabalho, métodos quimiométricos de análise exploratória como a Análise por Componentes Principais e Análise Discriminante com o Método dos Mínimos Quadrados Parciais foram utilizados para classificar extratos comerciais de própolis das regiões sul e sudeste do Brasil, com o objetivo de avaliar a procedência dos mesmos. Um modelo de calibração multivariada utilizando o Método dos Mínimos Quadrados Parciais foi construído e validado para determinação do teor de extrato seco em extratos comerciais de própolis. A metodologia quimiométrica proposta para a determinação do teor de extrato seco em extratos comerciais de própolis mostrou-se uma alternativa adequada em relação à metodologia tradicional gravimétrica, por ser mais rápida, menos laboriosa e por envolver pequenas quantidades de solventes. Uma otimização do método Folin-Ciocalteu para determinação do teor de fenóis totais em extratos de própolis foi realizada, na qual avaliou-se as quantidades dos reagentes Folin-Ciocalteu e de tampão carbonato de sódio, tempo de reação, espalhamentos da radiação, formação de sólidos em suspensão e deslocamento hipsocrômico do comprimento de onda de máxima absorção. A otimização da metodologia espectrofotométrica Folin-Ciocalteu agregou vantagens à metodologia proposta, como redução de custos e de tempo de análise, além da obtenção de um método exato. A determinação do teor de fenóis totais dos extratos de própolis estudados foi realizada através do método Folin-Ciocalteu, obtendo-se valores adequados ao estipulado pela legislação brasileira. Análises cromatográficas dos extratos das regiões sul e sudeste do Brasil, de própolis verde e comum, foram realizadas. Pode-se verificar uma semelhança na composição química dos extratos de própolis comum e verde da região sudeste, indicando que estes, independentemente da sua rotulação, apresentaram a mesma composição química. Nestes extratos, os compostos fenólicos majoritários foram o artepillin C e pinocembrina. Para os extratos da região sul observou-se grande variação na composição química.

## ABSTRACT

In this work, chemometric methods of exploratory analysis such as Principal Component Analysis and Partial Least Squares Discriminant Analysis were used to classify commercial extracts of propolis from southern and southeastern Brazil, in order to ensure their origin. A multivariate calibration model using the Partial Least Squares was developed and validated for determination of dry extract content in commercial extracts of propolis. A chemometric methodology proposed for determination of dry extract content in commercial extracts of propolis was a suitable alternative compared to traditional gravimetric method, once it is faster, less laborious and decreased solvent consumption. Folin-Ciocalteu methodology optimization for total phenols determination in propolis extracts was performed. The quantities of reagents Folin-Ciocalteu and sodium carbonate buffer, reaction time, scattering of the radiation, the formation of solid in suspension and hypsochromic shift of the wavelength of maximum absorption were evaluated. The optimization of the methodology spectrophotometric Folin-Ciocalteu added advantages to the proposed methodology, such as reducing costs and time of analysis, and obtaining an exact method. The determination of total phenols content of propolis extracts studied was performed using the Folin-Ciocalteu method, obtaining appropriate values compared with that required by Brazilian law. Chromatographic analyses of extracts from southern and southeastern Brazil, of common and green propolis, were performed. In these analyzes were observed a similarity in the chemical composition of common and green propolis extracts of the region southeast, indicating that they, regardless of their labeling, will present the same chemical composition. In these extracts, phenolic compounds majority were artepillin C and pinocembrin. In the southern region it was observed a great variation in the chemical composition.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção da própolis pelas abelhas. ....	25
Figura 2. Publicações e patentes depositadas sobre própolis no período de 2002 até novembro de 2012. ....	27
Figura 3. Arbusto adulto da espécie <i>Baccharis dracunculifolia</i> e um detalhe de seu ramo. ....	34
Figura 4. Abelha <i>Apis mellifera</i> coletando a resina de folhas jovens de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (a). Depósito das resinas coletadas para forrar fendas abertas na colmeia (b) e (c). ....	35
Figura 5. Estrutura química de alguns compostos isolados de própolis verde brasileira. ....	37
Figura 6. Decomposição dos blocos de dados de <b>X</b> e <b>Y</b> . ....	51
Figura 7. Localização geográfica dos envasadores dos extratos alcoólicos comerciais de própolis. ....	56
Figura 8. Espectros de absorção na região UV-Vis de extratos alcoólicos de própolis comerciais. (—) própolis verde; (—) própolis comum. ....	59
Figura 9. Escores do modelo PCA para extratos alcoólicos de própolis. (a) Tipos de própolis comum e verde e (b) local de envase do extrato alcoólico. ....	61
Figura 10. Gráfico dos pesos nas CP1 e CP2 para espectros de absorção na região do UV-Vis de extratos de própolis. ....	62
Figura 11. Erros de classificação na calibração e validação cruzada, e RMSECV para <i>n</i> variáveis latentes. ....	63
Figura 12. Amostras classificadas pelo modelo PLS-DA. (●) Amostras de calibração do sudeste, (■) amostras de calibração da região sul, (○) amostras de previsão do sudeste e (□) amostras de previsão do sul. ....	65
Figura 13. Pesos para as variáveis latentes 1 e 2 do modelo PLS-DA. ....	66
Figura 14. Estruturas dos compostos fenólicos encontrados em extratos de própolis das regiões sudeste e sul. ....	67

Figura 15. (a) Cromatograma do extrato de própolis C9 ( <b>região sudeste</b> ), envazado na cidade de Nova Lima – MG; (b) Cromatograma do extrato de própolis C38 ( <b>região sul</b> ), envazado na cidade de Araranguá – SC; (c) Cromatograma do extrato de própolis C93 ( <b>região sul</b> ), envazado na cidade de Urubici – SC. 1) artemisina, 2) pinocembrina, 3) ácido p-cumárico, 4) galangina, 5) acacetina, 6) crisina, 7) ácido cinâmico, 8) kaempferol. ....	69
Figura 16. (a) Cromatograma do extrato de própolis verde V25 ( <b>região sudeste</b> ), envazado na cidade de Cláudio – MG; (b) Cromatograma do extrato de própolis C55 ( <b>região sudeste</b> ), envazado na cidade de Boa Esperança – MG. Ambos os cromatogramas foram obtidos no comprimento de onda de 310 nm. 1) artemisina, 2) pinocembrina, 3) ácido p-cumárico, 4) galangina, 5) acacetina, 6) crisina, 7) ácido cinâmico, 8) kaempferol. ....	70
Figura 17. Resíduo obtido após secagem dos extratos de própolis. ....	79
Figura 18. Formação de duas fases após centrifugação dos extratos de própolis. ....	81
Figura 19. Espectro infravermelho médio do material resinoso obtido após centrifugação. As bandas discutidas no texto foram assinaladas no espectro. ....	82
Figura 20. Espectros de absorção na região do UV-Vis de extratos de própolis. ....	85
Figura 21. Detecção de <i>outlier</i> nas etapas de calibração e validação. (a) Histograma dos valores de <i>leverage</i> (calibração). (b) Gráfico dos resíduos no teor de extrato seco versus resíduos espectrais (calibração). (c) Histograma dos valores de <i>leverage</i> (validação). (d) Gráfico dos resíduos espectrais (validação). As linhas sólidas indicam os limites aceitáveis para a detecção de <i>outlier</i> em cada teste. ....	86
Figura 22. Coeficientes de regressão do modelo PLS. ....	87
Figura 23. Gráfico dos erros absolutos versus os valores de referência para os teores de extrato seco. ■) amostras de calibração; ●) amostras de validação. ....	88
Figura 24. Valores previstos pelo modelo PLS versus os valores de referência para as amostras de calibração (●) e de validação (▼). ....	88
Figura 25. Espectro de absorbância na região UV-Vis, de uma solução 2,0 µg/mL de ácido gálico obtida após reação com o reagente Folin-Ciocalteu. ....	102
Figura 26. Absorbância obtida em vários tempos de reação. ....	103

Figura 27. Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial $2^2$ .	104
Figura 28. Diagrama para interpretação dos efeitos dos volumes de Folin e de tampão, no planejamento fatorial $2^2$ . Os valores nos vértices do quadrado são as respostas médias (absorbâncias).	104
Figura 29. Superfícies de resposta para o planejamento composto central. (a) Para um máximo de absorção da radiação UV-Vis. (b) Para um mínimo de espalhamento da mesma.	108
Figura 30. Curvas de nível para o planejamento composto central. (a) Para um máximo de absorção da radiação. (b) Para um mínimo de espalhamento.	109
Figura 31. Espalhamentos da radiação em todos os pontos do planejamento composto central.	110
Figura 32. Espalhamentos da radiação para os extratos de própolis estudados.	112
Figura 33. Espectro de fluorescência de raios X do sólido branco formado no planejamento composto central.	114
Figura 34. Difratoograma do sólido cristalino formado. As distâncias interplanares demonstradas na figura conferem com as apresentadas pelo fosfato de lítio.	114
Figura 35. Homocedasticidade dos dados experimentais.	116
Figura 36. Resíduos padronizados para o ácido gálico.	117
Figura 37. Cromatograma de uma solução padrão contendo todos os analitos, para o comprimento de onda de 290 nm. 1 – ácido caféico; 2 – ácido p-cumárico; 3 – ácido ferúlico; 4 – quercetina; 5 – ácido cinâmico; 6 – kaempferol; 7 – pinocembrina; 8 – crisina; 9 – acacetina; 10 – galangina; 11 – artepillin C.	127
Figura 38. Cromatogramas de extratos de própolis das regiões sul e sudeste do Brasil, para o comprimento de onda de 310 nm.	131
Figura 39. Cromatogramas de extratos de própolis comum e verde, das regiões sul e sudeste do Brasil, para o comprimento de onda de 310 nm. (a) Extrato de própolis comum envazado na cidade de Urubici – SC. (b) Extrato de própolis comum envazado na cidade de Nova Lima – MG. (c) Extrato de própolis verde envazado na cidade de Cláudio – MG. (A numeração dos compostos fenólicos está apresentada na Tabela 20)	132

Figura 40. Bandas de absorção de extratos de própolis e seus possíveis deslocamentos hipsocrômicos. ....	137
Figura 41. Relação entre os parâmetros de qualidade teor de fenóis totais e teor de extrato seco. (Os valores mínimos estipulados pela legislação brasileira encontram-se marcados com uma linha tracejada na figura).....	143

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de própolis produzidas globalmente: origens vegetais e principais constituintes. ....	31
Tabela 2. Classificação das própolis brasileiras.....	33
Tabela 3. Composição química e origem vegetal dos diferentes tipos de própolis brasileira.....	40
Tabela 4. Parâmetros físico-químicos exigidos pelo MAPA para comercialização da própolis e seu extrato. ....	48
Tabela 5. Porcentagens de variância explicada pelo modelo PLS-DA.....	63
Tabela 6. Sensibilidade e especificidade do modelo PLS-DA. ....	64
Tabela 7. Teores de extrato seco de extratos alcoólicos comerciais de própolis comum. ....	80
Tabela 8. Teores de extrato seco de extratos alcoólicos comerciais de própolis verde. ....	81
Tabela 9. Atribuições de grupos orgânicos e suas frequências de grupo. ....	83
Tabela 10. Principais figuras de mérito estimadas para o modelo PLS proposto.....	90
Tabela 11. Estruturas básicas de compostos fenólicos e polifenólicos. ....	93
Tabela 12. Condições experimentais para determinação de fenóis totais em extratos de própolis encontrados na literatura. ....	95
Tabela 13. Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial $2^2$ com ponto central ( $n = 3$ ).....	98
Tabela 14. Planejamento composto central para otimização dos volumes de Folin e tampão carbonato de sódio. ....	98
Tabela 15. Planejamento composto central para otimização de pontos de máximo de absorção e mínimo de espalhamento da radiação.....	99
Tabela 16. Resultados do planejamento composto central para um máximo de absorção e um mínimo de espalhamento. ....	106

Tabela 17. Espalhamento da radiação e absorvância de extratos de própolis, na determinação do teor de fenóis totais. ....	111
Tabela 18. Limites de detecção, de quantificação e faixa de trabalho para o ácido gálico.....	117
Tabela 19. Repetitividade do método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu.....	118
Tabela 20. Estruturas, tempo de retenção, comprimento de onda máximo e identidade dos compostos avaliados.....	124
Tabela 21. Parâmetros de mérito dos compostos fenólicos avaliados por HPLC. ...	129
Tabela 22. Precisão para cada composto fenólico estudado em diferentes níveis de concentração.....	129
Tabela 23. Absortividades molares no comprimento de onda de 760 nm.....	134
Tabela 24. Teor de fenóis totais em extratos de própolis das regiões sul e sudeste. ....	134
Tabela 25. Teor de fenóis obtidos para o comprimento de onda de máxima absorção e para o comprimento de onda de 760 nm.....	138
Tabela 26. Teores de fenóis totais em extratos de própolis comerciais oriundos das regiões sul e sudeste do Brasil.....	140

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAS: do inglês, “Chemical Abstracts Service”

CCD: Cromatografia em camada delgada

CG-EM: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-DAD: Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos

CLAE-FR: Cromatografia líquida de alta eficiência com fase reversa

CL-EM: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

CL-EM-EM: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial

CPs: Componentes principais

CV: do inglês, “Cross Validation”

DPR: Desvio padrão relativo

EM-IE: Espectrometria de massas com ionização por impacto de elétrons

ESI/MS/MS: Espectrometria de massas seqüencial com ionização por electrospray

ESI-MS: Espectrometria de massas com ionização por electrospray

FAB-MS: Espectrometria de massas com bombardeamento de átomos rápidos

HCA: do inglês, “Hierarchical Cluster Analysis”

HPLC/ESI-MS/MS: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial com ionização por electrospray

HPLC: do inglês, “High Performance Liquid Chromatography”

HPLC-APCI-MS: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas com ionização química à pressão atmosférica

IMA: Instituto Mineiro de Agropecuária

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

INPI: Instituto Nacional da Propriedade Industrial

IV: Infravermelho

KNN: do inglês, “k-Nearest Neighbor”

LDA: do inglês, “Linear Discriminant Analysis”

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MLR: do inglês, “Multivariate Linear Regression”

MMQO: Método dos mínimos quadrados ordinário

MMQP: Método dos mínimos quadrados ponderado

PCA: do inglês, “Principal Component Analysis”

PCR: do inglês, “Principal Component Regression”

PLS: do inglês, “Partial Least Squares”

PLS-DA: do inglês, “Partial Least Squares Discriminant Analysis”

PRESS: do inglês, “Predictive Residual Sums of Squares”

RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ : Ressonância Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$

RMSE: do inglês, “Root Mean Square Error”

RMSEC: do inglês, “Root Mean Square Error of Calibration”

RMSECV: do inglês, “Root Mean Square Error Cross Validation”

RMSEP: do inglês, “Root Mean Square Error of Prediction”

SEBRAE: Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas

SIMCA: do inglês, “Soft Independent Modelling of Class Analogy”

UV-Vis: Ultravioleta-visível

VL: Variável latente

## SUMÁRIO

1 RELEVÂNCIA E OBJETIVOS .....	20
1.1 Objetivos .....	21
2 ASPECTOS GERAIS .....	24
2.1 Composição química e origem vegetal da própolis.....	29
2.1.1 Composição química e origem vegetal da própolis brasileira .....	32
2.2 Métodos de extração da própolis .....	44
2.3 Metodologias analíticas empregadas na análise de própolis .....	45
2.4 Métodos quimiométricos .....	48
3 DISCRIMINAÇÃO DE EXTRATOS ALCOÓLICOS COMERCIAIS DE PRÓPOLIS	55
3.1 Materiais e métodos.....	55
3.1.1 Amostras e reagentes.....	55
3.1.2 Instrumentação .....	57
3.1.3 Análise quimiométrica.....	57
3.2 Resultados e Discussão.....	57
3.3 Conclusões .....	71
4 DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE EXTRATO SECO EM EXTRATOS COMERCIAIS DE PRÓPOLIS .....	73
4.1 Materiais e métodos.....	75
4.1.1 Amostras e reagentes.....	75
4.1.2 Instrumentação e software.....	76
4.1.3 Análise gravimétrica.....	76
4.1.4 Análise quimiométrica.....	77
4.2 Resultados e Discussão.....	79
4.2.1 Metodologia gravimétrica .....	79
4.2.2 Metodologia quimiométrica .....	84
4.3 Conclusões .....	90

5 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO FOLIN-CIOCALTEU.....	92
5.1 Materiais e métodos.....	96
5.1.1 Amostras e reagentes.....	96
5.1.2 Instrumentação e software.....	96
5.1.3 Otimização da metodologia espectrofotométrica.....	97
5.1.4 Análise por fluorescência de raios X e difração de raios X.....	99
5.1.5 Parâmetros de mérito.....	99
5.1.5.1 Escolha do método dos mínimos quadrados.....	99
5.1.5.2 Avaliação da qualidade do ajuste.....	100
5.1.5.3 Linearidade.....	100
5.1.5.4 Limites de detecção e de quantificação.....	100
5.1.5.5 Precisão.....	101
5.2 Resultados e Discussão.....	101
5.2.1 Otimização multivariada.....	101
5.2.2 Avaliação do espalhamento da radiação em extratos de própolis.....	110
5.2.3 Avaliação da composição química do sólido cristalino.....	113
5.2.4 Parâmetros de mérito.....	115
5.2.4.1 Método dos mínimos quadrados.....	115
5.2.4.2 Avaliação da qualidade do ajuste e linearidade.....	116
5.2.4.3 Limites de detecção e de quantificação.....	117
5.2.4.4 Precisão.....	118
5.2.4.5 Exatidão.....	118
5.3 Conclusões.....	118
6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS EM EXTRATOS ALCOÓLICOS DE PRÓPOLIS.....	121
6.1 Materiais e métodos.....	122
6.1.1 Amostras e reagentes.....	122
6.1.2 Instrumentação.....	123
6.1.3. Metodologia espectrofotométrica.....	123
6.1.4 Metodologia cromatográfica.....	123
6.2 Resultados e discussão.....	126
6.2.1 Parâmetros de mérito do método de HPLC.....	128

6.2.2 Análise de extratos de própolis comerciais e verificação dos resultados por HPLC .....	130
6.2.3 Avaliação de deslocamento de banda .....	136
6.2.4 Quantificação do teor de fenóis totais de extratos de própolis comerciais a partir do método Folin-Ciocalteu .....	139
6.3 Conclusões .....	144
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	147
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	151

## **CAPÍTULO 1**

### ***Relevância e objetivos***

---

## 1 RELEVÂNCIA E OBJETIVOS

A própolis é um material resinoso coletado pelas abelhas a partir de exsudatos e brotos das plantas e misturado com enzimas presentes na saliva e cera de abelha. Esta mistura é depositada na colmeia pelas abelhas para selar buracos e manter a colônia livre de doenças e de intrusos.

A própolis tem uma enorme importância não só para as abelhas, mas também é muito utilizada pelos seres humanos como um alimento terapêutico. Sua utilização vem crescendo com o conhecimento da composição química dos vários tipos de própolis e das propriedades farmacológicas que ela pode apresentar.

A composição química, juntamente com as propriedades farmacológicas da própolis, dependem da flora da região. Dessa maneira, o Brasil, que apresenta uma grande diversidade de vegetação, ocupa uma posição de destaque em relação aos vários tipos de própolis que podem ser encontrados no seu território. A própolis brasileira também é muito valorizada pela sua qualidade. É rica em compostos derivados do ácido *p*-cumárico, que são encontrados somente em própolis de regiões tropicais do planeta. Estes compostos químicos conferem à própolis várias atividades farmacológicas como antiinflamatória, antitumoral, antioxidante, antibacteriana, dentre várias outras.

Dentre os vários tipos de própolis brasileira, os que mais de destacam são a própolis verde e a vermelha. Estas são, em sua grande parte, exportadas para outros países como o Japão e a China, e lá são vendidas a preços exorbitantes. Por esse motivo, muitos apicultores estão deixando a comercialização de mel para se empenharem na comercialização da própolis e de seu extrato, por serem mais lucrativos.

No Brasil, a apicultura vem ganhando espaço principalmente na economia informal. Pequenos agricultores têm deixado suas atividades no campo para se dedicarem a apicultura, entretanto, por causa das grandes exigências para regulamentação do produto que será comercializado, estes acabam vendendo a produção para entrepostos.

Os entrepostos recebem vários tipos de própolis, de localidades diferentes, fazem a extração com etanol e, posteriormente, envazam para a venda. Dessa maneira, não se pode afirmar o tipo, a composição química e, conseqüentemente,

as propriedades terapêuticas que o produto apresentará, comprometendo a qualidade do produto final.

A própolis é frequentemente comercializada na forma de extratos alcoólicos. A sua comercialização é regulamentada pela instrução normativa nº3, de 2001, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Nessa instrução são contemplados vários ensaios físico-químicos com o objetivo de avaliar a qualidade do produto. Dentre os parâmetros físico-químicos que são avaliados, pode-se destacar o teor de extrato seco e o teor de fenóis totais como os mais importantes. Ambos os parâmetros visam avaliar direta e indiretamente a quantidade de compostos bioativos que estão presentes no extrato e se são significativas para um determinado nível.

Para determinação do teor de fenóis totais em própolis, várias técnicas analíticas têm sido empregadas, como as cromatografias líquida e gasosa e espectrofotometria. As metodologias colorimétricas são as mais empregadas em análises de rotina para controle de qualidade de extratos de própolis, por estas serem mais rápidas e econômicas que as metodologias cromatográficas.

Na literatura existem várias metodologias colorimétricas para determinação do teor de fenóis totais e para determinação de uma classe específica de flavonóides, sendo que estes também pertencem à classe dos fenóis. Na determinação do teor de fenóis totais, o método mais empregado é o método Folin-Ciocalteu. Entretanto, diferentes condições experimentais são utilizadas em trabalhos envolvendo este método, dificultando uma padronização do mesmo para sua utilização, além de comprometer a sua exatidão.

## **1.1 Objetivos**

Um dos objetivos dessa tese foi avaliar a classificação de extratos comerciais de diferentes tipos de própolis, relacionando-os com a sua origem geográfica, através da espectroscopia UV-Vis e métodos de análise exploratória, visando garantir uma maior qualidade do produto, principalmente de extratos de própolis que apresentam um maior valor comercial, como a própolis verde.

Nessa tese utilizaram-se as análises que são feitas rotineiramente na avaliação do controle de qualidade de extratos alcoólicos comerciais de própolis,

para a construção de modelos de calibração multivariada para a determinação do teor de extrato seco, visando uma redução significativa no tempo de análise, de reagentes e no custo final dos ensaios.

Outro objetivo deste trabalho foi otimizar as condições experimentais do método Folin-Ciocalteu, visando obter um método exato para posterior aplicação na determinação do teor de fenóis totais em extratos de própolis comerciais. Análises cromatográficas também foram realizadas para identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes nestes extratos.

A presente tese é apresentada em oito capítulos:

- ✓ No Capítulo 2 são apresentados os principais tópicos relacionados ao trabalho e uma revisão da literatura.
- ✓ O Capítulo 3 aborda a classificação dos extratos comerciais de própolis de diferentes tipos e localidades, a partir de metodologias espectroscópicas e quimiométricas.
- ✓ O Capítulo 4 trata do desenvolvimento de um método de calibração multivariada para a determinação do teor de extrato seco em extratos de própolis comerciais, a partir de metodologias gravimétricas, espectroscópicas e quimiométricas.
- ✓ No Capítulo 5 é apresentada a otimização de um método espectrofotométrico para determinação do teor de fenóis totais em extratos de própolis.
- ✓ O Capítulo 6 aborda a aplicação da metodologia espectrofotométrica, otimizada no capítulo anterior, na determinação do teor de fenóis totais em extratos comerciais de própolis juntamente com análises cromatográficas para identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos.
- ✓ O Capítulo 7 apresenta as considerações finais sobre todo o trabalho desenvolvido nessa tese e, por fim, o Capítulo 8 apresenta as referências bibliográficas consultadas.

## **CAPÍTULO 2**

### ***Aspectos Gerais***

---

## 2 ASPECTOS GERAIS

A própolis (CAS 9009-62-5) é um material resinoso coletado pelas abelhas a partir de exsudatos e brotos de plantas e misturado com enzimas presentes na saliva e cera de abelha. A palavra própolis (do grego *pro* = em defesa ou para, e *polis* = cidade) reflete a sua importância para as abelhas, uma vez que a utilizam para suavizar paredes internas, selar buracos e manter a temperatura dentro da colmeia. Além disso, é usada para cobrir carcaças de intrusos que morreram dentro da colmeia evitando sua decomposição, protegendo a colônia de doenças [1].

A Figura 1 apresenta o processo de produção da própolis pelas abelhas, que vai desde a retirada da resina de brotos e exsudatos das plantas até a sua deposição nas fendas contidas na colmeia. Os apicultores, visando maximizar a produção de própolis, deixam fendas longitudinais em ambos os lados de uma caixa de madeira que abriga a colônia de abelhas, para que as abelhas depositem a resina coletada em todas as aberturas.

Após a retirada da própolis da colmeia pelos apicultores, ela é selecionada conforme a qualidade, retirando-se contaminantes como pedaços de madeira e insetos mortos e, posteriormente, é processada conforme a utilidade (Figura 1). A resina contida na própolis é coletada da vegetação que fica em torno da colmeia. O voo de uma abelha *A. mellifera* abrange um raio de cerca de 3 km em torno da colmeia, de onde as abelhas coletam pólen e néctar para alimentação, bem como a resina para a produção da própolis.

Não são conhecidos os fatores que direcionam a preferência das abelhas coletoras de resina por uma determinada fonte vegetal, mas se sabe que elas são seletivas nesta coleta [2, 3]. Possivelmente, esta escolha esteja relacionada com a atividade antimicrobiana da resina, uma vez que as abelhas utilizam a própolis como um antisséptico [4] para proteção de toda a colmeia.

As abelhas do gênero *Apis* são as utilizadas pelos apicultores na produção não só de própolis, mas também de mel, por apresentarem maior rendimento na produção destes produtos.



Figura 1. Produção da própolis pelas abelhas.

Fonte: Elaborada pela autora.

As populações de abelhas do gênero *Apis*, no Brasil, foram principalmente de origem europeia antes de meados dos anos 1950. Em 1956, abelhas africanas (*A. mellifera scutellata*) foram introduzidas no sudeste do Brasil, mas por causa de um acidente ocorrido, várias abelhas africanas escaparam e um processo de africanização ocorreu com as abelhas europeias presentes no Brasil [5], gerando abelhas híbridas, ou seja, uma mistura genética de abelhas europeias e africanas. A abelha *A. mellifera* “híbrida” possui um alto poder de enxameação, se adapta facilmente às variações climáticas, possui uma produção de mel e própolis maior e são menos agressivas que as abelhas africanas.

A própolis pode apresentar várias cores e odores característicos. Algumas amostras apresentam textura dura e quebradiça, enquanto outras amostras podem ser elásticas e terem propriedades adesivas. Seu ponto de fusão está entre 60 e 70 °C, podendo atingir, em alguns casos, 100 °C [6].

A própolis tem sido utilizada pelos seres humanos extensivamente desde os tempos antigos. Os egípcios embalsamavam seus mortos utilizando própolis por esta possuir propriedades antiputrefativas e os incas empregaram a própolis como

um agente antipirético [7]. A própolis também foi usada no tratamento de infecções e inchaço pelos assírios e, mais tarde, a utilização medicinal da própolis em ambas as cicatrizações interna e externa foi descrita pelos gregos, especialmente Aristóteles, Dioscorides e Hipócrates. Os romanos, especificamente Plínio e Galeno, também descreveram seus usos medicinais. Durante a Segunda Guerra Mundial, na ex-União Soviética, a própolis foi empregada na cicatrização de feridas [8].

A própolis continua sendo utilizada atualmente como um remédio popular e está disponível em estado puro ou combinado com outros produtos naturais, em cosméticos e como componente de suplementos alimentares. Nas últimas décadas, os cientistas têm se interessado na investigação de seus constituintes e nas suas propriedades farmacológicas tais como antiinflamatória, imunomodulador, antitumoral, antioxidante, antibacteriana, antiviral, antifúngica, atividades antiparasitárias, entre outras [7].

Sabe-se atualmente que a amplitude das atividades farmacológicas da própolis é maior em regiões tropicais do planeta e menor nas regiões temperadas. Isso se deve ao fato da diversidade biológica nas regiões tropicais ser superior à observada nas regiões temperadas [9]. Assim, pode-se dizer que a própolis brasileira é privilegiada em termos de atividades farmacológicas.

Em se tratando de trabalhos científicos, o primeiro trabalho sobre as propriedades químicas e composição da própolis foi publicado em 1908, indexado no *Chemical Abstracts* [10]. A primeira publicação sobre própolis no Brasil é de 1984, no qual foi realizado um estudo comparativo do efeito da própolis e antibióticos na inibição de *Staphylococcus aureus* 20 [11]. Em 1968, foi publicado no *Chemical Abstracts* o resumo da primeira patente (romena) utilizando a própolis para a produção de loções para banho [10].

O número de publicações envolvendo a própolis cresce a cada ano, como pode ser observado na Figura 2. Nos últimos 10 anos, 311 trabalhos foram publicados com estudos sobre própolis e 807 patentes foram depositadas no mundo todo. Considerando o período de janeiro até novembro de 2012, data em que esta pesquisa foi realizada, o número de publicações ultrapassa a quantidade de trabalhos publicados no ano de 2010 e anteriores [12].

Em relação às patentes depositadas, a maior parte delas é japonesa, sendo que a primeira patente japonesa é de 1987 e aborda o uso da própolis no controle de odores. A primeira patente brasileira surgiu somente em 1995, para o uso em

tratamento odontológico na prevenção de cáries e gengivites [11]. Como pode ser observado na Figura 2, o número de depósitos de patentes no ano de 2012 ultrapassa o número de depósitos dos anos anteriores, indicando um crescimento [13].

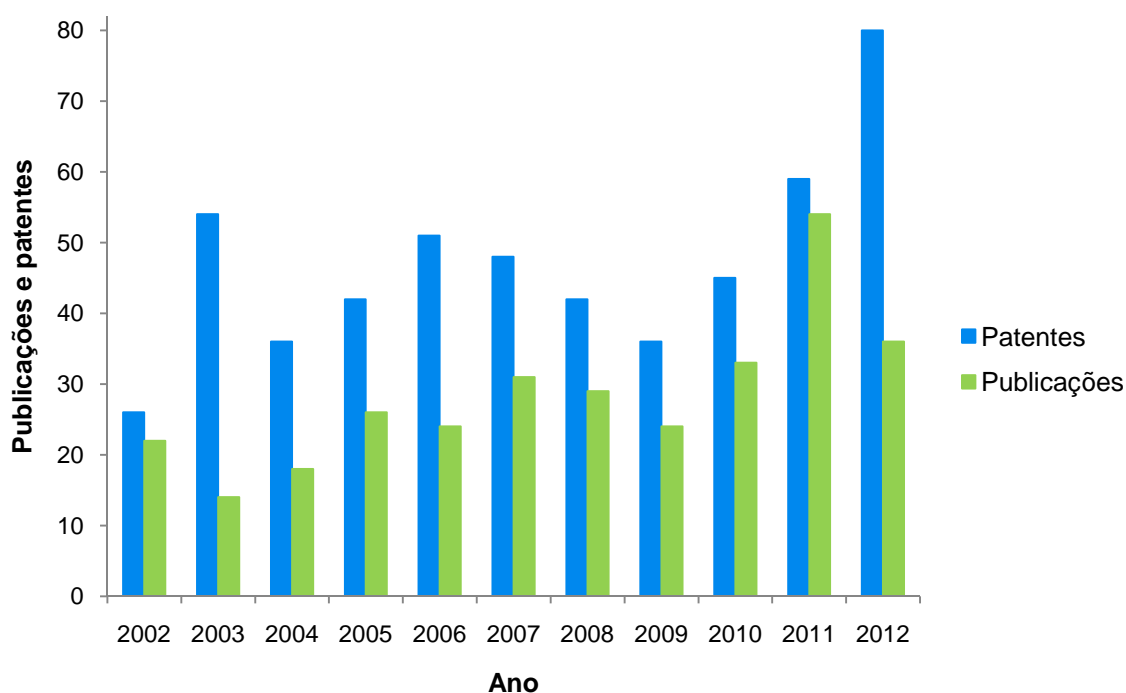


Figura 2. Publicações e patentes depositadas sobre própolis no período de 2002 até novembro de 2012.

Fontes: EUROPEAN PATENT OFFICE, 2012 e SCIENCE DIRECT, 2012.

Em países da Europa Ocidental, na América Norte e do Sul e no Japão, a própolis não possuía popularidade até os anos 80. Neste último país, o primeiro reconhecimento da própolis como uma possibilidade promissora em farmacologia ocorreu em 1985 (30º Congresso Internacional de Apicultura, Nagoya). Até aquele momento, a própolis era considerada pelos apicultores como um produto indesejado na colmeia, por não possuir valor de mercado e por sua produção significar um declínio na produção de mel. Começando com um aumento gradual do interesse em vários países em meados de 1980, a própolis tornou-se um produto cada vez mais importante na medicina complementar e alternativa, sendo atualmente um dos produtos apícolas mais consumidos no mundo. O Japão é o principal importador de própolis, com preferência manifestada pela própolis brasileira [2].

O mercado brasileiro de produtos apícolas tem crescido nos últimos anos, principalmente pela procura por produtos naturais que atendam anseios específicos do consumidor em relação à sua ação terapêutica. A produção de própolis tem se tornado fonte de renda para muitas famílias brasileiras.

Em Alagoas, muitos pescadores e pequenos agricultores deixaram suas atividades para trabalhar com a apicultura em mangues e rios próximos ao mar, principalmente na produção da própolis vermelha [14]. Os apicultores alagoanos receberam, recentemente, autorização para o registro da Identificação Geográfica (IG) da própolis vermelha, concedida pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), agregando maior valor e qualidade ao produto e maior competitividade no mercado global, trazendo mais desenvolvimento a todo o estado [15].

Os apicultores mineiros obtiveram no ano de 2011 a outorga para a denominação de origem da própolis verde, juntamente com o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) em parceria com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A denominação se deu por meio da Portaria nº 1138 de 2011 do IMA, que definiu as regiões produtoras de própolis verde no estado, composta por 102 municípios mineiros. A denominação de origem é o primeiro passo para que possa ser feito o pedido da patente junto ao INPI [16].

A própolis verde, assim como a própolis vermelha, é muito valorizada no mercado internacional, principalmente no mercado japonês. Segundo o SEBRAE, o preço médio de um quilograma da própolis verde em 2010 foi de 87 dólares, enquanto que o preço médio do quilograma de mel foi de 3 dólares no mesmo período [17]. Em Tóquio, no mesmo período um frasco de extrato de própolis verde foi comercializado a US\$ 150, enquanto no Brasil o preço foi menor que US\$ 3 [18].

O alto valor agregado à própolis é um incentivo para um sério controle de qualidade dos produtos apícolas produzidos no Brasil, para que o mesmo não perca mercado para outros países produtores. O Brasil possui hoje a segunda maior produção mundial, perdendo apenas para a China [10]. As exigências internacionais para a qualidade dos produtos apícolas obrigaram o Brasil a estabelecer normas para definir padrões mínimos de qualidade para comercialização destes produtos.

Para regulamentar o produto apícola, foi criada a instrução normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001, do MAPA, que preconiza os limites para fixação de identidade e qualidade da própolis. Essa instrução normativa contém o anexo VI,

que regulamenta os padrões para fixação de identidade e qualidade de própolis, e o anexo VII, que regulamenta a identidade e qualidade de extrato de própolis, proveniente da extração dos componentes solúveis em álcool neutro (grau alimentício) [19].

## 2.1 Composição química e origem vegetal da própolis

A própolis é composta de 50% de resina (flavonóides e ácidos fenólicos), 30% de cera, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de outros compostos orgânicos [20]. A própolis possui uma composição complexa, englobando:

- ✓ hidrocarbonetos superiores;
- ✓ álcoois;
- ✓ ácidos alifáticos e ésteres derivados;
- ✓ ácidos aromáticos e ésteres aromáticos derivados;
- ✓ ácidos graxos superiores típicos de ceras e seus ésteres;
- ✓ aldeídos;
- ✓ cetonas;
- ✓ flavonas e flavonóis;
- ✓ flavanonas;
- ✓ chalconas e diidrochalconas;
- ✓ terpenóides e sesquiterpenóides;
- ✓ esteróides;
- ✓ aminoácidos;
- ✓ açúcares;
- ✓ lignanas;
- ✓ vitaminas;
- ✓ minerais.

A composição química da própolis depende das características fitogeográficas do local de coleta, pois as abelhas podem escolher diferentes plantas como fonte de resina em diferentes ambientes [7]. Estudos indicaram que a própolis da Europa e da China continham vários tipos de flavonóides e ácidos fenólicos, enquanto que as amostras brasileiras tiveram mais terpenóides e derivados prenilados do ácido *p*-cumárico [21].

Na própolis de zonas temperadas, a classe mais importante de compostos biologicamente ativos é caracterizada pelos polifenóis, incluindo flavonóides, ácidos fenólicos e seus ésteres, sendo que esta possui maior teor de flavonóides do que a própolis de zonas tropicais. Em contraste, a própolis de regiões tropicais tem mostrado conter maiores quantidades de compostos fenólicos, no qual podemos destacar fenilpropanóides prenilados (Brasil) e benzofenonas poliisopreniladas (Cuba) [22].

Os vários tipos de própolis com suas respectivas fontes vegetais e seus principais constituintes são apresentados na Tabela 1. Nas zonas temperadas, a própolis é coletada a partir do exsudato de álamo, tais como as espécies de *Populus*. Em regiões tropicais a principal fonte de própolis é *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae), conhecida popularmente no Brasil como alecrim do campo, seguida de espécies de *Dalbergia*. Além disso, na zona temperada do hemisfério norte, as abelhas coletam própolis apenas no verão (incluindo o final da primavera e início do outono), enquanto que, no Brasil, a coleta de própolis ocorre durante todo o ano com variações sazonais [23].

Tabela 1. Tipos de própolis produzidas globalmente: origens vegetais e principais constituintes.

Tipo de própolis	Origem geográfica	Fonte vegetal	Principais constituintes	Referência
Álamo	Europa, América do Norte, regiões não-tropicais da Ásia, Nova Zelândia	<i>Populus</i> spp., mais frequentemente <i>P. nigra</i> L.	Flavonas, flavanonas, ácidos cinâmicos e seus ésteres	[1, 24-27]
	Argentina, Uruguai e Brasil (SC)	<i>Populus alba</i>	Flavonóides, ácidos fenólicos e ésteres.	[5]
Verde (alecrim) brasileira	Brasil	<i>Baccharis</i> spp., predominantemente <i>B. dracunculifolia</i> DC.	Ácidos <i>p</i> -cumárico prenilados, ácidos diterpênicos	[28]
Bétula	Rússia	<i>Betula verrucosa</i> Ehrh.	Flavonas e flavonóis (tipos diferentes dos encontrados em álamo)	[29]
Vermelha	Brasil e México	<i>Dalbergia</i> spp.	Isoflavonóides (isoflavanos, pterocarpanos)	[30-32]
Mediterrânea	Sicília, Grécia, Creta, Malta	<i>Cupressaceae</i> (espécies não identificadas)	Diterpenos	[33-36]
Clusia	Cuba, Venezuela	<i>Clusia</i> spp.	Benzofenonas polipreniladas	[37, 38]
Pacífico	Região do Pacífico (Okinawa, Taiwan, Indonésia)	<i>Macaranga tanarius</i>	C-prenil-flavanonas	[39, 40]

Fonte: Elaborada pela autora.

### 2.1.1 Composição química e origem vegetal da própolis brasileira

Vários estudos sobre a composição química da própolis produzida no Brasil foram desenvolvidos nos últimos anos, demonstrando que compostos fenólicos derivados do ácido cinâmico (ácidos diidrocinâmico, *p*-cumárico, ferúlico e caféico), inclusive derivados mono e diprenilados do ácido *p*-cumárico, são os seus constituintes principais, ao lado de benzopiranos [41], flavanonas preniladas [42], benzofenona [43], triterpenóides (cicloartano [44], alcanosatos de lupeol [42], ácido morônico [45] e 3 $\beta$ -acetato de bauerenol [46]) e epóxidos de naftoquinonas [47].

Devido à grande diversidade da flora brasileira, as própolis do Brasil foram agrupadas por Park e colaboradores [48] em grupos distintos, de acordo com a composição química e atividades farmacológicas. Neste estudo, 500 amostras de própolis foram coletadas de diferentes regiões do Brasil, sendo classificadas em 12 grupos distintos de própolis (Tabela 2). Como pode ser observado, cinco grupos de própolis foram encontrados na região sul, seis grupos na região nordeste e um grupo na região sudeste. Esse resultado sugere que existe uma maior diversidade de própolis nas regiões sul e nordeste do Brasil na mesma proporção que a vegetação destas regiões também varia.

Em outro estudo, Park e colaboradores [50] estudaram várias amostras de própolis da região sul do Brasil, da Argentina e do Uruguai, constatando que a fonte botânica das amostras do grupo 3, da Argentina e do Uruguai, é a espécie vegetal *P. alba*, segundo os perfis fitoquímicos comparativos. Apesar desta espécie vegetal não ser nativa nos trópicos, ela pode existir em algumas regiões de clima ameno, como o sul do Brasil e outros países de clima temperado da América do Sul, fazendo com que abelhas retirem preferencialmente a resina deste vegetal para elaboração da própolis [49]. Já para amostras de própolis do grupo 6 (Estado da Bahia), as possíveis fontes botânicas são as plantas da família Guttiferae, pertencente especificamente aos gêneros *Garcinia*, *Clusia* e *Rheedia*, por possuírem benzofenonas preniladas como seus principais componentes.

Em outro estudo, Park e colaboradores [5] analisaram a origem vegetal de amostras de própolis dos grupos 3 (região sul do Brasil), 6 (região nordeste) e 12 (região sudeste). Os autores verificaram que na produção das amostras de própolis advindas dos estados de Minas Gerais e São Paulo (grupo 12), as abelhas

coletaram a resina principalmente de *B. Dracunculifolia*, visitando raramente outras espécies de *Baccharis* (*B. caprariaefolia*, *B. erioclada*, *B. myriocephala*, *B. platipoda* e *B. tridentado*), de *Eucalyptus citriodora*, *Myrocarpus frondosus* e *Araucaria angustifolia*. Em relação às amostras do grupo 3, foi observado que as abelhas visitaram principalmente as plantas de álamo e, para as amostras do grupo 6, *Hyptis divaricata* foi a principal fonte vegetal visitada pelas abelhas.

Tabela 2. Classificação das própolis brasileiras.

Grupos	Extrato Etanólico de Própolis		Origem da própolis
	Cor	Substâncias Solúveis (%)	
Grupo 1 (RS5)	Amarelo	63,0	Região Sul
Grupo 2 (RS1)	Castanho claro	57,5	Região Sul
Grupo 3 (PR7)	Castanho escuro	65,0	Região Sul
Grupo 4 (PR8)	Castanho claro	54,5	Região Sul
Grupo 5 (PR9)	Marrom esverdeado	58,7	Região Sul
Grupo 6 (BA11)	Marrom avermelhado	45,9	Região Nordeste
Grupo 7 (BA51)	Marrom esverdeado	43,8	Região Nordeste
Grupo 8 (PE5)	Castanho escuro	41,3	Região Nordeste
Grupo 9 (PE3)	Amarelo	46,7	Região Nordeste
Grupo 10 (CE3)	Amarelo escuro	24,1	Região Nordeste
Grupo 11 (PI1)	Amarelo	23,1	Região Nordeste
Grupo 12 (SP12)	Verde ou Marrom esverdeado	61,0	Região Sudeste

Fonte: Park et al., 2000

Bankova e colaboradores [1] relataram que as espécies de *Baccharis* e *Araucaria* são importantes fontes de própolis no Estado de São Paulo. Midorikawa e colaboradores relataram que *B. dracunculifolia* é uma importante fonte vegetal para a produção da própolis não só no Estado de São Paulo, mas também em outros Estados do Brasil [51]. Park e Kumazawa informaram em seus estudos que o perfil químico de extratos de *B. dracunculifolia* se assemelha ao perfil de própolis do sudeste do Brasil [5, 52].

A própolis verde brasileira, produzida em São Paulo e Minas Gerais, é constituída principalmente de derivados prenilados do ácido *p*-cumárico e possui grande quantidade de flavonóides, muitos dos quais não estão presentes em

própolis da Europa, América do Norte e Ásia [53]. A própolis verde exala um odor agradável resinoso e a cor varia de verde-amarelado a verde escuro [28].

A cor verde característica da própolis citada acima é uma consequência de sua origem vegetal, em função das abelhas coletarem tecidos jovens de botões e de folhas não expandidas (que contêm clorofila) de *B.dracunculifolia* (alecrim do campo ou vassourinha). Tais folhas jovens contêm pelos secretores, provavelmente com óleos aromáticos voláteis, daí o aroma resinoso da própolis verde [28]. Entretanto, quando retirada da colmeia, a própolis apresenta mudança na sua coloração de verde para marrom, sendo esta última cor apresentada também pelo seu extrato alcoólico.

*Baccharis dracunculifolia* é um arbusto da família Asteraceae (Figura 33), que cresce naturalmente no sul e sudeste do Brasil, Uruguai, Paraguai, Argentina e Bolívia, a uma altura de dois a três metros [54]. Foi demonstrado [55, 56] que esta espécie é a principal fonte vegetal da própolis brasileira coletada nos Estados de São Paulo e Minas Gerais, sendo rica em derivados fenólicos de ácidos cinâmicos. Esta espécie é considerada uma planta invasora e pode estar presente em diversos tipos de vegetações.



Figura 3. Arbusto adulto da espécie *Baccharis dracunculifolia* e um detalhe de seu ramo. Fonte: NATUREZONE, 2011.

Atualmente, o cerrado, que se constitui de uma vegetação intermediária entre florestas e pastagens, é uma das áreas mais ricas em *Baccharis sp.*. A Figura 4 apresenta a abelha *Apis mellifera* coletando a resina de folhas jovens de *Baccharis*

*dracunculifolia* (alecrim do campo) para a produção de própolis verde. Na Figura 4(a) pode-se observar a abelha depositando a resina coletada nas patas traseiras e, posteriormente, as mesmas depositando as resinas nas fendas abertas na colmeia (Figura 4(b) e 4(c)), onde a resina misturada com a saliva e a cera da abelha será transformada em própolis.



Figura 4. Abelha *Apis mellifera* coletando a resina de folhas jovens de *Baccharis dracunculifolia* (a). Depósito das resinas coletadas para forrar fendas abertas na colmeia (b) e (c). Fonte: KUMAZAWA et al., 2003.

O principal componente químico presente na própolis verde brasileira é o composto chamado artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), um composto fenólico de baixa massa molecular encontrado somente em própolis brasileira, sendo considerado um marcador químico para este tipo de própolis [53].

A própolis verde brasileira contém altos níveis de compostos fenólicos além do artepillin C, como os derivados de 2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2H-1-benzopirano, os ácidos 3-prenil-4-hidroxicinâmico, *p*-cumárico, caféico e cafeoilquínicos. Além destes compostos, a própolis verde também possui quantidades significativas de flavonóides, muitos dos quais não estão presentes nas própolis da Europa, América do Norte ou Ásia, como, por exemplo, aromadendrina-4'-metil-éter e 5,6,7-tri-3'-4-dimetoxiflavona [53]. O artepillin C, assim como outros compostos fenólicos presentes na própolis, possui propriedades antimicrobianas

[58], antitumorais [59-63], imunomodulador [64, 65] e propriedades antioxidantes [53, 66, 67].

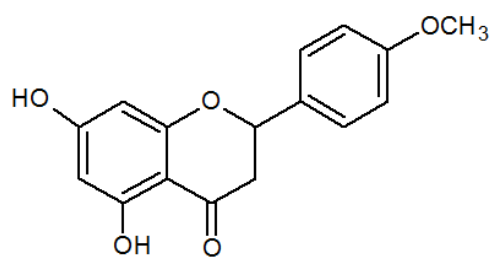
Para a avaliação dos efeitos citotóxicos da própolis verde, Simões e colaboradores utilizaram amostras de própolis verde de Minas Gerais, identificando os seguintes compostos principais: ácido 3-prenil-*p*-cumárico, ácido 3,5-diprenil-*p*-cumárico (artepillin C) e isosakuranetina a partir da fração clorofórmica, e os compostos ácido *p*-cumárico, aromadendrina-4'-metil-éter e kaempferida foram obtidos a partir da fração butanólica [53]. Estes compostos estão ilustrados na Figura 5.

Em estudos realizados por Matsuda e Almeida-Muradian, amostras de própolis da região sudeste do Brasil apresentaram maior teor de artepillin C, em comparação com amostras de outras regiões do país, provavelmente por esta região ser rica em espécies de *Baccharis* [68].

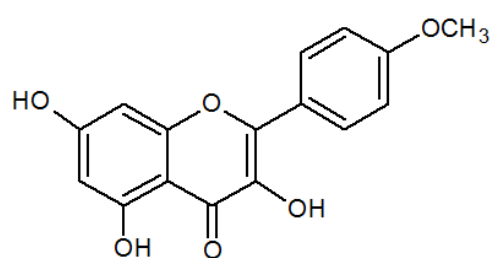
Como pode-se perceber, a presença de artepillin C na própolis verde confere à mesma não só um alto valor terapêutico, mas também um alto valor comercial em relação à própolis dita “comum” (própolis marrom) no mercado nacional e internacional. O maior país importador da própolis brasileira, o Japão, tem preferência pela própolis verde, não só para o consumo, mas também é pioneiro em estudos relacionados com a composição química, atividades farmacológicas e a criação de várias patentes envolvendo a própolis verde brasileira [11].

Um novo tipo de própolis encontrado no nordeste brasileiro, denominado própolis vermelha, tem sido classificado como o 13º tipo de própolis brasileira [69]. Esta própolis possui coloração vermelha intensa e vem demonstrando várias atividades farmacológicas em ensaios *in vitro* [70]. Este tipo de própolis é proveniente da região de mangues e rios próximos ao mar e teve sua origem vegetal identificada como *Dalbergia ecastophyllum*, uma espécie de leguminosa.

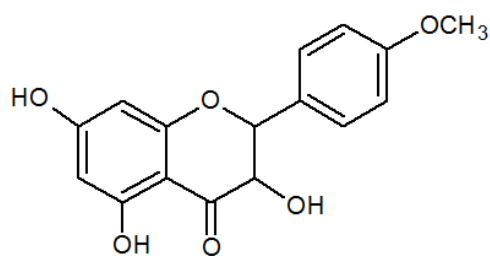
Silva e colaboradores demonstraram que o perfil químico de *Dalbergia ecastophyllum* foi similar ao perfil químico da própolis vermelha, sendo que os principais constituintes de ambos os extratos foram os isoflavonóides medicarpina e 3-hidroxi-8,9-dimetoxipterocarpano, sendo que este último representou mais de 60% da composição em ambos os extratos [70].



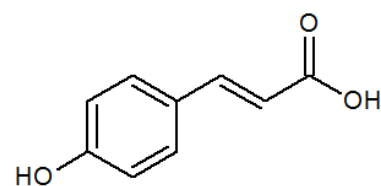
Isosakuranetina



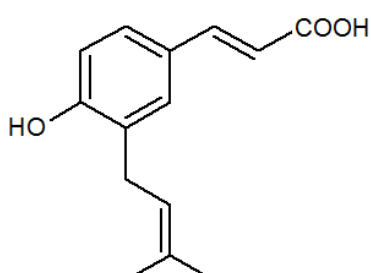
Kaempferida



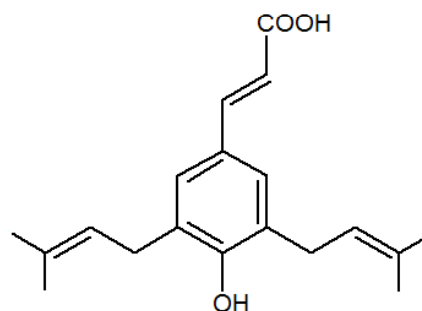
Aromadendrina-4'-metil-éter



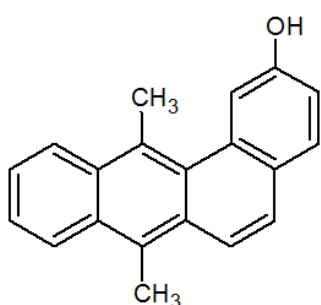
Ácido *p*-cumárico



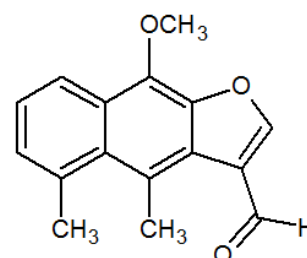
Ácido 3-prenil-*p*-cumárico



Ácido 3,5-diprenil-*p*-cumárico  
(artepillin C)



2-hidroxi-7,12-dimetilbenzantraceno



Isomaturina

Figura 5. Estrutura química de alguns compostos isolados de própolis verde brasileira.

Fonte: Adaptado de TEIXEIRA et al., 2005.

No estudo realizado por Silva e colaboradores [70], descrito anteriormente, a presença dos isoflavonóides medicarpina e 3-hidroxi-8,9-dimetoxipterocarpano em ambos os extratos concorda com Trusheva e colaboradores [72], que também observaram a presença de isoflavonóides, como isosativana e medicarpina, em amostras de própolis vermelha brasileira. Os isoflavonóides são compostos típicos da família Leguminosae. Assim, esses compostos podem ser úteis como marcadores químicos deste novo tipo de própolis brasileira.

A própolis vermelha brasileira tem uma composição semelhante a de um tipo específico de própolis vermelha de Cuba, que possui vários isoflavonóides, dentre eles medicarpina e 3-hidroxi-8,9-dimetoxipterocarpano [73]. Existem vários estudos na literatura mostrando que isoflavonas possuem atividade antimicrobiana, antifúngica, anticancerígena, antioxidante e aliviam os sintomas da menopausa e da osteoporose. Assim, o consumo de alimentos que contenham fitoestrógenos como isoflavonas tem sido associado com uma variedade de benefícios para a saúde [74].

Um estudo da composição química da própolis produzida no Estado do Piauí, resultou na identificação de seis triterpenóides derivados do cicloartano que foram os ácidos isomangiferólico, mangiferólico, mangiferônico, ambólico, ambônico, e 24-metilenocicloartano-3 $\beta$ ,26-diol, compostos inéditos em própolis. Os autores propuseram que a fonte botânica *Mangifera indica* foi a utilizada pelas abelhas, em diferentes épocas do ano, para coleta de materiais para elaboração da própolis [44].

A investigação da composição química de uma amostra de própolis do Estado do Ceará permitiu a identificação de triterpenos (lupeol, lupenona, germanicona, ácido canárico) e flavonóides (quercetina, kaempferol e acacetina), sendo este o primeiro relato de ácido canárico em própolis. Os autores citam que o ácido canárico foi isolado da resina de *Canarium muelleri* e de *Rugea jasminoides*, mas nenhum estudo comparativo foi realizado para verificar se estes vegetais poderiam ter sido fonte para a retirada de resinas, pelas abelhas, na produção deste tipo de própolis [42].

Recentemente, Ishida e colaboradores estudaram amostras de própolis da região amazônica, na qual benzofenonas polipreniladas como 7-epi-nemorosona, 7-epi-clusianona, xantoquimol e gambogenona, foram os principais componentes. Este tipo de própolis foi altamente ativo contra bactérias cariogênicas como *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus salivarius* [75]. Os autores sugerem que as possíveis fontes botânicas para a produção deste tipo de

própolis pelas abelhas sejam espécies de *Garcinia* e *Clusia*. Benzofenonas polipreniladas também têm sido relatadas como constituintes da própolis vermelha brasileira, encontrada no nordeste do Brasil [72].

As fontes botânicas da própolis brasileira, bem como sua composição química, variam enormemente de uma região para outra. Dessa maneira, deve-se levar em consideração essas diferenças na comercialização da própolis brasileira, visando que cada tipo de própolis comercializada poderá apresentar um efeito diferente do esperado pelo consumidor.

Os vários tipos de própolis brasileiras, com suas respectivas fontes vegetais, composição química e técnicas analíticas utilizadas na determinação dos compostos químicos, estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3. Composição química e origem vegetal dos diferentes tipos de própolis brasileira (continua).

Tipo	Estado	Vegetação	Fonte botânica	Composição química	Técnica analítica	Referência
Tipo 6**	Bahia	Caatinga e mata atlântica	<i>Garcinia, Clusia, Rheedia*</i>	Hiperibona A	CLAE-FR, RMN <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H	[50]
-	Bahia	Caatinga e mata atlântica	-	Terpenóide β-cariofileno, vários ésteres de ácidos graxos e compostos aromáticos,	CLAE-FR, UV-Vis, CG-EM	[76]
-	Ceará	Caatinga	<i>Canarium muelleri</i> e <i>Rugea jasminoides*</i>	Triterpenos: ácido canário, lupeol, lupenona e germanicon Flavonóides: quercetina canferol, acacetina	CCD, UV-Vis, IV, RMN <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H, EM-IE	[42]
-	Piauí	Caatinga e matas de cocais	<i>Mangifera indica</i> (Anacardiaceae)	Triterpenóides derivados do cicloartano: ácido isomangiferólico, ácido mangiferólico, ácido angiferônico, 24-metilenocicloartano-3β,26-diol, ácido ambólico e ácido ambônico	CCD, RMN <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H	[44]
Própolis vermelha	Alagoas	Caatinga e mata atlântica	<i>Dalbergia ecastophyllum</i> (L.) Taub	Isoflavononóides medicarpina e 3-hidroxi-8,9-dimetoxipterocarpano	CLAE-FR, UV-Vis e GC-MS	[69]
Própolis vermelha	-	-	-	Vários tipos de flavonóides (flavonóides, flavonol, isoflavonas, isoflavanonas, isoflavanas, chalconas, auronol, pterocarpanas, 2-arilbenzofurano e neoflavonóide) e lignanas	CCD e RMN de <sup>1</sup> H	[77]
Própolis vermelha	Alagoas	Caatinga e mata atlântica	<i>Dalbergia ecastophyllum</i>	Flavonóide: quercetina; isoflavonas: formononetina e daidzeina e os ácidos fenólico e ferúlico	CLAE-FR e UV-Vis	[78]
Própolis vermelha	Alagoas	Caatinga e mata atlântica	-	Isoflavonas: Homopterocarpana, medicarpina e 4',7-dimetoxi-2'-isoflavonol.	CLAE-FR, UV-Vis e CG-EM	[70]

Tabela 3. Composição química e origem vegetal dos diferentes tipos de própolis brasileira (continuação).

Tipo	Estado	Vegetação	Fonte botânica	Composição química	Técnica analítica	Referência
Própolis vermelha	Alagoas	Caatinga e mata atlântica	-	Compostos fenólicos simples, triterpenóides, isoflavonóides, benzofenonas preniladas e um epóxido de naftoquinona	CG-EM e RMN de <sup>13</sup> C e de <sup>1</sup> H	[72]
Própolis vermelha	Pernambuco	Caatinga e mata atlântica	-	Terpenos, fenilpropanóides e outros compostos orgânicos	CG-EM	[79]
Própolis vermelha	BA, SE, AL, PE e PB	Caatinga e mata atlântica	<i>Dalbergia ecastophyllum</i>	Liquiritigenina, dalbergina, isoliquiritigenina e os isoflavonóides daidzeína, formononetina e biochanina A.	CLAE-FR	[31]
-	Manaus	Floresta amazônica	Espécies de <i>Clusia Garcinia*</i>	Benzofenonas polipreniladas: 7-epi-nemorosona, 7-epi-clusianona, xantochinol e gambogena; Triterpenóides.	UV-Vis, IV, HPLC/DAD/ESI-MS/MS, CG-EM, RMN ( <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C) e ESI/MS/MS	[75]
Própolis verde	-	Cerrado	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Artepillin C	CLAE e RMN de <sup>1</sup> H	[80]
Tipo 12**	-	-	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Ácidos ferúlico, cinâmico e cumárico, pinobanksina, kaempferol, isosakuranetina, crisina, acetina, kaempferida e artepillin C	CLAE-FR e RMN de <sup>1</sup> H	[55]
-	Minas Gerais	Cerrado	-	Derivados dos ácidos cinâmico e benzóico (fenilpropanóides), terpenos e derivados prenilados e não-prenilados do ácido cinâmico	CG-EM	[81]
Própolis verde	Minas Gerais	Cerrado	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Compostos prenilados e fenilpropanóides não-prenilados, terpenóides e outros constituintes	CG-EM	[71]
-	Minas Gerais	Cerrado	-	Ácidos aromáticos (derivados do ácido cinâmico, ácidos ferúlico e cafeíco).	CG-EM	[58]

Tabela 3. Composição química e origem vegetal dos diferentes tipos de própolis brasileira (continuação).

Tipo	Estado	Vegetação	Fonte botânica	Composição química	Técnica analítica	Referência
-	Minas Gerais	Cerrado	-	Derivados do ácido <i>p</i> -cumárico, flavonóides, um ácido fenólico prenilado, ácidos diterpênicos, uma lignana, ésteres do ácido <i>p</i> -cumárico e derivados do ácido cinâmico.	CLAE-FR, UV-Vis, IV, FAB-MS e RMN de <sup>13</sup> C e de <sup>1</sup> H	[82]
-	Minas Gerais	Cerrado	-	Derivados do ácido cinâmico, derivados do kaempferol, isosakuranetina, narigenina e crisina.	CLAE	[83]
-	Minas Gerais	Cerrado	-	Ácidos ferúlico, cumárico e 4-hidroxi-3,5-diprenil cinâmico (artepillin C), canferide, vários ésteres de ácidos graxos e compostos aromáticos, flavonóides: 5,7,4'-trimetoxiflavona, 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavanona, 5-hidroxi-3,4',7-trimetoxiflavona; terpenóides: $\alpha$ -pineno, $\beta$ -pineno e farnesol; tetradecano	CLAE-FR, UV-Vis, CG-EM	[76]
Própolis Verde	Minas Gerais	Cerrado	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Acetato de Bauerenil	EM-IE, IV, RMN de <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H	[46]
Própolis Verde	Minas Gerais	Cerrado	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Derivados do ácido cinâmico, flavonóides, ácido benzóico e alguns benzoatos, aromáticos não hidroxilados, ácidos alifáticos, ésteres, compostos prenilados, alcanos e terpenóides.	HPLC-APCI-MS e CG-EM.	[84]
Própolis Verde	Minas Gerais	Cerrado	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Derivados prenilados do ácido <i>p</i> -cumárico	CLAE, ESI-MS	[52]
Marrom	Paraná	Mata das araucárias (floresta subtropical)	-	Flavonóis: canferida, diidrocanferida e betuletol; os ácidos 2,2-dimetil-2H-1-benzopirano-6-propenóico, <i>p</i> -cumárico, cafeíco, 3-prenil-4-hidroxicinâmico, 3,4-diidroxi-5-prenilcinâmico, 4-hidroxi-3(E)-(4-hidroxi-3-metil-2-butenil)-5-prenilcinâmico, 3-prenil-4-diidrocinamoxi-cinâmico e dicafeoilquínico.	UV-VIS, ESI-MS	[85]

Tabela 3. Composição química e origem vegetal dos diferentes tipos de própolis brasileira (continuação).

Tipo	Estado	Vegetação	Fonte botânica	Composição química	Técnica analítica	Referência
Tipo 3**	PR, SC e RS	Mata das araucárias, campol e mata atlântica	<i>Populus alba</i>	Ésteres metílicos dos ácidos benzóico, palmítico, 10-octadecenóico, eicosanóico, 9,12-octadecadienóico, 9-octadecenóico; ácido murônico, crisina, pinobanksina, vanilina, pinocembrina, galangina, apigenina, kanferol e outros compostos	CLAE-FR e CG-EM	[49]
Tipo 1,2, 4 e 5**			-			
Tipo 3**	SC	Mata das araucárias	<i>Populus Nigra</i>	Flavonóides: pinobanksina, pinocembrina, acetato de 3-pinobanksina, crisina e galangina	CLAE-FR e UV-Vis	[5]
Tipo 12**	MG e SP	Cerrado	Espécies de <i>Baccharis</i> , <i>Eucalyptus</i> , <i>Myrocarpus</i> e <i>Araucaria</i>	Ácidos <i>p</i> -cumárico e ferúlico; Flavonóides: pinobanksina, kaempferida, isosakuranetina e traços de kaempferol.		
Tipo 6**	Bahia	Caatinga e mata atlântica	<i>Hyptis divaricata</i>	Flavonóides e fenóis não foram encontrados		
-	Paraná	Mata das araucárias	-	Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano, ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico e 2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2H-1-benzopirano	CLAE e RMN de <sup>13</sup> C	[86]

\* Possíveis fontes vegetais

\*\* Terminologia a partir de Park et al. (2000).

Fonte: Elaborada pela autora.

## 2.2 Métodos de extração da própolis

A preparação da própolis bruta, para a produção de extratos, começa pelo resfriamento da amostra de modo que possa ser moída em um pó fino. Esse processo de resfriamento é necessário porque a própolis apresenta uma característica resinosa, não permitindo a sua trituração [58, 87-91].

Após a pulverização da própolis, a amostra é pesada e dissolvida em solvente, geralmente álcoois como etanol e metanol (este último é utilizado na preparação de extratos para estudos de quantificação e identificação química), e deixado em contato por cerca de 24 h, em temperatura ambiente [58, 87-91]. Em seguida, o extrato é filtrado e o procedimento de extração é repetido várias vezes [92-95]. Depois da filtração do extrato, o mesmo é submetido a um resfriamento para a retirada das ceras contidas nas amostras e para garantir a recuperação completa dos compostos fenólicos. As ceras separadas da própolis contêm alcanos, alcenos, alcadienos, ácidos graxos, dentre outros compostos [11, 96], que são insolúveis a baixa temperatura (em torno de 5 °C).

Outro processo que é muito utilizado em pesquisas envolvendo a própolis é a centrifugação dos extratos filtrados para a separação dos compostos que ainda estejam em suspensão e das ceras presentes no extrato. Neste procedimento, os sobrenadantes podem ser utilizados diretamente para a análise, devido aos compostos insolúveis se depositarem no fundo do frasco após a centrifugação [5, 95, 97].

Alternativamente, a própolis pode ser dissolvida em solvente por agitação a 70 °C por 30 min [5]. Após a dissolução, a porção insolúvel é separada por filtração e o solvente é evaporado até a secura, sob pressão reduzida [87, 89, 98]. O resíduo seco obtido após a evaporação do solvente é então pesado e redissolvido num solvente específico para os devidos fins, seja para estudos científicos ou para comercialização dos extratos de própolis.

Um passo crítico no processo de análise é o tipo de extração que será utilizada nas amostras de própolis. O solvente mais utilizado é o etanol contendo diferentes porcentagens de água, especialmente em concentrações de 70% v/v [58, 88, 89, 94, 99] e 80% v/v [5], embora outras concentrações também tenham sido utilizadas, tais como 95% v/v [97] e etanol absoluto [100, 101].

Solventes polares como o etanol têm sido muito utilizados em estudos para a extração dos compostos fenólicos (polares), pois a própolis contém até 30% m/m de ceras, que são insolúveis em solventes polares. Solventes como metanol [87, 95, 102, 103], hexano e acetona [104], clorofórmio [105] e óleo vegetal [85] também são utilizados em diversos tipos de extrações de compostos presentes na própolis.

A água também tem sido usada em certas ocasiões [99, 106], no entanto, é importante notar que, em geral, a água dissolve apenas uma pequena parte dos constituintes da própolis, cerca de 10% da sua massa, enquanto que o etanol 70% e 80% (v/v) podem dissolver de 50 a 70%, dependendo da quantidade de ceras.

Buriol e colaboradores compararam a composição química obtida através da extração com óleo vegetal e com vários teores de etanol. Os autores observaram que a extração com óleo vegetal apresentou rendimento inferior e menores teores de substâncias fenólicas comparado às soluções hidroalcoólicas, mesmo utilizando períodos de extração superiores [107].

Extratos de própolis podem ser preparados por maceração ou em alguns casos (alguns procedimentos com metanol ou etanol a 95% v/v) por extração Soxhlet. Extração assistida no ultrassom fornece excelentes resultados, especialmente por acelerar o processo. Extração assistida por radiação micro-ondas é menos eficiente, especialmente no caso de amostras ricas em compostos fenólicos. Este tratamento pode levar a uma diminuição do teor de compostos fenólicos devido aos processos de oxidação [108].

### **2.3 Metodologias analíticas empregadas na análise de própolis**

Os métodos analíticos aplicados à pesquisas sobre a própolis têm evoluído ao longo dos últimos anos, impulsionados pela necessidade de identificar os componentes responsáveis por suas atividades farmacológicas, bem como para garantir a qualidade da mesma.

Diferentes técnicas são adequadas para identificar os componentes químicos da própolis, sendo que técnicas combinadas são as mais utilizadas, entre elas estão a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD), a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM), a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (CL-EM-EM), a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-

EM), dentre outras. A natureza relativamente polar dos constituintes da própolis, combinada com o advento de técnicas de ionização suave compatíveis com cromatografia líquida, tornaram a CLAE-DAD e a CL-EM as técnicas mais empregadas para análise de componentes da própolis. No entanto, a CG-EM tem tido, recentemente, um notável retorno principalmente para identificação e quantificação de compostos voláteis presentes na própolis, como demonstrado em vários artigos [30, 89, 109].

A separação e a quantificação de todos os componentes através das cromatografias líquida e gasosa podem fornecer resultados perfeitamente válidos, mas são metodologias difíceis de executar, pois são demoradas e envolvem um alto custo. Além disso, como é evidenciado pela literatura (especialmente a partir de fontes que tratam da atividade antimicrobiana), não é possível atribuir uma dada atividade farmacológica a somente um componente presente na própolis [110, 111].

Atualmente, nenhum componente da própolis possui atividade antibacteriana maior que o extrato total [110, 112]. Parece, portanto, que a quantificação dos compostos ativos em grupos que têm a mesma estrutura química ou estrutura semelhante correlaciona melhor com a atividade farmacológica e é mais informativa do que a quantificação de componentes individuais.

Há uma demanda crescente de metodologias analíticas altamente sensíveis e seletivas para a determinação de polifenóis [113]. Apesar de um grande número de investigações, a separação e quantificação de diferentes polifenóis continuam difíceis, especialmente a determinação simultânea de polifenóis de diferentes grupos [114].

Uma série de métodos espectrofotométricos foi desenvolvida para a quantificação de compostos fenólicos de diferentes grupos estruturais. Métodos espectrofotométricos fornecem informações qualitativas e quantitativas úteis, sendo a espectroscopia UV-VIS a principal técnica utilizada para a quantificação de diferentes classes de polifenóis devido à sua simplicidade e baixo custo. A principal desvantagem dos ensaios utilizando a espectrofotometria é que eles fornecem somente uma estimativa do conteúdo de fenóis totais [115].

Métodos espectrofotométricos são considerados rápidos e úteis para as análises de rotina da própolis. Os métodos são destinados à determinação de fenóis e flavonóides totais [112, 116], ou flavanonas/diidroflavonóis e flavonas/flavonóis totais [117]. Quando aplicados como única abordagem analítica é evidente a

discrepância entre os dados quantitativos espectrofotométricos e os de HPLC, quando o(s) composto(s) de referência escolhido(s) para a calibração não representa(m) corretamente todos os grupos de compostos fenólicos presentes na amostra, proporcionando assim resultados inexatos [112, 116].

Em se tratando da utilização da espectrofotometria na determinação de diferentes grupos de compostos fenólicos, Popova e colaboradores relataram que a quantificação de compostos ativos dentro dos grupos com as mesmas estruturas ou similares, se correlaciona melhor com a atividade farmacológica e é mais informativa do que a quantificação de componentes individuais. Os autores assumem que esta é uma abordagem correta para a caracterização e padronização de preparações à base de própolis [94].

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da normativa nº 3 de 2001, estabelece alguns parâmetros físico-químicos (Tabela 4) que devem ser avaliados para garantir a qualidade da própolis comercializada e de seu extrato. Além dos parâmetros físico-químicos, características sensoriais como aroma, cor, sabor, consistência e granulometria, também é necessária a análise qualitativa de espectros de absorção de radiação UV-Visível na região entre 200 e 400 nm, para avaliação das bandas das principais classes de flavonóides.

Os ensaios para determinação dos teores de extrato seco, cinzas, ceras, perda por dessecação, massa mecânica (resíduo insolúvel em metanol) e solubilidade em etanol são baseados em metodologias gravimétricas. Já para a determinação dos teores de fenóis e flavonóides totais são utilizados metodologias espectrofotométricas. Para a determinação da atividade de oxidação utiliza-se, geralmente, permanganato de potássio como agente oxidante e o tempo de reação é medido com o auxílio de um cronômetro. A maioria dos testes listados acima são realizados com base nas Farmacopeias Brasileira [118, 119] e Europeia [120], AOAC International [121] e World Health Organization [122], a partir de metodologias propostas para drogas vegetais e alimentos de origem animal.

Tabela 4. Parâmetros físico-químicos exigidos pelo MAPA para comercialização da própolis e seu extrato.

Parâmetros	Própolis	Extrato Alcoólico
Perda por dessecação (% m/m)	máximo de 8	-
Extrato seco (% m/v)	-	mínimo de 11
Cinzas (% m/m)	máximo de 5	-
Cera (% m/m)	máximo de 25	máximo de 1 (em relação ao extrato seco)
Compostos Fenólicos (% m/m)	mínimo 5	mínimo 0,50
Flavonóides (% m/m)	mínimo de 0,5	mínimo 0,25
Atividade de oxidação (seg)	máximo de 22	máximo de 22
Massa mecânica (% m/m)	máximo 40	-
Solubilidade em etanol (% m/m)	mínimo de 35	-
Teor alcoólico (°GL v/v);	-	máximo de 70
Metanol (mg/L)	-	máximo 0,40

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2001.

## 2.4 Métodos quimiométricos

Um dos principais objetivos da quimiometria é extrair o máximo de informação de dados químicos, a partir de métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar condições ótimas de medidas e experimentos. A quimiometria pode ser dividida em algumas áreas: processamento de sinais analíticos, planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões e classificação de dados, calibração multivariada, monitoramento e modelagem de processos multivariados, métodos de inteligência artificial, dentre outras [123].

Na análise exploratória de dados se avalia, interpreta e extrai o máximo de informação de dados analíticos de sistemas em que não se conhece a relação entre as amostras, variáveis e outros tipos de padrões. Os métodos de classificação podem ser designados como métodos não supervisionados e supervisionados [123].

Nos métodos não supervisionados não existe supervisão, já que não se conhece *a priori* a que classe(s) pertence(m) os objetos ou pelo menos essa informação não é usada na construção do modelo. Como exemplo de métodos de classificação não supervisionados pode-se citar a Análise por Componentes Principais (PCA – do inglês, *Principal Component Analysis*), Análise de Fatores e a

Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA – do inglês, *Hierarchical Cluster Analysis*) [123].

Nos métodos supervisionados a informação sobre a que classes pertencem os objetos já está disponível e é usada na construção do modelo. Como exemplos de métodos de classificação supervisionados existem os métodos do K-ésimo vizinho mais próximo (KNN – do inglês, *K-Nearest Neighbor*), Análise Discriminante com Método dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA – do inglês, *Partial Least Squares Discriminant Analysis*), Análise Discriminante Linear (LDA – do inglês, *Linear Discriminant Analysis*) e SIMCA (do inglês, *Soft Independent Modeling of Class Analogies*).

A base fundamental da maioria dos métodos modernos para tratamento de dados multivariados é a PCA, que visa justamente a redução da dimensão dos dados para formar novas variáveis [124]. Na PCA uma dada matriz de dados é construída com o objetivo de representar as variações presentes em muitas variáveis, através de um número menor de “fatores”. Neste sentido, constrói-se um novo sistema de eixos para representar as amostras, transformando grandes matrizes de dados em matrizes menores, podendo ser facilmente examinadas, interpretadas e visualizadas em poucas dimensões [125].

As componentes principais descrevem o máximo da variância (informação) dos dados sendo calculadas em ordem decrescente de importância. O número máximo de componentes principais obtidos (CPs) é igual ao número de vetores de dados utilizados (posto da matriz  $\mathbf{X}$  de dados independentes), sendo que, nem todas as CPs possuem informações úteis. Normalmente, as últimas CPs modelam ruído inerente aos dados, sendo assim, a eliminação das CPs frequentemente aumenta a relação sinal/ruído [123].

A detecção de amostras anômalas (*outliers*) é tão importante quanto a determinação do número de componentes principais que serão empregadas no modelo. Ao verificar a qualidade do conjunto de dados utilizados na construção do modelo, deve-se assegurar que as amostras formam um conjunto homogêneo, removendo-se aquelas amostras que são solitárias. Para detecção de *outliers*, usam-se duas grandezas complementares: *leverage* e resíduos de *Student*.

Uma vez validado e otimizado, o modelo está pronto, isto é, o número de componentes principais está definido e as amostras anômalas foram detectadas e excluídas. As componentes principais descrevem as interações multivariadas entre

as variáveis medidas e revelam tendências subjacentes aos dados, onde as similaridades e diferenças entre objetos ou variáveis podem ser vistas através de gráficos, em que os escores ou pesos das CPs são plotados uns contra os outros.

A análise discriminante com método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) é uma técnica que visa encontrar variáveis latentes no espaço multivariado que discriminem classes no conjunto de calibração usando um modelo de mínimos quadrados parciais (PLS). Nessa técnica é calculado um limiar, também chamado de *threshold*, onde o número de falsos positivos/negativos é minimizado para a predição de novos dados [126].

O bloco **Y** em um modelo de PLS-DA indica a qual classe uma amostra pertence. No caso de duas classes, por exemplo, os valores do bloco **Y** podem assumir os valores 0 ou 1. O bloco **X** corresponde à matriz de dados multivariados, como por exemplo, espectros de absorção na região do UV-Vis das amostras analisadas.

O PLS foi originalmente concebido para determinar problemas de regressão, mas tem encontrado aplicação na classificação e discriminação estatística como na PLS-DA [127]. A PLS-DA é muitas vezes comparada com a PCA em termos de sua capacidade para classificar dados ou para discriminação entre diferentes grupos. A PCA identifica a variabilidade bruta e não diferencia variações dentro dos grupos e entre os grupos. Quando a variação entre o grupo domina em relação à variação dentro do grupo, a maior variação encontrada pela PCA será consistente com uma separação entre o grupo. No entanto, se a variação dentro do grupo é maior do que a variação entre os grupos, então a PCA não é mais eficaz. Nesses casos, a PLS-DA é uma alternativa preferida à PCA por apresentar um melhor desempenho [127].

O método de calibração multivariada mais utilizado a partir de dados de primeira ordem é o método dos mínimos quadrados parciais (PLS), que é um método relativamente moderno, desenvolvido e popularizado na ciência analítica por Wold [123]. O PLS consegue decompor a matriz **X**, realizada pela PCA, de forma independente do vetor **y**. O PLS decompõe os dados das variáveis independentes (**X**) juntamente com os dados das variáveis dependentes (**y**) em uma soma de produtos de dois vetores (os escores e os pesos).

Sabe-se que é possível representar uma matriz de dados, sem a perda da informação estatística útil, pela sua matriz de escores, com a vantagem de não haver correlação entre as variáveis. Isto é exatamente o que o PLS faz, ou seja,

tanto a matriz de variáveis independentes (**X**) como o vetor das variáveis dependentes (**y**) são representados pelos seus escores, utilizando a redução de variáveis feita pela análise de componentes principais.

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\mathbf{y} = \mathbf{TQ}^T + \mathbf{F} \quad (\text{Eq. 2})$$

onde os elementos das matrizes de **T** são os escores de **X** e **y**, e os elementos **P** e **Q** são os pesos. As matrizes **E** e **F** correspondem aos erros, ou seja, o quanto o modelo não “consegue” explicar. A Figura 6 mostra como ocorre a decomposição dos dados dos blocos de **X** e **y**.

$$\begin{array}{c} \begin{array}{|c|} \hline \mathbf{X} \\ \hline \end{array} \begin{array}{l} p \\ n \end{array} = \begin{array}{|c|} \hline \mathbf{T} \\ \hline \end{array} \begin{array}{l} h \\ n \end{array} \begin{array}{|c|} \hline \mathbf{P} \\ \hline \end{array} \begin{array}{l} p \\ h \end{array} + \begin{array}{|c|} \hline \mathbf{E} \\ \hline \end{array} \begin{array}{l} p \\ n \end{array} \\ \\ \begin{array}{|c|} \hline \mathbf{y} \\ \hline \end{array} \begin{array}{l} m \\ n \end{array} = \begin{array}{|c|} \hline \mathbf{T} \\ \hline \end{array} \begin{array}{l} h \\ n \end{array} \begin{array}{|c|} \hline \mathbf{Q} \\ \hline \end{array} \begin{array}{l} m \\ h \end{array} + \begin{array}{|c|} \hline \mathbf{F} \\ \hline \end{array} \begin{array}{l} m \\ n \end{array} \end{array}$$

Figura 6. Decomposição dos blocos de dados de **X** e **y**.

**X** = espectros, *n* amostras e *p* variáveis, **T** = escores, **P** = pesos e **E** = resíduos

**y** = concentrações, *n* amostras e *m* substâncias, **Q** = pesos e **F** = resíduos

*h* = variáveis latentes

Paralela à decomposição de **X** e **y**, é calculada uma matriz de pesos **R**, de forma que quando multiplicada pela matriz de dados **X** apresenta como resultado os escores **T**. Sua construção objetiva principalmente em maximizar a covariância entre **X** e **y**.

$$\mathbf{T} = \mathbf{XR} \quad (\text{Eq. 3})$$

Dessa forma, uma estimativa do vetor **y** poder ser obtida como descrito na Equação 2. Para um novo conjunto de amostras de previsão, podemos escrever:

$$\hat{\mathbf{y}} = \mathbf{T}_{\text{prev}}\mathbf{Q} = \mathbf{X}_{\text{prev}}\mathbf{R}\mathbf{Q} = \mathbf{X}_{\text{prev}}\mathbf{R}\mathbf{T}^T\mathbf{y}_{\text{cal}} \quad (\text{Eq. 4})$$

onde  $\mathbf{y}_{\text{cal}}$  são as concentrações das amostras utilizadas na etapa de calibração.

Dessa forma o vetor de coeficientes de regressão  $\hat{\mathbf{b}}$  pode ser estimado por:

$$\hat{\mathbf{b}} = \mathbf{R}\mathbf{T}^T\mathbf{y}_{\text{cal}} \quad (\text{Eq. 5})$$

e o modelo de regressão representado por:

$$\hat{\mathbf{y}}_{\text{prev}} = \mathbf{X}_{\text{prev}}\hat{\mathbf{b}} + \mathbf{e} \quad (\text{Eq. 6})$$

onde  $\hat{\mathbf{y}}$  é o vetor de concentrações estimado através do modelo PLS e  $\mathbf{e}$  são os erros de previsão.

Para que se encontre uma melhor correlação possível entre os escores de  $\mathbf{X}$  e de  $\mathbf{y}$ , torna-se importante conciliar a informação desses dois blocos simultaneamente. No PLS isto é feito por uma leve rotação das componentes principais, com conseqüente mudança nos valores dos escores. Devido ao fato de ocorrer essa rotação, o termo componente principal já não é mais utilizado, e, no lugar deste, o termo designado é o de variáveis latentes.

Antes da aplicação do modelo construído, o mesmo deve ser validado com o objetivo de testar a sua capacidade preditiva; sem essa etapa não há sentido em prosseguir. Durante a etapa de validação, dois fatores devem ser considerados: (1) o número de variáveis latentes a ser utilizado no modelo; (2) detecção de *outliers* (amostras anômalas).

Para a determinação das variáveis latentes que serão empregadas na modelagem, o método de Validação Cruzada (CV – do inglês, *Cross Validation*) é o mais utilizado e consiste na avaliação da magnitude dos erros de previsão de um dado modelo de calibração. Para cada sistema em estudo, o número mais adequado de variáveis latentes será o correspondente ao menor valor do erro médio quadrático da validação cruzada (RMSECV – do inglês, *Root Mean Square Error Cross Validation*):

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n-1} (\hat{y}_i - y_i)^2}{n}} \quad (\text{Eq. 7})$$

onde  $\hat{y}_i$  e  $y_i$  são, respectivamente, os valores previstos e o de referência para a propriedade de interesse. Para a detecção de amostras anômalas, utilizam-se os resíduos e os valores de *leverage*.

Para avaliar a eficiência dos modelos de calibração, validação e previsão, utiliza-se o erro médio quadrático (RMSE – do inglês, *Root Mean Square Error*) e o erro relativo ( $E_r$ ) em cada uma destas etapas. Esses valores expressam a exatidão do modelo, ou seja, a proximidade entre o valor calculado pelo modelo ( $\mathbf{y}_{prev}$ ) e o valor verdadeiro ou obtido por um método de referência ( $\mathbf{y}_{real}$ ). O erro relativo pode ser calculado através da expressão:

$$E_r = \sqrt{\frac{(y_{real} - y_{prev})^2}{(y_{real})^2}} \times 100 \quad (\text{Eq. 8})$$

Para avaliar a exatidão do conjunto de calibração, utiliza-se o erro médio quadrático de calibração (RMSEC – do inglês, *Root Mean Square Error of Calibration*):

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum (\hat{y}_p - y_r)^2}{n - \nu}} \quad (\text{Eq. 9})$$

onde  $n$  é o número de amostras e  $\nu$  é o número de graus de liberdade, que é igual ao número de variáveis latentes + 1, para dados centrados na média. Para avaliar a exatidão da validação cruzada utiliza-se o RMSECV, como descrito anteriormente. Para o conjunto de previsão, utiliza-se o erro médio quadrático de previsão (RMSEP – do inglês, *Root Mean Square Error of Prediction*):

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum (\hat{y}_p - y_r)^2}{n}} \quad (\text{Eq. 10})$$

**CAPÍTULO 3*****Discriminação de Extratos Alcoólicos Comerciais de Própolis***

---

### 3 DISCRIMINAÇÃO DE EXTRATOS ALCOÓLICOS COMERCIAIS DE PRÓPOLIS

Em função da variação da composição química e das propriedades farmacológicas apresentadas por diversos tipos de própolis brasileira, um alto valor agregado tem sido estabelecido no comércio nacional e, principalmente, no comércio internacional, no qual cada vez mais o produto apícola brasileiro vem ganhando espaço.

Uma prática comum existente no mercado apícola é a compra da própolis “*in natura*” de diferentes cidades e regiões produtoras por entrepostos, inclusive em leilões apícolas, sendo realizado pelos produtores apenas a extração de misturas de própolis de várias localidades e o seu envaze. Desse modo, nenhuma informação da origem geográfica pode ser utilizada na produção dos extratos, dificultando a identificação da região produtora.

Os extratos de própolis verde possuem maior valor comercial podendo, com isso, sofrer alterações. Adicionalmente, extratos de própolis comum podem ser comercializados como verde. Nesse sentido, o objetivo deste estudo baseia-se na discriminação de extratos alcoólicos comerciais de própolis de diferentes tipos e regiões do país, através de análises de rotina de processos de controle de qualidade de extratos, utilizando a espectroscopia UV-Vis combinada com metodologias quimiométricas de análise exploratória, para controle rápido e eficiente da qualidade destes produtos.

#### 3.1 Materiais e métodos

##### 3.1.1 Amostras e reagentes

Para a discriminação de extratos alcoólicos comerciais de própolis, 62 amostras foram analisadas, sendo 49 amostras de própolis comum e 13 amostras de própolis verde. Destas amostras, 47 são oriundas da região sudeste do país [Estados de Minas Gerais (MG), São Paulo (SP) e Rio de Janeiro (RJ)] e 15 da região sul [Estados do Paraná (PR), Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS)]. Estas informações foram baseadas no rótulo do extrato, sendo que os

produtos que não tiveram nenhuma denominação referente ao tipo de própolis utilizado nas preparações foram considerados como própolis do tipo comum.

A Figura 7 apresenta a distribuição dessas amostras pelo país, correlacionando-as com a respectiva vegetação da região de fabricação e, possivelmente, da região de origem da própolis utilizada na fabricação dos extratos. Na obtenção dos espectros de absorção molecular na região do UV-Vis, 5  $\mu$ L do extrato de própolis foi diluído para um volume final de 25 mL, com etanol 95% (v/v) (Synth). Tal diluição foi necessária para que a intensidade das bandas dos espectros de absorção não fosse elevada ao ponto de provocar distorções.



Figura 7. Localização geográfica dos envasadores dos extratos alcoólicos comerciais de própolis.

### 3.1.2 Instrumentação

Espectros de absorção molecular na região do UV-Vis foram obtidos em triplicata, no espectrofotômetro da marca Hewlet-Packard, modelo 8451A, com cubetas de quartzo com caminho óptico de 0,5 cm. Os espectros de absorção de cada amostra foram obtidos realizando uma varredura do comprimento de onda de 190 a 450 nm, com incrementos de 2 nm.

### 3.1.3 Análise quimiométrica

Para a realização da análise por componentes principais (PCA) e da análise discriminante com o método dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA), foram utilizados os softwares Matlab, versão 7.9 (The MathWorks, Natick, USA) e o PLS Toolbox, versão 5.2 (Eigenvector Technologies, Manson, USA). Os espectros na região UV-Vis das amostras de extrato de própolis estudadas tiveram a linha base corrigida através do algoritmo *baseline* do PLS Toolbox e a faixa de comprimentos de onda utilizada foi de 190 a 450 nm.

Na PCA e PLS-DA os dados foram centrados na média, sendo que, nesta última, uma matriz **Y** contendo a informação da classe pertencente de cada amostra foi construída atribuindo-se o número 0 a não pertencente à classe e o número 1 indicando que aquela amostra pertence à classe em questão. O número de variáveis latentes (para o caso da PLS-DA) foi escolhido baseado no menor valor encontrado para o RMSECV (*root mean square error cross validation*), através da validação cruzada *contiguous block*. A separação dos conjuntos de dados para calibração e validação do modelo foi realizada com o auxílio da rotina *kenston*, baseada no algoritmo de Kennard-Stone [128]. Na verificação de possíveis *outliers*, foram utilizados os valores dos resíduos e de  $T^2$  de Hotelling, sendo que as amostras consideradas anômalas foram retiradas do modelo.

## 3.2 Resultados e Discussão

De acordo com a legislação brasileira, espectros de absorção da radiação UV-Vis de extratos de própolis comerciais devem apresentar bandas características

das principais classes de flavonóides, na região de 200 a 400 nm. Segundo Markham [129], um típico espectro de flavonóides deve conter duas bandas de absorção na região do UV-Vis, com seus máximos nas regiões de 300 a 550 nm e 240 a 285 nm.

Os espectros de absorção na região do UV-Vis, obtidos para os extratos estudados neste trabalho, são apresentados na Figura 8. Como pode ser observado, todos os espectros mostraram duas bandas características nas regiões de comprimentos de onda indicados e que nenhuma diferença visual entre o perfil dos espectros das amostras das regiões sul e sudeste foi observada. Um cuidado especial foi tomado para que as amostras analisadas não apresentassem altos valores de absorbância, com o intuito de não criar distorções nos espectros que pudessem consequentemente afetar os resultados da análise quimiométrica.

Como mostrado na Figura 8, os espectros apresentaram duas bandas características para a maioria das amostras estudadas. Segundo a literatura, as transições eletrônicas envolvidas no benzeno (grupo químico presente nos fenóis e flavonóides da própolis) são basicamente do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$ . Estas transições fornecem bandas de absorção que possuem comprimento de onda máximo em torno de 184 e 202 nm (banda primária) e 255 nm (banda secundária). Em relação às bandas primárias, a banda em 184 nm não é observada em condições experimentais normais, porque absorções nesse comprimento de onda estão na região do ultravioleta de vácuo, região além do alcance da maioria dos instrumentos comerciais.

A substituição no anel benzênico por grupos hidroxilas (grupos substituintes comumente encontrados nos compostos fenólicos) pode causar deslocamentos batocrômico e hipsocrômico em suas bandas de absorção primária e secundária [130] dificultando, dessa forma, a predição do significado de cada banda em um espectro de UV-Vis, em amostras que possuam um número elevado de substâncias distintas como a própolis. Substituintes com elétrons  $n$  (não ligantes) também podem causar deslocamento nas bandas para maiores comprimentos de onda, e quanto mais disponíveis estes elétrons estiverem para interação com o sistema  $\pi$  do anel aromático, maiores serão os deslocamentos. Em hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, as bandas primárias e secundárias estão deslocadas para maiores comprimentos de onda. Um exemplo para este fato é a banda primária em 184 nm do benzeno que se desloca para 220 nm em certas substâncias polinucleares [130].

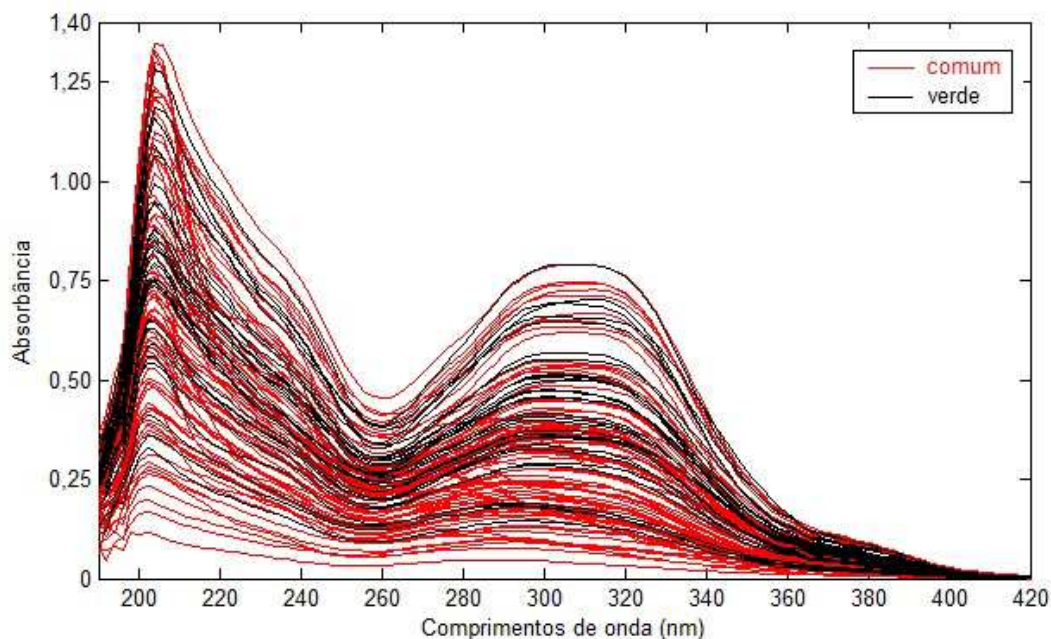


Figura 8. Espectros de absorção na região UV-Vis de extratos alcoólicos de própolis comerciais. (—) própolis verde; (—) própolis comum.

A própolis possui em sua composição química vários ácidos fenólicos e flavonóides que possuem como substituintes do anel benzênico grupos hidroxila, metoxila e outros substituintes com elétrons não ligantes, substâncias polinucleares e compostos com ligações duplas conjugadas. Todos esses fatores causam um deslocamento batocrômico para maiores comprimentos de onda das bandas no espectro de UV-Vis das amostras, como pode ser visualizado na Figura 8, na qual é possível observar um comprimento de onda em comum para quase todas as amostras próximo de 210 e 230 nm, o que pode ser explicado pelo deslocamento batocrômico para o comprimento de onda de 202 nm do benzeno em substâncias polinucleares. Outro comprimento de onda em comum a quase todas as amostras está próximo de 310 nm, que pode corresponder ao deslocamento da banda de 255 nm para o benzeno. Os comprimentos de onda próximos a 270 nm podem ser relativos às duplas conjugadas presentes nas estruturas das própolis, estruturas estas que podem não estar presentes em todas as amostras.

Inicialmente, visando uma análise exploratória do conjunto de dados, a análise por componentes principais foi realizada objetivando verificar uma possível separação entre amostras de diferentes tipos de própolis (comum e verde), utilizando os espectros apresentados na Figura 8. Os dados foram centrados na

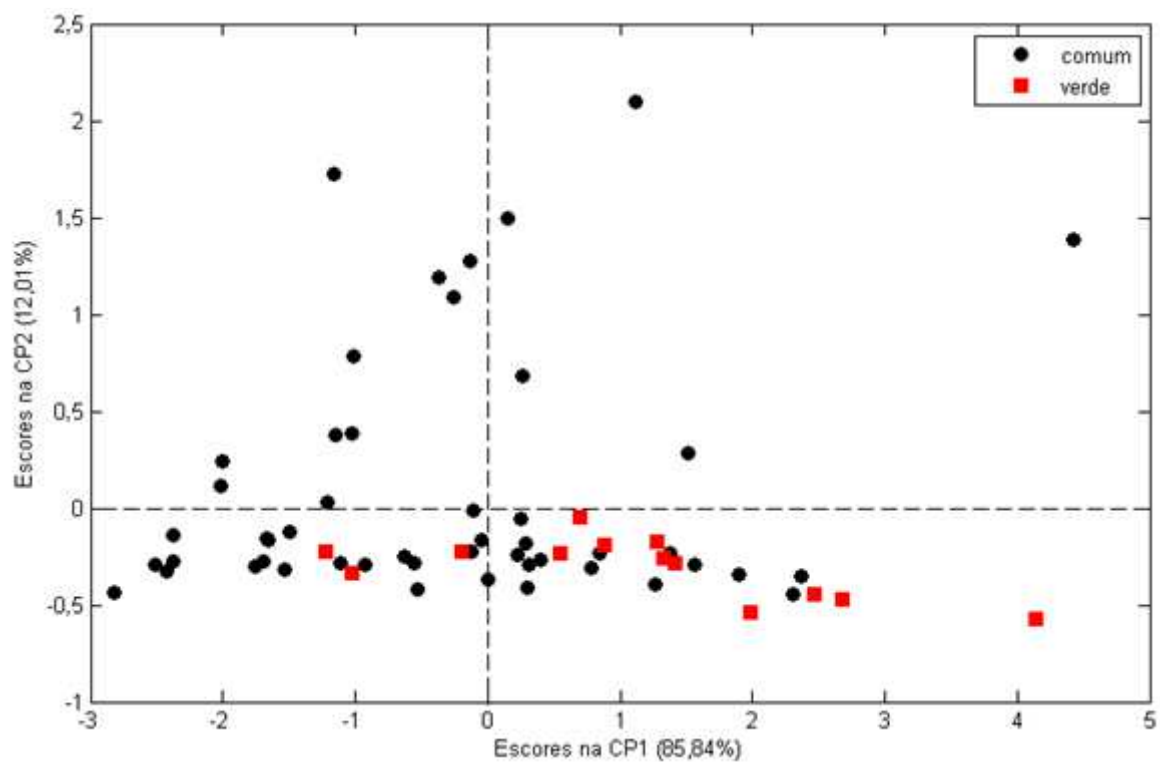
média e três componentes principais foram suficientes para a construção do modelo PCA, por juntas explicarem 99,3% da variância dos dados.

Como pode ser visto na Figura 9(a), não houve separação entre os tipos de própolis comum e verde, entretanto, pode-se observar uma separação entre as regiões produtoras (Figura 9(b)), indicando um agrupamento das amostras da região sul na parte positiva dos escores da segunda componente principal e um agrupamento das amostras da região sudeste na parte negativa dos escores desta componente. A segunda componente principal foi a responsável pela separação das duas regiões.

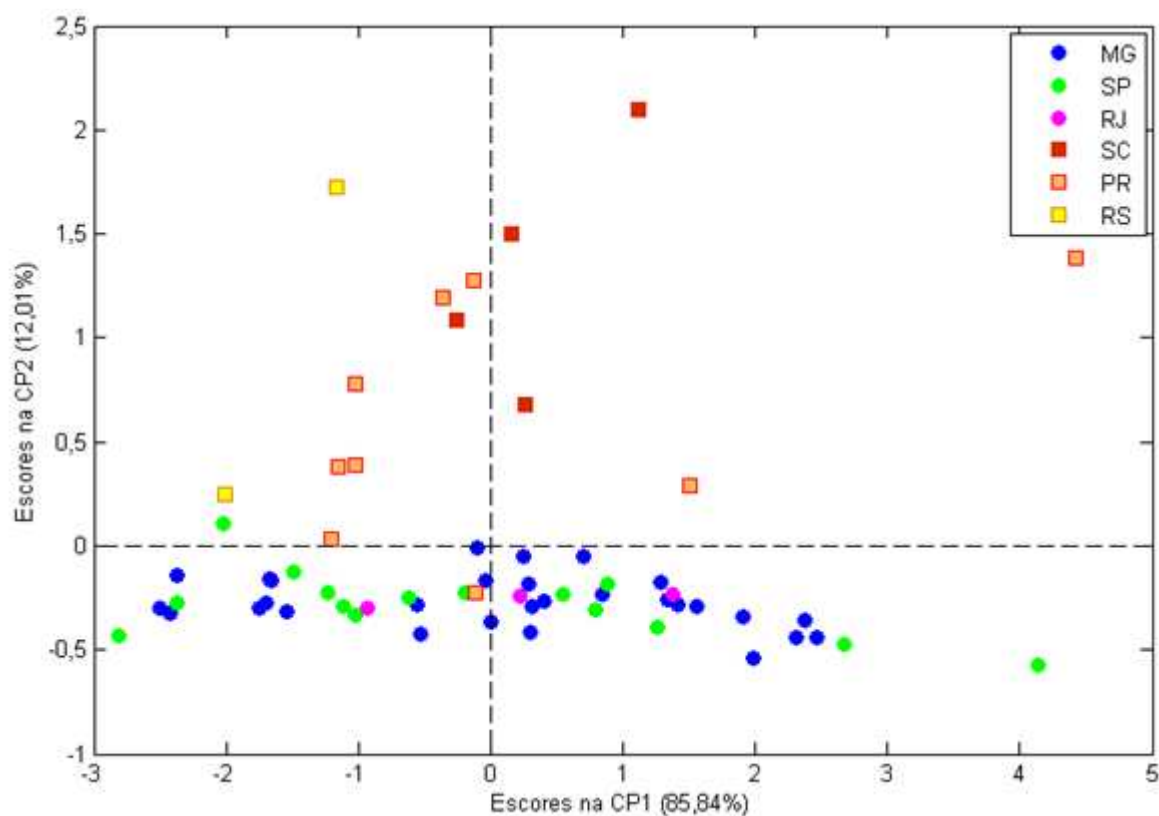
Analisando o gráfico dos pesos das componentes principais que apresentaram maior variância explicada, onde a influência de cada variável (no nosso caso, comprimentos de onda) na separação das amostras pelo modelo é demonstrada, pode-se observar que os pesos na primeira componente principal (CP1) assemelham-se ao espectro de absorção UV-Vis (Figura 10). Observando os pesos na CP2, verifica-se que os comprimentos de onda em torno de 210 nm (banda primária do benzeno) e 320 nm (banda produzida pelo efeito batocrômico) são os responsáveis pela separação dos dois grupos de amostras na CP2.

Desse modo, um modelo supervisionado PLS-DA foi construído com o objetivo de discriminar os extratos de própolis das regiões sul e sudeste do Brasil. O PLS-DA é frequentemente comparado com a PCA em termos de sua capacidade para classificar dados ou para discriminação entre diferentes grupos. A PCA identifica a variabilidade bruta e não diferencia variações dentro dos grupos e entre os grupos. Quando a variação entre os grupos domina em relação à variação dentro do grupo, a maior variação encontrada pela PCA será consistente com uma separação entre os grupos. No entanto, se a variação dentro do grupo é maior do que a variação entre os grupos, a PLS-DA é a alternativa preferida por apresentar melhor desempenho [127].

Uma matriz contendo a informação da classe pertencente de cada amostra (primeira classe: região sudeste; segunda classe: região sul) foi construída atribuindo-se o número 0 a não pertencente à classe e o número 1 indicando que aquela amostra pertence à classe em questão. Por exemplo, para uma amostra pertencente à segunda classe, será assimilada na matriz  $\mathbf{Y}$  como  $\mathbf{Y} = \{0 \ 1\}$  e uma amostra que pertença à primeira classe será assimilada como  $\mathbf{Y} = \{1 \ 0\}$ .



(a)



(b)

Figura 9. Escores do modelo PCA para extratos alcoólicos de própolis. (a) Tipos de própolis comum e verde e (b) local de envaze do extrato alcoólico.

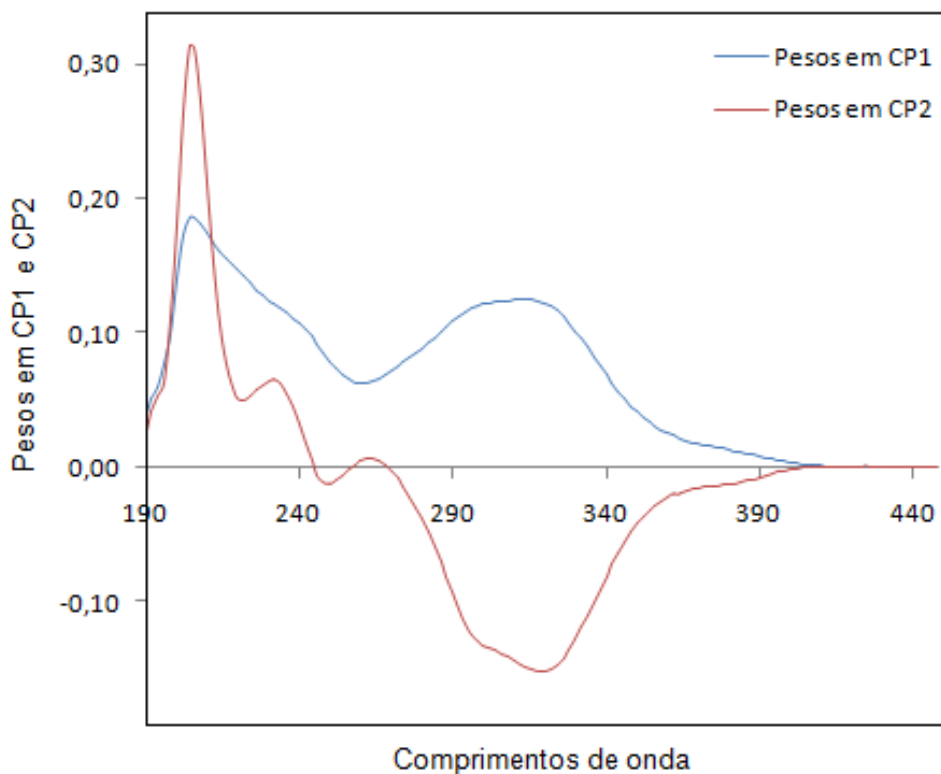


Figura 10. Gráfico dos pesos nas CP1 e CP2 para espectros de absorção na região do UV-Vis de extratos de própolis.

O modelo PLS-DA foi validado usando duas metodologias complementares: (1) validação estatística usando validação cruzada *contiguous block* e (2) validação externa que é utilizada para o estudo dos efeitos da introdução de novas fontes de variação nos dados. Um total de 40 amostras foi utilizado na calibração do modelo PLS-DA e 22 amostras foram utilizadas na validação. Os dados foram centrados na média e o número de variáveis latentes foi escolhido baseado no menor valor para RMSECV. Como pode ser observado na Figura 11, quatro variáveis latentes foram escolhidas por apresentarem baixo valor para RMSECV e também baixos valores de erros de classificação nas etapas de calibração e validação cruzada, obtendo-se uma variância acumulada de 99,6% em **X** e 78,5% em **Y**. A Tabela 5 apresenta a variância acumulada para as cinco primeiras variáveis latentes.

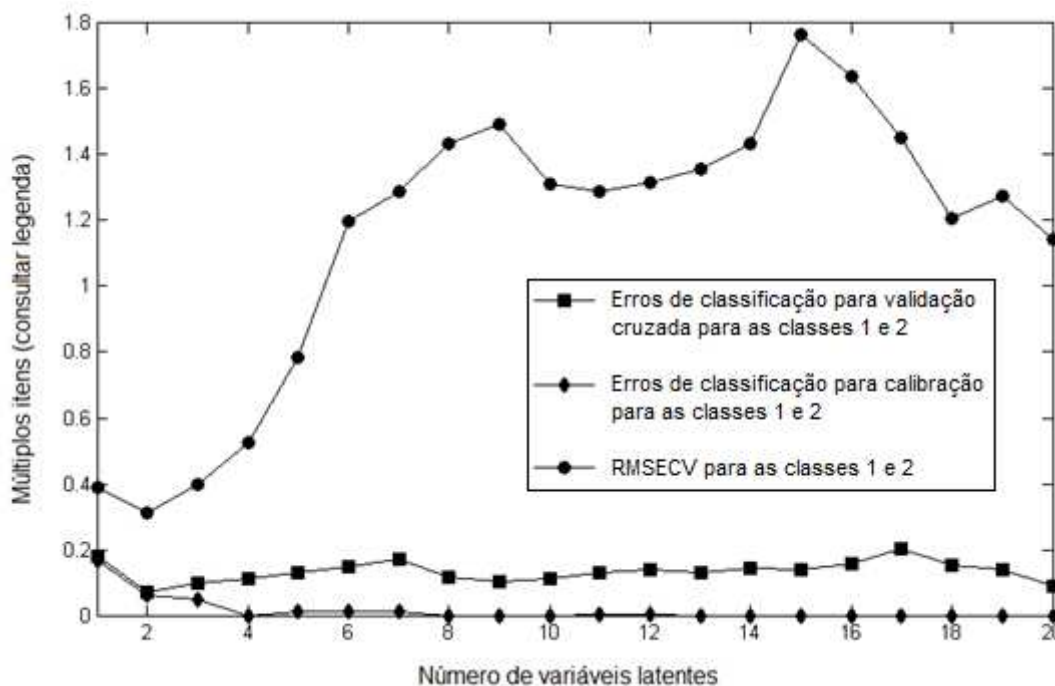


Figura 11. Erros de classificação na calibração e validação cruzada, e RMSECV para  $n$  variáveis latentes.

Tabela 5. Porcentagens de variância explicada pelo modelo PLS-DA.

Variável latente (VL)	Bloco X		Bloco Y	
	VL	Variância acumulada	VL	Variância acumulada
1	60,48	60,48	36,47	36,47
2	36,94	97,42	26,41	62,88
3	1,98	99,40	3,04	65,92
4	0,16	99,56	12,61	78,53
5	0,12	99,67	1,13	79,66

A sensibilidade do modelo PLS-DA, que corresponde ao número de amostras previstas como sendo da classe, dividido pelo número de amostras presentes de fato na classe, e a especificidade do modelo, que corresponde ao número de amostras previstas como não sendo da classe, dividido pelo número real de amostras que não são da classe, foram avaliadas em cada uma das etapas de construção e validação do modelo PLS-DA. Como pode ser observado na Tabela 6,

o modelo PLS-DA apresentou valores próximos ou iguais a 1 para a sensibilidade e especificidade, para os extratos das duas classes estudadas, com acertos de 100% na previsão dos extratos teste das classes 1 e 2, referentes às regiões sudeste e sul, respectivamente.

Tabela 6. Sensibilidade e especificidade do modelo PLS-DA.

Parâmetro	Classe 1	Classe 2
Sensibilidade (calibração)	1,000	1,000
Especificidade (calibração)	1,000	1,000
Sensibilidade (validação cruzada)	1,000	0,780
Especificidade (validação cruzada)	0,780	1,000
Sensibilidade (previsão)	1,000	1,000
Especificidade (previsão)	1,000	1,000

A Figura 12 apresenta as amostras previstas nas classes 1 e 2 pelo modelo PLS-DA, com suas barras de erros, calculadas a partir de cinco replicatas independentes para cada amostra, com um nível de confiança de 95%, em relação à classe 1. As amostras marcadas com um círculo cheio correspondem a 30 amostras utilizadas na calibração para a classe 1 (região sudeste) e as amostras marcadas com um quadrado cheio são 10 amostras utilizadas na calibração do modelo referente à classe 2 (região sul). Finalmente, as amostras marcadas com um círculo vazio correspondem a 17 amostras de previsão da classe 1 e as amostras marcadas com um quadrado vazio são as cinco amostras de previsão da classe 2.

Como pode ser observado na Figura 12, as amostras marcadas com círculos acima do valor limite (0,684), também chamado de *threshold*, estabelecido pelo modelo PLS-DA, correspondem às amostras de previsão da classe 1, demonstrando o acerto de 100% na previsão dos extratos de própolis da região sudeste. Já as amostras marcadas com quadrados, abaixo do *threshold*, são amostras de previsão da classe 2, demonstrando o acerto de 100% na previsão dos extratos de própolis da região sul do país. Os resultados mostram a eficiência do modelo para discriminar extratos de própolis comerciais das regiões sudeste e sul do Brasil.

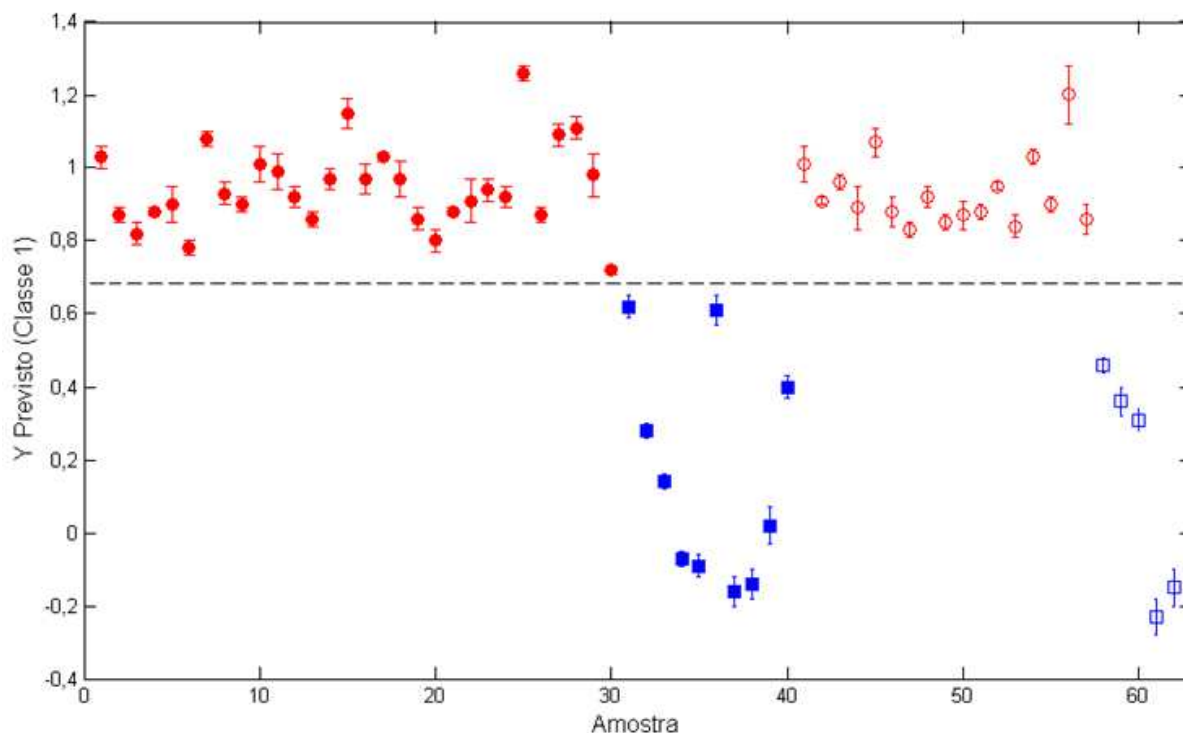


Figura 12. Amostras classificadas pelo modelo PLS-DA. (●) Amostras de calibração do sudeste, (■) amostras de calibração da região sul, (○) amostras de previsão do sudeste e (□) amostras de previsão do sul.

As amostras que estiveram próximas do *threshold* na Figura 12 são de cidades que possuem vegetação intermediária em relação às regiões em estudo, com a possível presença nessas amostras de resinas de ambas as espécies de *Baccharis dracunculifolia* e *Araucaria angustifolia*, como reportado nos estudos de Bankova e colaboradores [1].

As amostras referentes à região sudeste apresentaram uma menor dispersão na Figura 12 do que as amostras da região sul. Isso pode ser explicado pela maior seletividade das abelhas pela espécie *Baccharis dracunculifolia* na produção da própolis na região sudeste, fazendo com que os extratos de própolis desta região tenham maior similaridade entre si, enquanto que na produção da própolis na região sul do país as abelhas podem utilizar mais de uma fonte vegetal, como foi verificado nos estudos de Park e colaboradores [48].

O gráfico dos pesos das variáveis latentes que apresentaram maior variância explicada na separação das amostras pelo modelo PLS-DA, é apresentado na Figura 13. Os comprimentos de onda responsáveis pela separação de ambos os grupos de amostras estão em torno de 210 nm (banda primária do benzeno) na VL2.

Este fato mostra que, possivelmente, diferentes padrões de substituição no anel aromático estão presentes nos compostos fenólicos dos extratos de própolis das regiões sul e sudeste.

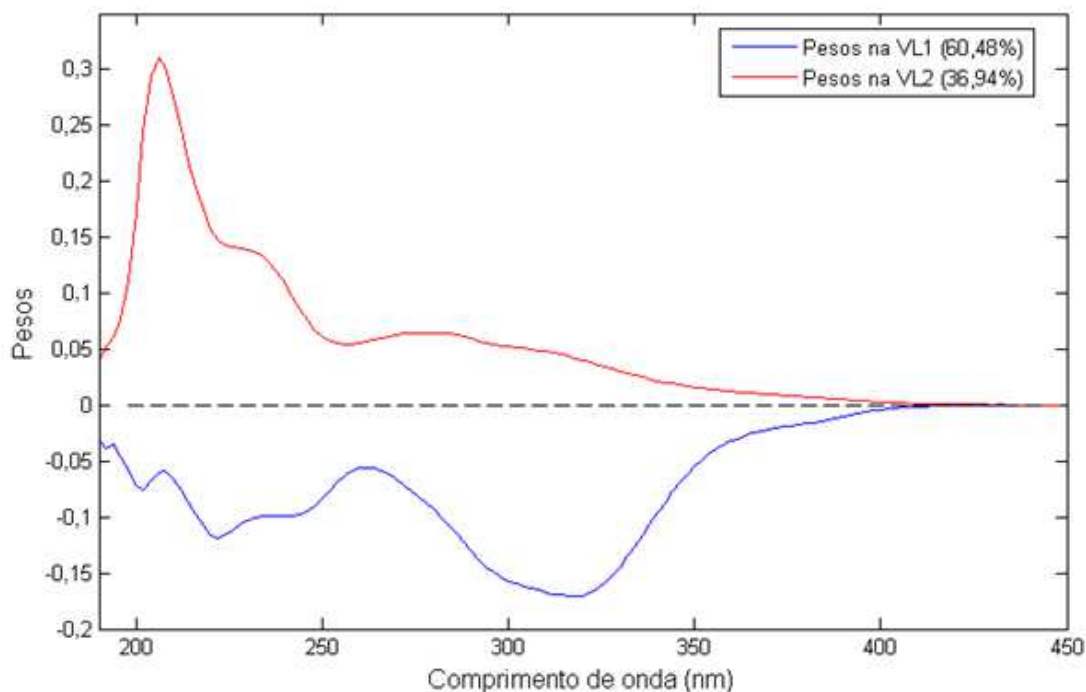
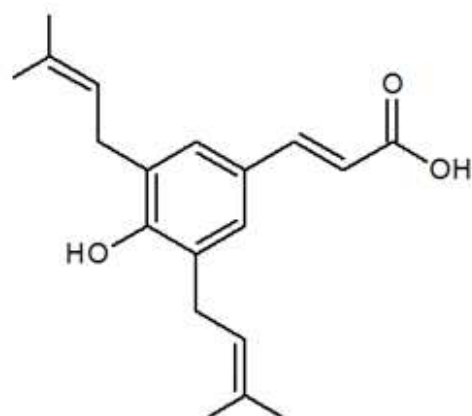


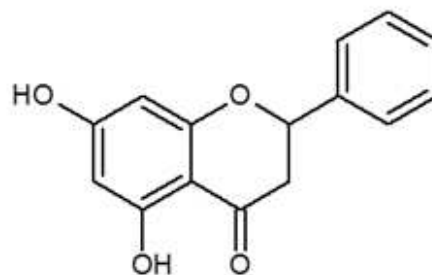
Figura 13. Pesos para as variáveis latentes 1 e 2 do modelo PLS-DA.

Em estudos posteriores, envolvendo análises cromatográficas dos extratos de própolis de ambas as regiões estudadas, foi possível identificar nesses extratos vários ácidos fenólicos e flavonóides. Os parâmetros instrumentais e toda validação da metodologia cromatográfica está descrita no Capítulo 6. Os compostos fenólicos identificados em extratos envazados na região sul foram artepillin C, pinocembrina, acacetina, galangina, crisina, ácido cinâmico, ácido *p*-cumárico e kaempferol.

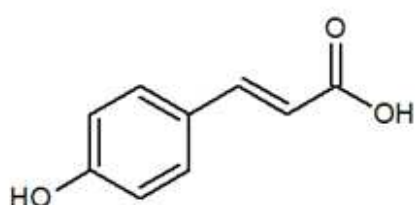
Os extratos envazados na região sudeste apresentaram muitos compostos em comum com os extratos da região sul como artepillin C, ácido *p*-cumárico, pinocembrina, acacetina, galangina e kaempferol. Entretanto, não se observou a presença de ácido cinâmico e crisina nos extratos da região sudeste. As estruturas químicas dos compostos fenólicos citados e identificados nos extratos de própolis estão apresentadas na Figura 14.



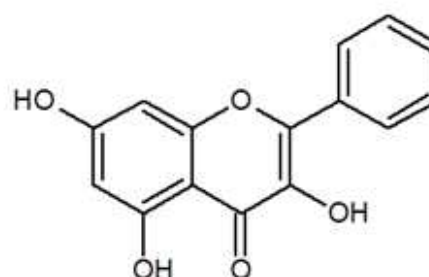
1: artepillin C



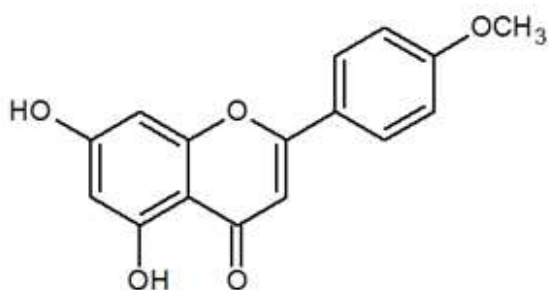
2: pinocembrina



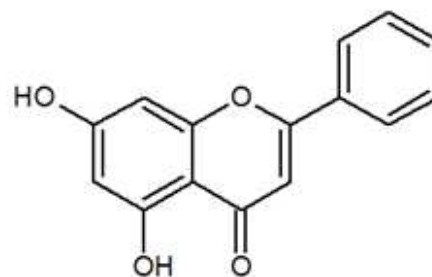
3: ácido *p*-cumárico



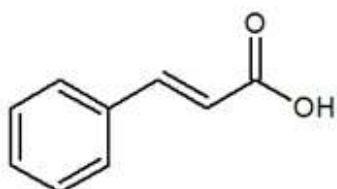
4: galangina



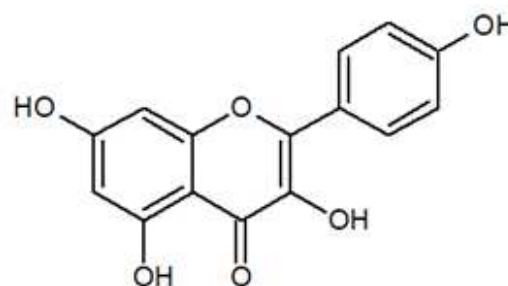
5: acetina



6: crisina



7: ácido cinâmico



8: kaempferol

Figura 14. Estruturas dos compostos fenólicos encontrados em extratos de própolis das regiões sudeste e sul.

Embora alguns compostos não tenham sido identificados, para a maior parte das amostras estudadas da região sul, os perfis cromatográficos foram diferentes das amostras da região sudeste (Figura 15). A numeração de cada pico na Figura 15 corresponde à numeração dos compostos fenólicos apresentados na Figura 14. Os extratos da região sul apresentaram uma quantidade de compostos fenólicos maior que os extratos da região sudeste, como pode ser observado na Figura 15(c), referente à amostra C93. Essa diferença na composição química dos extratos das regiões sul e sudeste é a responsável pela classificação dos extratos de própolis advindos destas regiões.

Os extratos de própolis da região sul, que estiveram próximos do *threshold* na Figura 12, apresentaram perfis cromatográficos parecidos com os extratos da região sudeste. Como pode ser observado nas Figuras 15(a) e 15(b), muitos compostos estão presentes tanto em extratos da região sul quanto nos da região sudeste, justificando a proximidade de algumas amostras da região sul do *threshold* nos estudos de classificação.

Em se tratando dos extratos de própolis verde, pode-se observar que estes extratos apresentaram perfis cromatográficos semelhantes aos apresentados pelos extratos de própolis comum da região sudeste, como pode se observado na Figura 16. Os mesmos compostos fenólicos encontrados em extratos de própolis verde foram encontrados em extratos de própolis comum, justificando a não separação entre os extratos de própolis comum e verde nos estudos de classificação. Desta forma, extratos com características de própolis verde são comercializados como própolis comum, devido à falta de informações de origem.

Desse modo, mesmo os extratos não categorizados comercialmente como advindos de própolis verde, possivelmente, estes apresentarão as mesmas propriedades químicas e farmacológicas que os extratos categorizados como de própolis verde. Por estes extratos serem de uma mesma região de cerrado, que é rica em espécies de *Baccharis*, não se justifica o contrário.

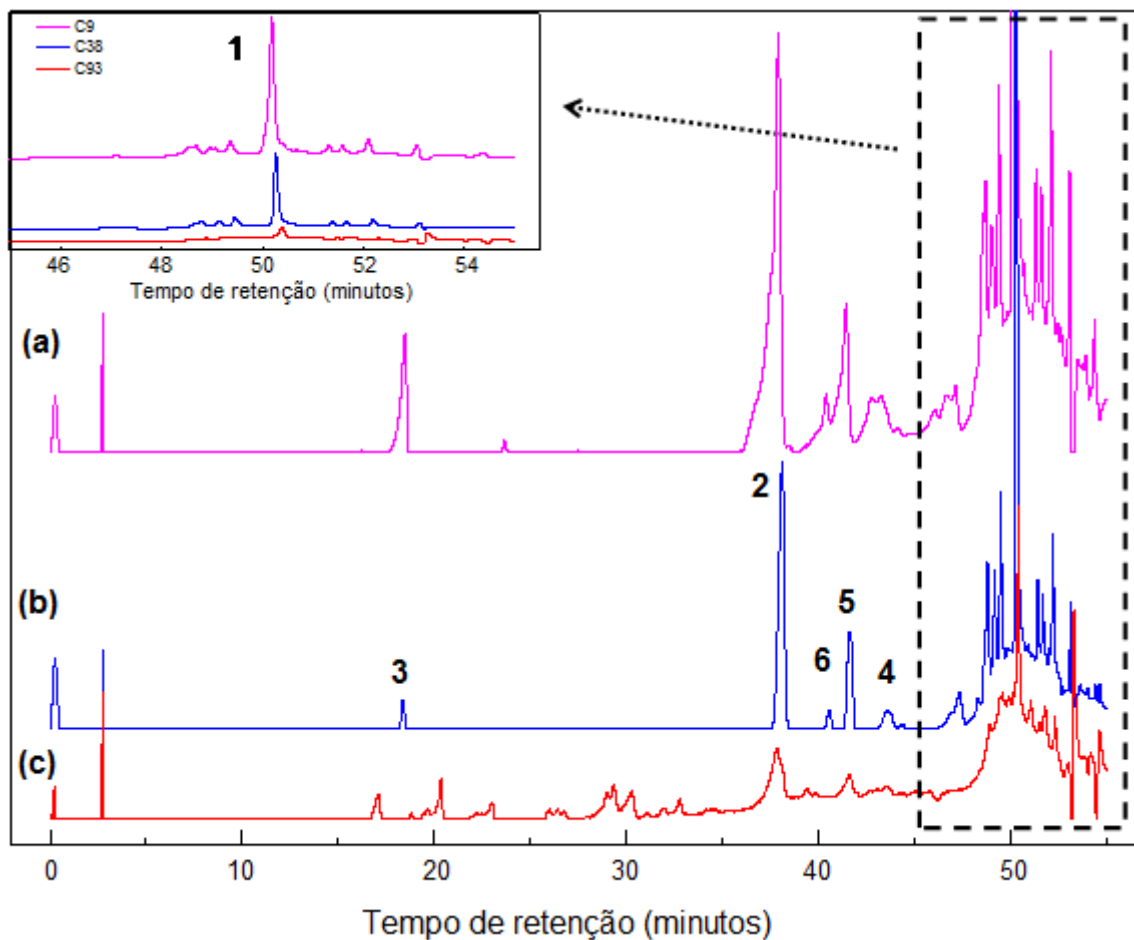


Figura 15. (a) Cromatograma do extrato de própolis C9 (**região sudeste**), envazado na cidade de Nova Lima – MG; (b) Cromatograma do extrato de própolis C38 (**região sul**), envazado na cidade de Araranguá – SC; (c) Cromatograma do extrato de própolis C93 (**região sul**), envazado na cidade de Urubici – SC. Os cromatogramas foram obtidos no comprimento de onda de 310 nm. 1) artepillin C, 2) pinocembrina, 3) ácido p-cumárico, 4) galangina, 5) acetina, 6) crisina.

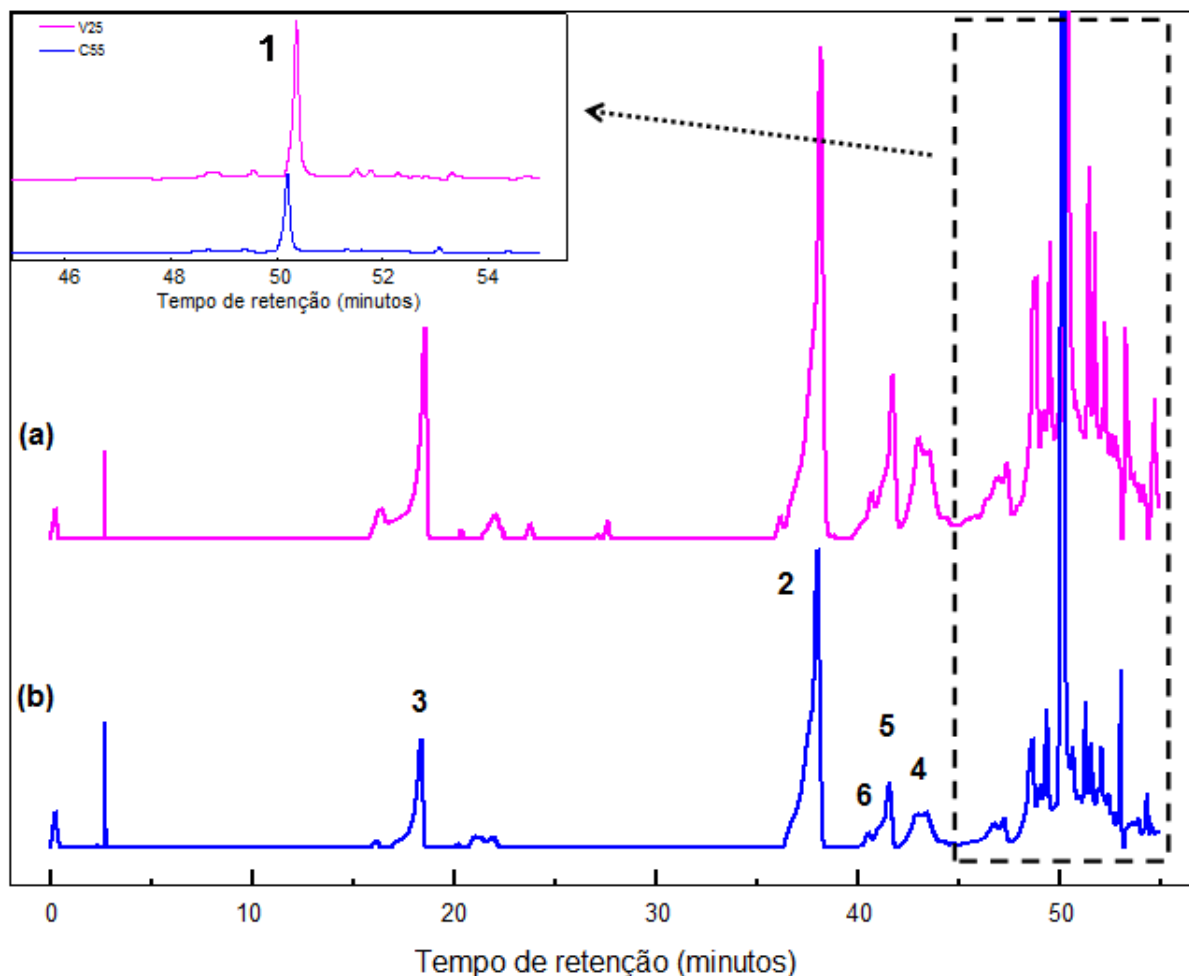


Figura 16. (a) Cromatograma do extrato de própolis verde V25 (**região sudeste**), envazado na cidade de Cláudio – MG; (b) Cromatograma do extrato de própolis C55 (**região sudeste**), envazado na cidade de Boa Esperança – MG. Ambos os cromatogramas foram obtidos no comprimento de onda de 310 nm. 1) artepillin C, 2) pinocembrina, 3) ácido *p*-cumárico, 4) galangina, 5) acacetina, 6) crisina.

As principais fontes de resinas utilizadas na produção de própolis da região sul são as espécies de *Araucaria angustifolia* [131] e *Populus alba* [49] enquanto que a principal fonte botânica utilizada pelas abelhas na região sudeste é a espécie *Baccharis dracunculifolia* [5, 52, 55, 132], na qual fornecem diferentes compostos químicos para a produção de própolis em cada região, sendo que amostras de própolis da região sudeste são ricas em derivados do ácido *p*-cumárico e amostras

de própolis da região sul são uma mistura de derivados do ácido *p*-cumárico e alguns flavonóides que não estão presentes em amostras da região sudeste.

Todos os fatos apresentados explicam a separação das amostras destas regiões, sendo que o modelo quimiométrico PLS-DA é capaz de executar uma rápida discriminação da origem dos extratos de própolis em termos da região onde foram produzidos.

Assim, a metodologia proposta é rápida, limpa e possui baixo custo, pode ser utilizada em laboratórios de rotina para controle de qualidade de extratos de própolis, a fim de garantir uma estimativa da região geográfica, agregando maior confiabilidade no produto apícola brasileiro pelo mercado internacional, que muito se interessa pelas propriedades farmacológicas de extratos de própolis de regiões específicas do país.

### 3.3 Conclusões

O método supervisionado de classificação PLS-DA foi capaz de classificar extratos alcoólicos comerciais de própolis das regiões sul e sudeste do Brasil, apresentando 100% de acerto nas previsões de amostras de ambas regiões estudadas.

Os comprimentos de onda responsáveis por esta classificação foram os comprimentos em torno de 210 e 320 nm, referentes ao deslocamento batocrômico das bandas do benzeno, indicando que diferentes padrões de substituição de grupos químicos no anel benzênico foram os responsáveis pela discriminação entre os extratos das duas regiões.

Este fato foi confirmado através de análises cromatográficas que indicaram a presença de compostos fenólicos presentes nos extratos da região sul que não foram identificados nos extratos de própolis da região sudeste.

Dessa maneira, o método PLS-DA pode ser utilizado para uma rápida distinção entre as amostras de regiões de interesse, assegurando as características físico-químicas destes produtos, por estas estarem diretamente relacionadas com a fonte botânica utilizada pelas abelhas para a produção da própolis, que variam de região para região.

## **CAPÍTULO 4**

***Desenvolvimento de um método de calibração multivariada  
para determinação do teor de extrato seco em extratos de própolis***

---

#### **4 DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE EXTRATO SECO EM EXTRATOS COMERCIAIS DE PRÓPOLIS**

De acordo com a legislação brasileira [19], extrato de própolis é o produto proveniente da extração dos componentes solúveis da própolis em álcool neutro (grau alimentício), por processo tecnológico adequado. É preparado pelos apicultores a partir da própolis bruta limpa (isenta de terra, pedaços de madeira, folhas e outros contaminantes) e solventes como álcool de cereais de grau alimentício (etanol 95% v/v), deixando a mistura em repouso de 24 horas até 7 dias, normalmente, para a extração dos componentes ativos presentes na própolis. Após este período, a mistura é filtrada, envazada e rotulada para a venda [58, 87, 89, 91, 92, 94, 95, 97, 133].

Visando regulamentar o produto apícola brasileiro, em 2001 foi criada uma instrução normativa pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que preconiza limites para fixação de identidade e qualidade da própolis e de seus extratos [19]. Nos parâmetros físico-químicos exigidos pelo MAPA para comercialização da própolis e seu extrato estão os teores de fenóis e de flavonóides totais, teor de ceras, teor de extrato seco, características sensoriais, dentre outros.

A quantidade de substâncias dissolvidas nos extratos alcoólicos pode ser avaliada a partir do resíduo obtido após secagem de um volume conhecido de extrato de própolis, comumente chamado de extrato seco. Estão presentes neste resíduo, substâncias ativas presentes na própolis como fenóis e flavonóides, além de outras substâncias minoritárias. Desse modo, o teor de extrato seco de extratos comerciais de própolis indica a quantidade de substâncias bioativas presentes no mesmo, e, conseqüentemente, sua eficácia frente às suas aplicações terapêuticas. O MAPA estabelece um mínimo de 11% (m/v) de extrato seco.

Na extração dos compostos fenólicos da própolis pode ocorrer também a extração de vestígios de ceras que são compostos indesejáveis no produto final. Sabe-se que os teores de ceras e de substâncias fenólicas (presentes nas resinas e não nas ceras) são inversamente proporcionais. Sendo assim, amostras com maiores quantidades de ceras apresentam menores teores de fenóis e flavonóides

e, conseqüentemente, menor atividade farmacológica [116]. Segundo a legislação brasileira [19], o teor de ceras deve ser de no máximo 1% (m/m) do extrato seco.

No processo de produção do extrato, geralmente é feita apenas uma filtração, à temperatura ambiente, para a retirada de possíveis vestígios de ceras, sendo que, uma segunda filtração à baixa temperatura (em torno de -10 °C) torna-se necessária para a precipitação das ceras remanescentes da primeira filtração. Desse modo, pequenas quantidades de ceras podem estar presentes nos extratos alcoólicos comerciais de própolis, comprometendo a qualidade do produto final.

A determinação do teor de extrato seco em própolis geralmente é feita por método gravimétrico [90, 134]. Na metodologia gravimétrica, cadinhos ou béqueres são inicialmente aquecidos em estufa a uma temperatura em torno de 105 °C para total secagem, antecedendo a adição da amostra. Após a secagem, estes são levados ao dessecador para resfriamento. Na temperatura ambiente, o recipiente é pesado antes da adição da amostra. A amostra é então adicionada no recipiente e o mesmo é colocado em uma chapa aquecedora para evaporação de todo o solvente presente na amostra líquida. Após a evaporação, o recipiente contendo a amostra seca é levado novamente para a estufa, numa temperatura em torno de 70 °C, por cerca de uma hora, para total secagem do solvente. Após esse período, o recipiente é levado ao dessecador para retornar à temperatura ambiente. Quando já nessa temperatura, o mesmo é pesado e o valor do resíduo seco é obtido subtraindo-se a massa do recipiente com a amostra seca do valor do recipiente vazio.

Os métodos gravimétricos possuem boa precisão, geralmente em torno de 1%, entretanto, como exposto acima, são demorados e laboriosos, necessitam de um tempo em torno de 12 h, além de envolverem grande número de vidrarias e solventes para limpeza das mesmas, tornando a sua utilização dificultada em análises de rotina para avaliação do teor de extrato seco.

Os espectros de absorção desses extratos juntamente com métodos envolvendo análise multivariada como, por exemplo, análise exploratória e calibração multivariada, podem ser utilizados para extrair vários tipos de informações da matriz estudada. As análises envolvendo calibração multivariada podem determinar valores quantitativos para uma dada propriedade, como, por exemplo, o teor de extrato seco, a partir de análises qualitativas, como a obtenção de espectros

de absorção na região UV-VIS, que estão diretamente relacionados com o teor dos compostos bioativos que absorvem radiação nesta região.

Nos últimos anos, a utilização da espectroscopia UV-VIS juntamente com métodos de calibração multivariada tem se tornado cada vez mais popular, para a determinação de vários parâmetros analíticos, que vão desde a determinação da concentração de analitos até a determinação de propriedades físico-químicas. Essa combinação surge como uma alternativa a métodos que geralmente são laboriosos, apresentam interferentes, não possuem uma única variável seletiva que permita a calibração univariada ou que não apresentam boa resolução do sinal analítico. Diversos métodos de calibração multivariada vêm sendo utilizados tais como Regressão Linear Múltipla (MLR), Regressão por Componentes Principais (PCR) e o método dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS), com aplicações em várias áreas.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de análise alternativo para a determinação do teor de extrato seco em extratos alcoólicos comerciais de própolis de várias regiões do Brasil, por espectroscopia UV-VIS e o método dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS), visando a redução do tempo de análise, de solventes e de resíduos, em comparação à metodologia tradicional gravimétrica. Nesse trabalho, uma otimização envolvendo a detecção de *outliers* foi realizada e o modelo de calibração multivariada validado segundo algumas recomendações presentes na literatura [135-137].

## **4.1 Materiais e métodos**

### **4.1.1 Amostras e reagentes**

Foram analisadas 47 amostras de extratos alcoólicos de própolis comerciais brasileiras, sendo 33 amostras de extrato de própolis comum e 14 amostras de extrato de própolis verde, com e sem etapa prévia de centrifugação. Na obtenção dos espectros de absorção molecular na região do UV-Vis, 5 µL do extrato de própolis foram diluídos para 25 mL, com etanol 95% (v/v) (Synth). Foram preparadas cinco soluções independentes para cada amostra e a medição executada em triplicata.

#### 4.1.2 Instrumentação e software

Espectros de absorção molecular na região do UV-Vis foram obtidos em espectrofotômetro da marca Hewlet-Packard, modelo 8451A, com cubetas de quartzo com caminho óptico de 0,5 cm. Os espectros de absorção foram obtidos realizando varredura do comprimento de onda de 190 a 450 nm, com incrementos de 2 nm.

Os resíduos semi-sólidos obtidos após centrifugação dos extratos de própolis foram analisados em triplicatas independentes e lidos em triplicata em um espectrômetro de infravermelho Nicolet–Thermoelectron 380, com transformada de Fourier e dispositivo amostrador por reflectância total atenuada (ATR), modelo Smart Performer, com cristal de ZnSe, na região do infravermelho médio, abrangendo a região de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 64 varreduras. Pastilhas utilizando uma mistura de KBr com o resíduo formado após a centrifugação foram produzidas e colocadas sobre o cristal horizontal de ZnSe do dispositivo amostrador de ATR, sendo o *background* do ar coletado antes da medida de cada amostra. O cristal de ZnSe foi cuidadosamente limpo com etanol anidro seguido de hexano, para eliminar a presença de resíduos entre as medidas.

Para a construção dos modelos de calibração multivariada, foi utilizado o software MATLAB, versão 7.9 (The MathWorks, Natick, USA) e o PLS Toolbox, versão 5.2 (Eigenvector Technologies, Manson, USA). Uma rotina para verificação de *outliers* também foi utilizada [137].

#### 4.1.3 Análise gravimétrica

Para a obtenção dos extratos secos, transferiu-se 1,00 mL do extrato de própolis em béqueres de 10 mL previamente secos na estufa a 105 °C, tendo suas massas medidas três vezes após resfriamento no dessecador. Os béqueres contendo os extratos foram colocados em chapa aquecedora a 65 °C para a secagem dos extratos. Após a secagem, os mesmos foram levados à estufa na qual permaneceram por 1 h a temperatura de 70 °C.

Posteriormente os béqueres foram levados ao dessecador onde ficaram por aproximadamente 1 h até o completo resfriamento. A massa do béquer contendo o

extrato já seco foi medida três vezes obtendo-se, após a diferença da sua massa com a do béquer vazio, a massa advinda somente do extrato seco. Os ensaios foram realizados em quintuplicata para cada amostra, sendo que os resultados obtidos foram avaliados através do teste Q, e os valores finais foram expressos com um nível de confiança de 95%.

O mesmo procedimento descrito acima foi realizado para as amostras após etapa de centrifugação baseando-se em algumas metodologias presentes na literatura, com pequenas modificações [138-142]. A centrifugação das amostras foi realizada a uma rotação de 3000 rpm por 5 minutos, à temperatura ambiente, para a retirada de vestígios de ceras, remanescentes do processo de filtração e de possíveis materiais em suspensão. Nesta etapa, a redução da temperatura para a precipitação de ceras não foi realizada porque verificou-se que em algumas amostras o extrato alcoólico apresentava aglutinação de todo o líquido, impossibilitando a sua filtração e levando à perda de amostra. Nesse procedimento, somente o sobrenadante das amostras foi utilizado, sendo que, em algumas amostras houve a formação de corpo de fundo após a centrifugação. Posteriormente, as amostras foram filtradas à vácuo para a separação do resíduo, sendo este último levado à estufa para a secagem do solvente ainda presente, para avaliação da possível presença de ceras a partir de espectros na região do infravermelho médio.

Após a realização da metodologia gravimétrica, uma comparação dos teores de extrato seco obtidos a partir das amostras com e sem centrifugação foi realizada utilizando-se o teste *t* de Student, para avaliar se os dois grupos de medidas forneceriam resultados semelhantes ou não, em um nível de confiança de 95%.

#### **4.1.4 Análise quimiométrica**

Modelos de calibração multivariada PLS foram construídos utilizando espectros de absorção molecular na região do UV-Vis e os teores de extrato seco de extratos de própolis centrifugados foram obtidos a partir da metodologia gravimétrica. Os modelos foram construídos, otimizados e validados baseando-se nas recomendações da norma ASTM E 1655-05 [135].

Os espectros tiveram a linha base corrigida através do algoritmo *baseline* do PLS Toolbox e a faixa de comprimentos de onda utilizada neste estudo foi de 190 a 450 nm. A possível presença de ruídos instrumentais e sua influência no modelo de calibração multivariada foi avaliada na faixa entre 190 a 220 nm e verificou-se que esta região é de grande importância por conter informações relevantes e que a mesma não deveria ser descartada.

A separação dos conjuntos de dados para calibração e validação do modelo foi realizada com a utilização do algoritmo de Kennard-Stone [128], sendo 30 amostras utilizadas na calibração e 17 amostras na validação do modelo. O número de amostras nas etapas de calibração e validação utilizadas na construção dos modelos estiveram de acordo com a norma ASTM E 1655-05 [135], que sugere 6x (número de LVs + 1) e 4x (número de LVs) de amostras nas etapas de calibração e validação, respectivamente. Os dados foram centrados na média e o método de validação cruzada utilizado foi o *contiguous block*.

Neste trabalho, os modelos PLS construídos foram otimizados a partir da verificação de possíveis *outliers* [135] e na metodologia proposta por Valderrama e colaboradores [136]. A detecção de *outliers* no conjunto de calibração foi realizada com base no *leverage* extremo, nos resíduos dos dados espectrais e nos resíduos na variável dependente (teores de extrato seco). Para o conjunto de validação essa detecção foi realizada baseando-se apenas no *leverage* e nos resíduos espectrais [135, 143], e as amostras consideradas anômalas foram retiradas do modelo.

Para avaliação da precisão do modelo PLS, um total de 10 amostras de extrato de própolis, que não foram utilizadas na calibração e validação do modelo, distribuídas na faixa de 2,7 a 15,6% (m/v) de extrato seco, foram utilizadas, sendo as mesmas preparadas em quintuplicatas independentes para cada concentração e lidas em triplicata, estando de acordo com a ASTM [135], que recomenda um mínimo de 3 amostras de concentrações diferentes, e com as sugestões da ICH [144], que sugere a utilização de 3 replicatas para cada nível de concentração. A precisão foi calculada a partir da expressão [145]:

$$precisão = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (\hat{y}_{ij} - \hat{\bar{y}}_i)^2}{n(m-1)}} \quad (\text{Eq.11})$$

onde  $\hat{y}_i$  é a média dos valores previstos de cada replicata  $\hat{y}_{ij}$ ,  $n$  é o número de amostras e  $m$  é o número de replicatas realizadas.

## 4.2 Resultados e Discussão

### 4.2.1 Metodologia gravimétrica

Visando uma maior confiabilidade nos resultados, os teores de extrato seco de 47 amostras de extrato de própolis (Tabelas 7 e 8), foram determinados a partir da metodologia gravimétrica descrita anteriormente, com e sem etapa de centrifugação, para a retirada de possíveis vestígios de ceras, que poderiam levar a resultados superestimados. A Figura 17 apresenta o aspecto dos extratos secos após a etapa de secagem das alíquotas de extratos de própolis.

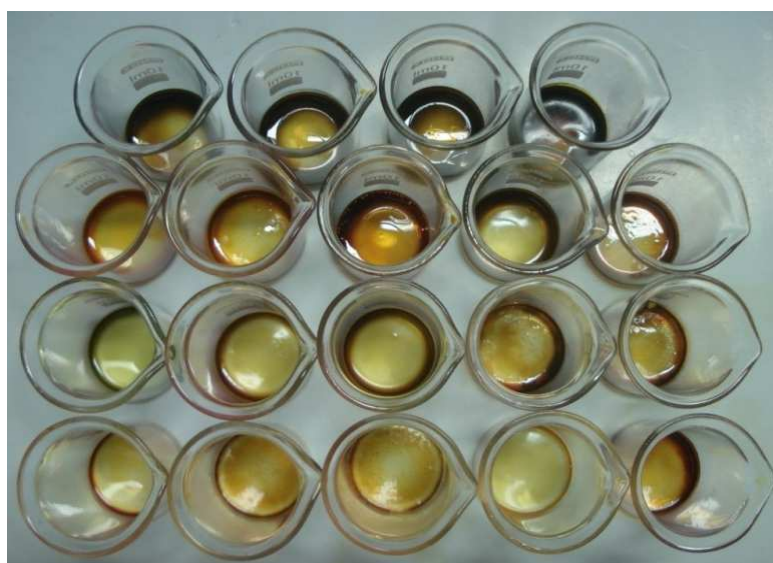


Figura 17. Resíduo obtido após secagem dos extratos de própolis.

O teste  $t$  realizado para as diferenças individuais indica que 55,3% dos valores encontrados com e sem a etapa de centrifugação são estatisticamente diferentes, para um nível de confiança de 95% e 8 graus de liberdade, como pode ser observado nas Tabelas 7 e 8. Assim, comprova-se que a etapa de centrifugação é necessária para a determinação do teor de extrato seco em extratos alcoólicos de própolis, para redução de erros sistemáticos no processo de medição.

Tabela 7. Teores de extrato seco de extratos alcoólicos comerciais de própolis comum.

Amostra	Teor declarado (% m/v)	Com centrifugação		Sem centrifugação		$t_{\text{calculado}}$
		Extrato seco (% m/v)	DPR (%)	Extrato seco (% m/v)	DPR (%)	
C8	30	5,43 ± 0,06	1,2	5,25 ± 0,01	0,3	<b>7,1</b>
C14	20	3,51 ± 0,04	1,2	3,46 ± 0,04	1,1	<b>2,7</b>
C15	11	4,35 ± 0,07	1,6	4,39 ± 0,02	0,5	1,4
C17	11	2,74 ± 0,06	2,2	2,68 ± 0,05	1,8	2,3
C18	-	6,93 ± 0,07	1,0	6,72 ± 0,09	1,3	<b>5,4</b>
C22	11	11,64 ± 0,18	1,6	11,66 ± 0,14	1,2	0,3
C27	-	11,30 ± 0,22	2,0	11,39 ± 0,17	1,5	0,9
C30	-	6,23 ± 0,04	0,6	6,15 ± 0,10	1,7	2,1
C32	30	6,23 ± 0,11	1,8	6,16 ± 0,05	0,9	1,5
C33	30	10,63 ± 0,04	0,4	10,01 ± 0,11	1,1	<b>14,6</b>
C34	11	16,82 ± 0,23	1,3	17,63 ± 0,37	2,1	1,6
C35	12	11,59 ± 0,17	1,5	10,75 ± 0,08	0,8	<b>11,5</b>
C36	30	9,26 ± 0,05	0,6	8,70 ± 0,10	1,2	<b>13,1</b>
C37	11	11,21 ± 0,13	1,1	11,46 ± 0,45	3,9	1,5
C38	15	15,58 ± 0,19	1,2	15,38 ± 0,45	2,9	1,1
C49	-	6,75 ± 0,04	0,6	6,90 ± 0,16	2,3	<b>2,4</b>
C56	30	8,40 ± 0,13	1,5	8,72 ± 0,04	0,5	<b>6,1</b>
C59	-	8,70 ± 0,02	0,2	8,85 ± 0,13	1,4	<b>3,0</b>
C60	30	11,31 ± 0,09	0,8	11,49 ± 0,20	1,7	2,2
C61	11	13,75 ± 0,17	1,2	13,70 ± 0,34	2,5	0,4
C62	11	9,24 ± 0,06	0,7	9,40 ± 0,22	2,4	2,0
C63	11	11,85 ± 0,29	2,5	12,25 ± 0,39	3,2	2,3
C64	30	8,92 ± 0,15	1,7	9,31 ± 0,15	1,6	<b>5,1</b>
C68	-	15,48 ± 0,45	2,9	16,43 ± 0,16	1,0	<b>5,5</b>
C73	20	3,74 ± 0,04	1,0	3,82 ± 0,08	2,2	<b>2,4</b>
C76	-	4,21 ± 0,05	1,1	4,35 ± 0,16	3,6	<b>2,4</b>
C78	30	14,22 ± 0,21	1,4	12,80 ± 0,08	0,7	<b>17,6</b>
C80	15	8,94 ± 0,09	1,0	9,06 ± 0,08	0,8	<b>3,0</b>
C85	11	11,00 ± 0,11	1,0	10,84 ± 0,08	0,7	<b>3,9</b>
C90	30	12,04 ± 0,08	0,6	11,98 ± 0,34	2,8	0,5
C95	-	10,06 ± 0,11	1,1	9,62 ± 0,32	3,4	<b>3,6</b>
C96	30	6,87 ± 0,05	0,8	6,78 ± 0,10	1,5	2,2
C101	-	5,57 ± 0,21	3,7	5,86 ± 0,12	2,0	<b>2,6</b>

$t_{\text{tab } 8,95\%} = 2,306$

Tabela 8. Teores de extrato seco de extratos alcoólicos comerciais de própolis verde.

Amostra	Teor declarado (% m/v)	Com centrifugação		Sem centrifugação		$t_{\text{calculado}}$
		Extrato seco (% m/v)	DPR (%)	Extrato seco (% m/v)	DPR (%)	
V2	30	14,91 ± 0,17	1,2	13,48 ± 0,26	1,9	<b>14,3</b>
V3	12	5,83 ± 0,05	0,9	5,81 ± 0,10	1,8	0,4
V10	11	12,73 ± 0,17	1,4	13,23 ± 0,13	1,0	<b>6,3</b>
V11	30	13,09 ± 0,49	3,7	12,88 ± 0,17	1,3	1,9
V12	11	15,06 ± 0,56	3,8	14,32 ± 0,09	0,6	<b>3,2</b>
V13	-	15,48 ± 0,46	3,0	14,94 ± 0,17	1,1	<b>3,0</b>
V20	11	14,74 ± 0,50	3,4	14,95 ± 0,31	2,1	1,1
V21	11	14,55 ± 0,04	0,3	14,57 ± 0,18	1,2	0,5
V22	-	7,24 ± 0,17	2,4	5,65 ± 0,21	3,6	<b>20,9</b>
V23	40	16,50 ± 0,21	1,3	16,20 ± 0,44	2,7	1,8
V25	30	15,93 ± 0,31	2,0	15,82 ± 0,26	1,7	0,8
V29	35	14,72 ± 0,09	0,6	13,42 ± 0,19	1,4	<b>16,9</b>
V30	25	11,18 ± 0,08	0,7	11,01 ± 0,18	1,7	<b>2,5</b>
V33	-	11,16 ± 0,12	1,1	11,45 ± 0,25	2,2	<b>2,9</b>

$t_{\text{tab } 8,95\%} = 2,306$

Após a etapa de centrifugação, algumas amostras apresentaram corpo de fundo, com aparência escura e resinosa, sugerindo a presença de ceras (Figura 18). Para verificar se o resíduo formado após centrifugação era composto de ceras, o mesmo foi analisado por espectrometria no infravermelho médio.



Figura 18. Formação de duas fases após centrifugação dos extratos de própolis.

Como pode ser observado na Figura 19, este resíduo apresenta bandas características de ácidos carboxílicos saturados, com identificação apresentada na Tabela 9. Bandas de estiramento de ligações C-H aparecem sobrepostas à banda de estiramento de O-H, como as bandas de estiramento de C-H de grupos metila e metileno. Como não se observou bandas de estiramento de =C-H na região acima de  $3000\text{ cm}^{-1}$  e nem bandas intensas e estreitas de deformação angular fora do plano de ligações =C-H na região de aproximadamente  $900$  a  $650\text{ cm}^{-1}$ , que são bandas referentes a alquenos e grupos aromáticos, pode-se inferir que não há a presença de fenóis, que são comumente encontrados em extratos de própolis, e que a cadeia carbônica é saturada.

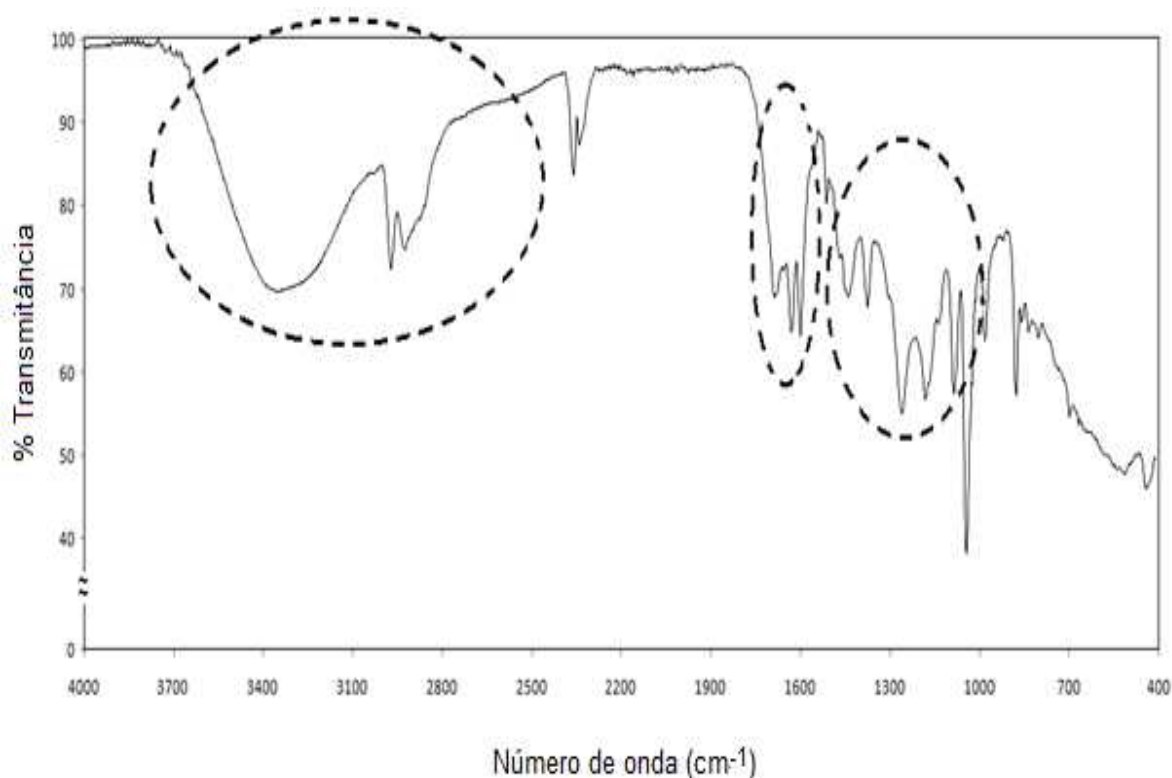


Figura 19. Espectro infravermelho médio do material resinoso obtido após centrifugação. As bandas discutidas no texto foram assinaladas no espectro.

Tabela 9. Atribuições de grupos orgânicos e suas frequências de grupo.

Vibração / ligação	Grupo orgânico	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )
v O-H	Ácido carboxílico	3700 - 2500
v C=O		1705
δ O-H	Dímero	1455
v C-O	Dímero	1268
v <sub>as</sub> C-H	Alcano (grupo metil)	2975
v <sub>s</sub> C-H		2871
v <sub>as</sub> C-H	Alcano (grupo metileno)	2935
v <sub>s</sub> C-H		2861

v: estiramento

δ: deformação angular

v<sub>as</sub>: estiramento assimétrico

v<sub>s</sub>: estiramento simétrico

Os resultados observados corroboram com o estudo realizado por Teixeira e colaboradores [71] que detectaram ácidos carboxílicos em ceras de própolis verde e compostos como hidrocarbonetos e aldeídos de cadeias longas. A maior parte das amostras estudadas por estes autores são da região sudeste do país, com características de própolis advindas de *Baccharis dracunculifolia*, bem como parte das amostras utilizadas neste trabalho.

Como pode ser observado nas Tabelas 7 e 8, 47% das amostras analisadas apresentaram teores de extrato seco abaixo do valor mínimo exigido pelo MAPA (11% m/v) para comercialização deste tipo de produto, considerando os valores encontrados nas etapas com e sem centrifugação. Dos 35 valores de teor de extrato seco informados nos rótulos, 68,5% encontraram-se abaixo do valor declarado, mostrando-se mais crítico para as amostras com os maiores teores declarados. Estes resultados mostram o quanto torna-se necessário uma maior fiscalização dos extratos comerciais de própolis, visando agregar uma maior qualidade e confiabilidade dos mesmos no mercado nacional e internacional.

De um modo geral, a metodologia gravimétrica apresentou boa precisão, com desvio padrão relativo (DPR) em torno de 1,5%. Todavia, a análise gravimétrica dos teores de extrato seco de extratos de própolis é laboriosa, consome um longo tempo de preparo e envolve o descarte dos resíduos utilizados na limpeza das

vidrarias, como etanol comercial em alta quantidade. Visando minimizar essas desvantagens, um modelo quimiométrico foi construído utilizando os valores encontrados para o teor de extrato seco a partir da metodologia gravimétrica e espectros de absorção na região de UV-Vis.

#### 4.2.2 Metodologia quimiométrica

Os teores de extrato seco das 47 amostras centrifugadas, na faixa de 2,7 a 16,8% (m/v), foram utilizados na construção de um modelo de calibração multivariada (vetor  $\mathbf{y}$ ) utilizando PLS, juntamente com seus espectros de absorção na região UV-Vis (matriz  $\mathbf{X}$ ). A faixa dos teores de extrato seco utilizados na construção do modelo de calibração engloba teores abaixo do valor mínimo exigido na legislação brasileira (11% m/v) [19], por serem encontrados comercialmente extratos de própolis com baixos teores, como verificado e discutido anteriormente.

A Figura 20 apresenta todos os espectros de absorção dos extratos de própolis analisados. Os espectros foram separados por faixas de teor de extrato seco para melhor visualização da influência da concentração de compostos fenólicos (presentes no extrato seco) com a absorbância. Pode-se observar que baixos valores de teor de extrato seco possuem baixa absorbância, indicando que baixas quantidades de compostos fenólicos estão presentes nestes extratos.

Na construção do modelo PLS, quatro variáveis latentes (VLs) foram escolhidas por apresentarem menor valor para RMSECV. Baseando-se nos métodos para detecção de *outliers*, o primeiro modelo PLS construído apresentou, no conjunto de dados da calibração, uma amostra com alto valor de *leverage*, superior ao valor de *leverage* extremo (0,50) e uma amostra com alto resíduo em  $\mathbf{y}$  (teor de extrato seco), sendo, portanto, retiradas do conjunto de calibração.

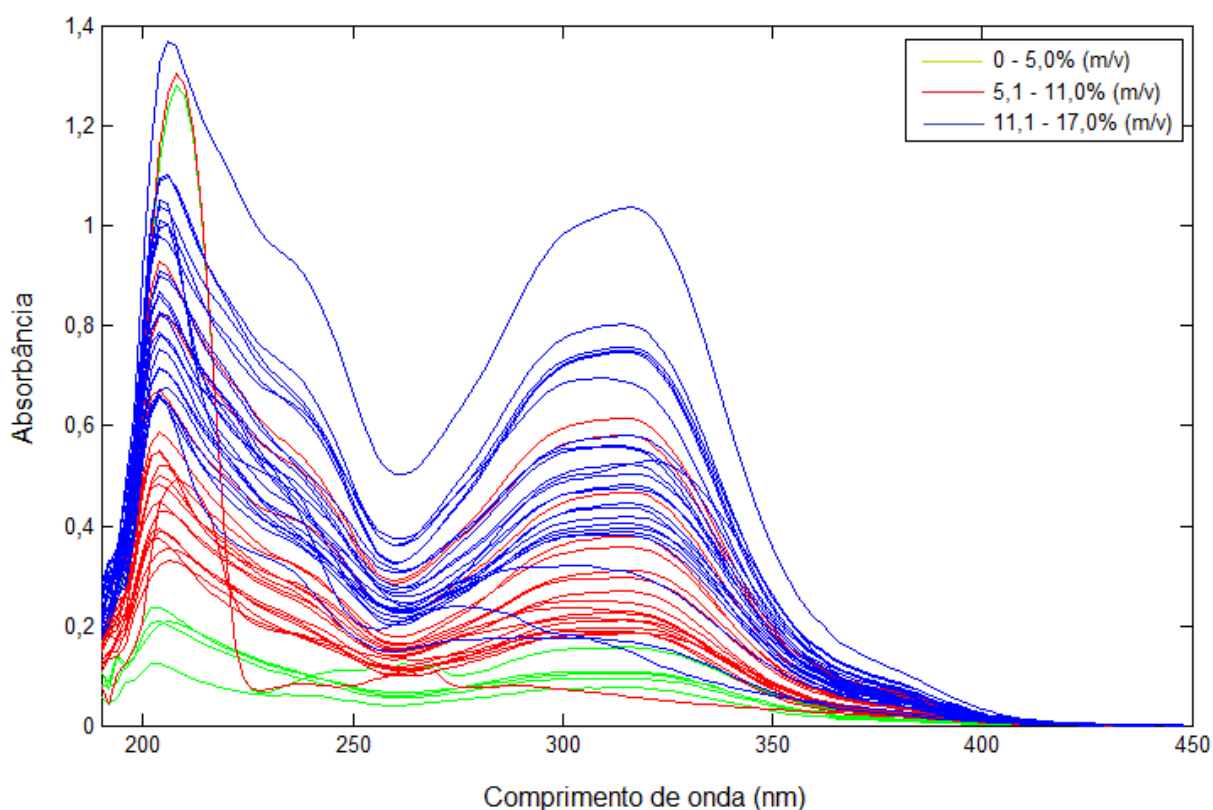


Figura 20. Espectros de absorção na região do UV-Vis de extratos de própolis.

A Figura 21 apresenta os testes realizados para a detecção de *outlier* nas etapas de calibração e validação do modelo final (segundo modelo construído), com um nível de confiança de 99%. Como pode ser observado não existem *outliers* no modelo, estando todas as amostras dentro dos limites estipulados para o *leverage* extremo (0,54) e para os resíduos em **X** e em **y**. Amostras que possuem um comportamento diferente das demais e a sua presença no conjunto de calibração podem levar a modelos com baixa capacidade de previsão, ou seja, que produzem altos valores de erro. Assim, torna-se importante a detecção de *outliers* para se obter modelos exatos, mais eficientes e com melhor capacidade de previsão [143].

A contribuição de cada variável (comprimentos de onda) na construção do modelo PLS está representada na Figura 22 através dos coeficientes de regressão. A utilização dos coeficientes de regressão torna possível a observação de um resumo de todos os pesos em todas as VLs utilizadas na construção do modelo. Assim, pode-se observar que as regiões em torno dos comprimentos de onda de 210, 230 e 330 nm possuem maior peso na construção do modelo PLS e as duas primeiras regiões (em torno de 210 e 230 nm) correspondem aos deslocamentos

batocrômicos para o comprimento de onda de 202 nm do benzeno (banda primária) e a região em torno de 330 nm corresponde ao deslocamento batocrômico da banda de 255 nm para o benzeno (banda secundária).

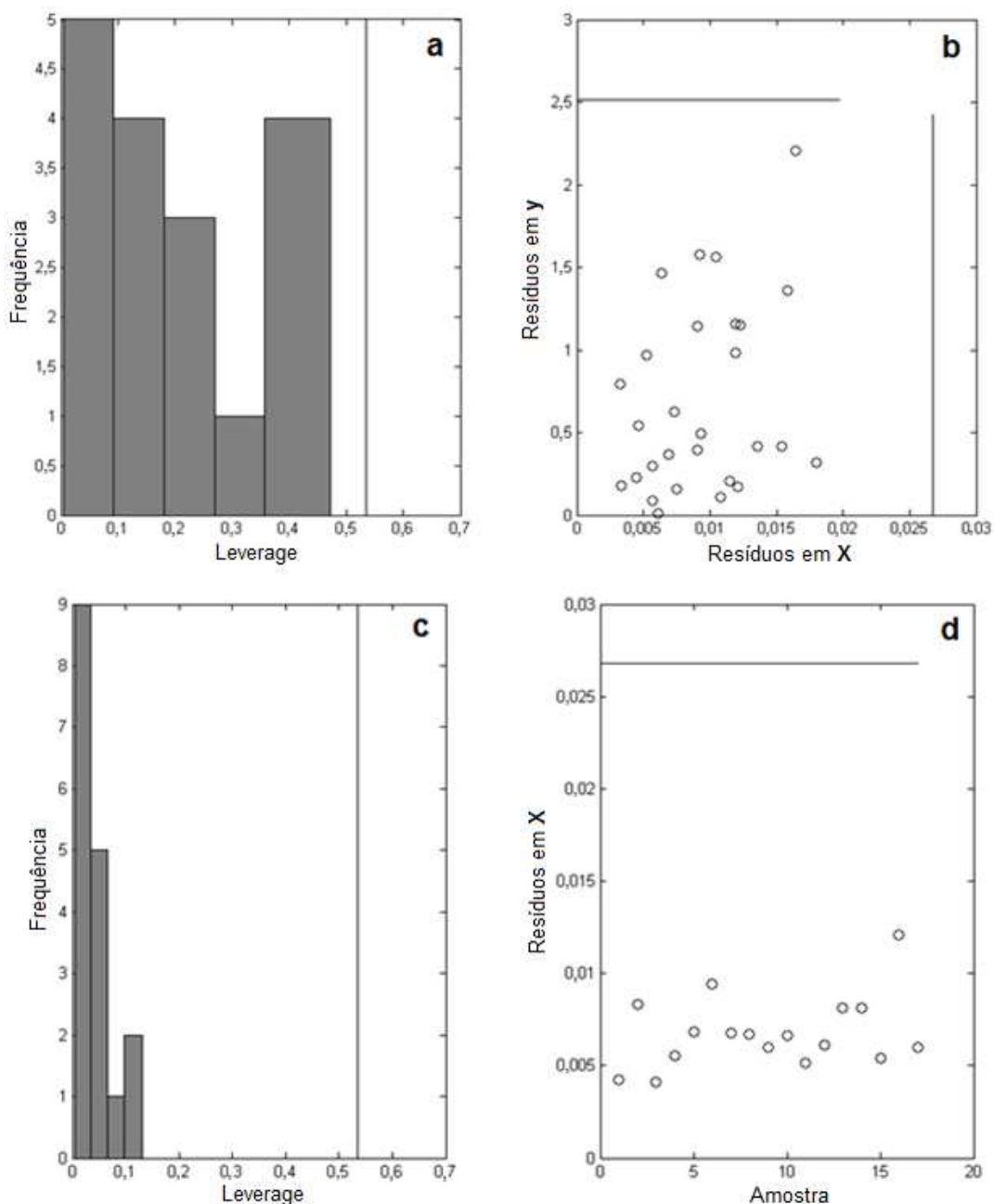


Figura 21. Detecção de *outlier* nas etapas de calibração e validação. (a) Histograma dos valores de *leverage* (calibração). (b) Gráfico dos resíduos no teor de extrato seco versus resíduos espectrais (calibração). (c) Histograma dos valores de *leverage* (validação). (d) Gráfico dos resíduos espectrais (validação). As linhas sólidas indicam os limites aceitáveis para a detecção de *outlier* em cada teste.

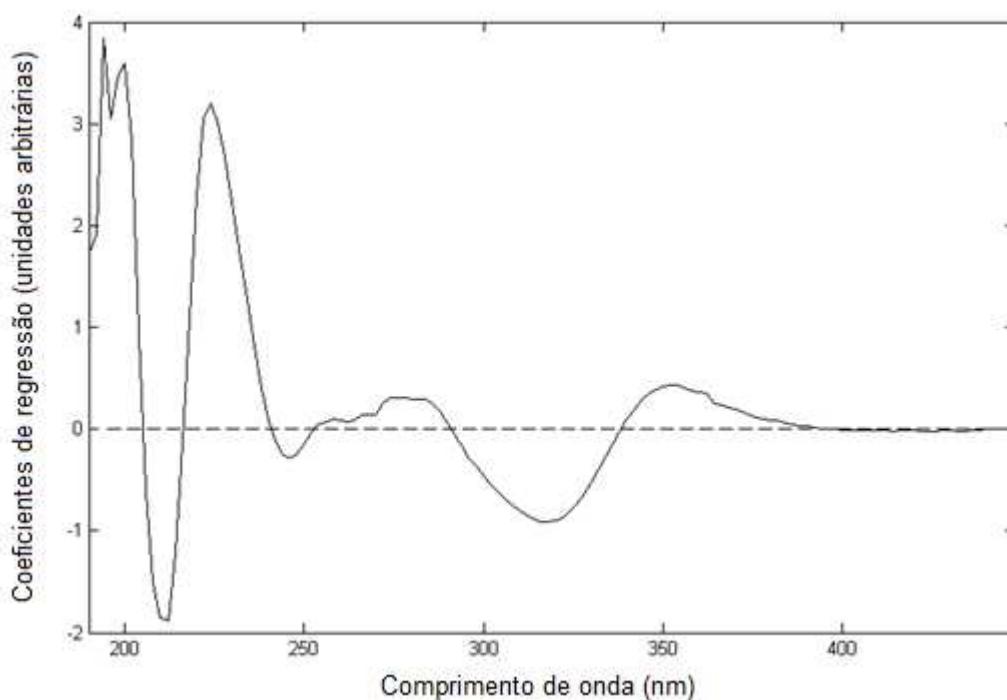


Figura 22. Coeficientes de regressão do modelo PLS.

A Figura 23 apresenta os resíduos (erros absolutos) versus os valores de referência dos teores de extrato seco, que pode indicar, de maneira qualitativa, a linearidade do modelo. Como pode ser observado, a distribuição dos resíduos das amostras de calibração e de validação apresentam comportamento aleatório, não indicando a presença de tendências sistemáticas nos dados, demonstrando que o modelo é linear.

Tendo a linearidade do modelo avaliada, o gráfico dos teores de extrato seco previstos pelo modelo PLS versus os teores de extrato seco utilizados como referência pode ser construído para estimar o coeficiente de correlação entre os dois conjuntos de dados, lembrando que, o coeficiente de correlação não pode ser utilizado, de maneira quantitativa, para avaliar a linearidade do modelo. A Figura 24 apresenta os valores previstos versus os de referência na etapa de calibração e validação, obtendo-se o coeficiente de correlação igual a 0,923, demonstrando a concordância entre estes valores e o bom ajuste do modelo.

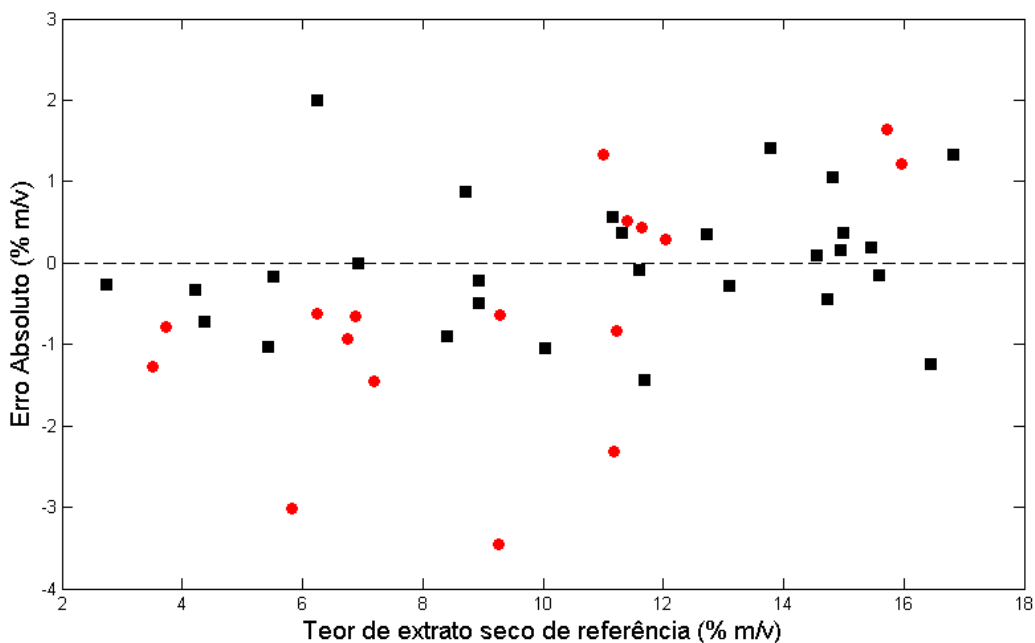


Figura 23. Gráfico dos erros absolutos versus os valores de referência para os teores de extrato seco. ■) amostras de calibração; ●) amostras de validação.

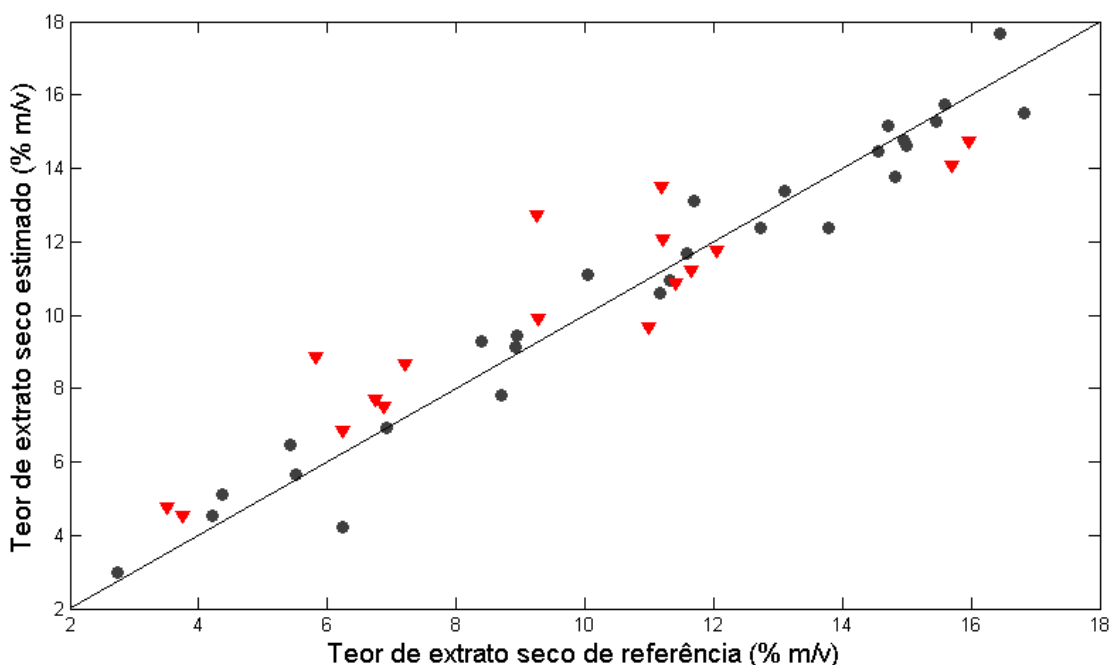


Figura 24. Valores previstos pelo modelo PLS versus os valores de referência para as amostras de calibração (●) e de validação (▼).

Para avaliar se os erros sistemáticos (bias) incluídos no modelo são significativos, um teste  $t$  utilizando as amostras de validação foi realizado baseando-se nas recomendações da norma ASTM E 1655-05 [21]. Segundo este teste, as possíveis influências destes erros no modelo e nos parâmetros estimados podem ser desprezadas, uma vez que o valor de  $t$  calculado (1,765) foi menor que o  $t$  crítico (2,109) tabelado da distribuição  $t$  de *Student*, com 95% de confiança e 17 graus de liberdade, demonstrando a concordância entre os valores.

A precisão do modelo foi avaliada em termos de repetitividade. A precisão média do modelo foi de 0,29% (m/v) com desvio padrão relativo médio de 4,0%, valor um pouco maior que o obtido pelo método gravimétrico de referência (1,5%), mas adequado às recomendações oficiais [146, 147].

Comumente, em aplicações envolvendo calibração multivariada, a exatidão é estimada através do RMSEP e por outros parâmetros como o RMSEC e RMSECV. Dentre esses parâmetros, o RMSEP é o mais adequado por ser estimado a partir de amostras de validação externa. Neste trabalho, os valores encontrados para RMSECV, RMSEC e RMSEP foram de 1,11; 0,81 e 1,53% (m/v), indicando um nível aceitável de dispersão e boa concordância. O erro relativo do modelo envolvendo as amostras de validação apresentou valor médio de 11,6%, com valor máximo, em módulo, de 16,7%.

Considerando os resultados obtidos na avaliação da linearidade, da precisão e exatidão do modelo, a faixa de trabalho do método foi estabelecida de 2,7 a 16,8% (m/v). As principais figuras de mérito estimadas para o modelo de calibração multivariada proposto neste trabalho estão sumarizadas na Tabela 10.

Tabela 10. Principais figuras de mérito estimadas para o modelo PLS proposto.

Figuras de mérito	Parâmetro	Valor
Exatidão	RMSECV <sup>a</sup>	1,11
	RMSEC <sup>a</sup>	0,81
	RMSEP <sup>a</sup>	1,53
Precisão	Repetitividade <sup>a</sup>	0,29
	Repetitividade (DPR) <sup>b</sup>	4,0
Regressão	Coeficiente de correlação	0,928
Faixa de trabalho <sup>a</sup>		2,7 – 16,8
Erro sistemático	$t_{bias}$	1,765
	$t_{0,05,17}$	2,109

<sup>a</sup> Valores expressos em % (m/v).

<sup>b</sup> Valor expresso em %.

### 4.3 Conclusões

A metodologia quimiométrica proposta para a determinação do teor de extrato seco em extratos comerciais de própolis, utilizando o PLS, mostrou-se uma alternativa adequada em relação à metodologia tradicional gravimétrica, por ser mais rápida, menos laboriosa, envolve pequenas quantidades de solventes e não gera grandes quantidades de resíduos quanto a metodologia gravimétrica, podendo ser implantada em simples laboratórios de análises de rotina, como um método de *screening*, para um melhor controle de qualidade de extratos alcoólicos comerciais de própolis.

## **CAPÍTULO 5**

### ***Otimização do Método Folin-Ciocalteu***

---

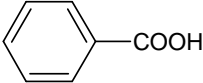
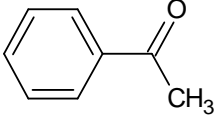
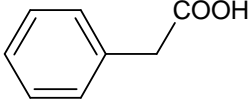
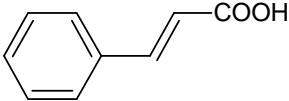
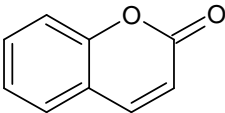
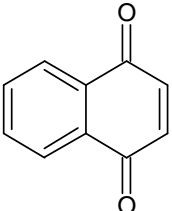
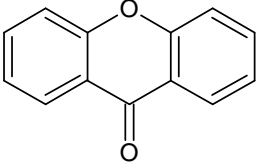
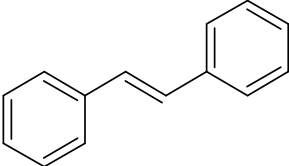
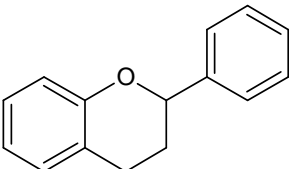
## 5 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO FOLIN-CIOCALTEU

Os compostos fenólicos compreendem uma grande variedade de moléculas que possuem grupos hidroxila ligados a anéis aromáticos. Os polifenóis são divididos em várias classes de acordo com o número de anéis fenólicos que a molécula pode conter e os elementos estruturais que se ligam a estes anéis. Os principais grupos de polifenóis são: flavonóides, ácidos fenólicos, taninos (hidrolisáveis e condensados), estilbenos e lignanas [115]. A Tabela 11 apresenta a estrutura básica de compostos fenólicos e polifenóis.

Muitos procedimentos analíticos têm sido desenvolvidos para a quantificação de compostos fenólicos totais em própolis. Embora métodos de separação como cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência sejam poderosas técnicas utilizadas para o isolamento e identificação de compostos fenólicos em amostras complexas, as técnicas de separação são demoradas, caras e muitas vezes não são adequadas para análises de rotina. Para quantificação de compostos fenólicos totais, a maioria dos métodos disponíveis é baseada na reação de compostos fenólicos com um reagente espectrofotométrico, permitindo assim a sua medição na região do visível [148]. Entre estes métodos, o ensaio de Folin-Ciocalteu é frequentemente aplicado [149, 150], e estudos recentes têm mostrado que fenóis totais, determinados por este método, podem ser correlacionados com a atividade antioxidante [151].

O método espectrofotométrico utilizando o reagente Folin-Ciocalteu foi inicialmente desenvolvido em 1927 para determinação de tirosina [152]. O reagente consiste de uma mistura de molibdato de sódio ou ácido fosfomolibdico, tungstato de sódio ou ácido fosfotúngstico e outros reagentes como ácido ortofosfórico e ácido clorídrico [153]. O método é baseado em uma reação de oxidação-redução em condições alcalinas, onde o íon fenolato é oxidado, enquanto o reagente de Folin é reduzido [154]. Após a reação com fenóis, uma cor azul é produzida, com absorção em 765 nm. A cor azul pode ser atribuída a espécies de Mo(V) complexado [153]. Muitos dos componentes ativos presentes na própolis, tais como ácidos fenólicos e flavonóides, têm um núcleo fenólico e podem ser avaliados por este método.

Tabela 11. Estruturas básicas de compostos fenólicos e polifenólicos.

Esqueleto	Classificação	Estrutura básica
$C_6-C_1$	Ácidos fenólicos	
$C_6-C_2$	Acetofenonas	
$C_6-C_2$	Ácidos fenilacéticos	
$C_6-C_3$	Ácidos hidroxicinâmicos	
$C_6-C_3$	Cumarinas	
$C_6-C_4$	Naftoquinonas	
$C_6-C_1-C_6$	Xantonas	
$C_6-C_2-C_6$	Estilbenos	
$C_6-C_3-C_6$	Flavonóides	

Fonte: Crozier et al. (2009)

O tampão carbonato de sódio (pH = 11,9) é adicionado para obter um meio alcalino, necessário à reação. Quando este é adicionado à solução contendo o reagente Folin (pH em torno de 0,9), o pH da solução é mantido em torno de 8,5. O meio básico proporciona a desprotonação dos grupos fenólicos facilitando o processo de complexação destes compostos com os metais presentes no reagente Folin.

Sabe-se que o reagente Folin-Ciocalteu reage não só com fenóis, mas também com uma variedade de outros tipos de compostos. As substâncias que podem reagir fortemente com este reagente, além de compostos fenólicos, incluem aminas alifáticas terciárias, triptofano, hidroxilamina, hidrazina, algumas purinas e diversos outros redutores orgânicos e inorgânicos. Entre a grande variedade de compostos nitrogenados que possuem alta reatividade com o Folin-Ciocalteu, pode-se destacar aminas alifáticas terciárias, aminas aromáticas (primárias, secundárias e terciárias), compostos *N*-hidroxila, compostos *N*-amino e compostos contendo cinco membros heterocíclicos de nitrogênio [156, 157]. Neste sentido, substâncias nitrogenadas representam um sério problema na aplicação deste reagente para o estudo de compostos fenólicos.

Em vários estudos presentes na literatura, envolvendo o método Folin-Ciocalteu para determinação de fenóis totais em extratos de própolis, diversas condições experimentais como o tempo de incubação para que a reação entre o reagente Folin-Ciocalteu e os fenóis presentes na matriz ocorra, a relação entre a quantidade de Folin e de tampão e o próprio comprimento de onda de leitura das absorções divergem entre si (Tabela 12).

Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi encontrar quais variáveis influenciam o processo de determinação de fenóis totais em extratos de própolis comerciais utilizando o método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu e otimizar as condições instrumentais para se obter um método exato.

Tabela 12. Condições experimentais para determinação de fenóis totais em extratos de própolis encontrados na literatura.

Referência	Concentração de ácido gálico ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração do extrato etanólico de própolis ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração de tampão $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (% m/v)	Volume de Folin-Ciocalteu (mL)	Volume de tampão $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (mL)	Tempo de reação (h)	Comprimento de onda (nm)	Teor de fenóis totais
[8]	2,0 a 9,0	60,0	Solução saturada	5,0	10,0	0,5	760	7,39% (m/m) <sup>1</sup>
[25]	-	100	-	0,5	0,2	-	765	0,7 a 9,3 mg/mL
[26]	-	20,0	10,0	0,5	0,5	1,0	760	42,9 a 302 mg/g <sup>2</sup>
[70]	-	90,0	4,0	2,5 (diluído 1:10)	2,0	2,0	740	232 mg/g <sup>3</sup>
[21]	-	-	10,0	0,5	0,5	1,0	760	98,7 mg/g <sup>3</sup>
[158]	-	-	Solução saturada	0,5	1,5	2,0	725	124 $\mu\text{g/g}$ <sup>4</sup>
[159]	-	20,0 mg/mL	10,0	0,5	0,5	1,0	700	151 e 329 mg/g <sup>2</sup>
[91]	-	20,0	10,0	0,5	0,5	1,0	760	31,2 a 299 mg/g <sup>2</sup>
[160]	-	-	7,5	1,0	8,0	1,0	765	2,5 a 8,4 mg/mL
[78]	5,0 a 100	200	4,0	2,5 (diluído 1:10)	2,0	2,0	740	2,58 mg/g <sup>1</sup>
[85]	1,0 a 165	25,0	-	0,5	0,5	0,5	700	10,7% (m/m) <sup>5</sup> e 5,2% (m/m) <sup>1</sup>
[81]	-	-	20,0	6,0	6,0	2,0	760	1,5 a 21,9% (m/m) <sup>1</sup>

<sup>1</sup> expresso como equivalente de ácido gálico em própolis *in natura*<sup>2</sup> mg de ácido gálico por g de extrato etanólico de própolis<sup>3</sup> equivalentes de ácido gálico<sup>4</sup>  $\mu\text{g}$  de ácido gálico por g de extrato de própolis aquoso liofilizado<sup>5</sup> expresso como equivalente de ácido gálico em extrato seco

## 5.1 Materiais e métodos

### 5.1.1 Amostras e reagentes

Para determinação do teor de fenóis totais, o reagente Folin-Ciocalteu foi adquirido comercialmente (Imbralab). O reagente é composto de uma mistura de molibdato de sódio, tungstato de sódio, ácido ortofosfórico, ácido clorídrico e sulfato de lítio. Carbonato de sódio (Sigma-Aldrich) foi utilizado como tampão, sendo preparadas soluções a 20% (m/v). O ácido gálico (Sigma-Aldrich) foi utilizado como padrão para a determinação dos compostos fenólicos totais. Na preparação da solução padrão de ácido gálico, este foi solubilizado em água deionizada por 5 minutos em banho de ultrassom, sendo a solução preparada na concentração de 1000 µg/mL, utilizada no mesmo dia e permanecendo ao abrigo da luz.

Extratos de própolis comerciais comum e verde, envazados em várias cidades das regiões sul e sudeste do Brasil, foram utilizados para a determinação dos teores de fenóis totais presentes nos mesmos. Na metodologia espectrofotométrica, 5,0 µL de extrato foram misturados com uma pequena quantidade de água deionizada e 0,5 mL de Folin-Ciocalteu. Essa mistura permaneceu ao abrigo da luz por 8 minutos e, depois desse período, foi adicionado 1,0 mL de tampão carbonato de sódio a 20% (m/v). O volume da solução foi completado para 25 mL com água deionizada e esta permaneceu ao abrigo da luz por 30 minutos. Após esse tempo, a solução foi analisada espectrofotometricamente na faixa de comprimentos de onda descrita anteriormente. Para cada amostra foram preparadas quintuplicatas independentes e cada uma foi lida em triplicata.

### 5.1.2 Instrumentação e software

Para os estudos espectrofotométricos foi utilizado um espectrofotômetro da marca Hewlett-Packard, modelo 8451A, com cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm. Os espectros de absorção de cada amostra foram obtidos realizando uma varredura do comprimento de onda de 190 a 820 nm, com incrementos de 2 nm.

Nos estudos nefelométricos referentes à determinação do teor de fenóis totais em extratos de própolis a partir da otimização do método Folin-Ciocalteu, foi utilizado um espectrofluorímetro da marca Shimadzu RF-5301, com lâmpada de

xenônio, do qual espectros de emissão na região do UV-Vis foram obtidos na faixa de 550 a 650 nm, com incrementos de 1 nm e excitação em 600 nm, utilizando cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm.

Um espectrômetro dispersivo de energia (Shimadzu EDX-800, Quioto, Japão) equipado com tubo de ródio e detector de Si(Li) refrigerado com nitrogênio líquido, foi utilizado nas análises de fluorescência de raios X. Para as análises, as condições de excitação foram: voltagem do tubo de 50 kV, corrente do tubo de 28 mA, tempo de aquisição do espectro de 100 segundos e a atmosfera utilizada foi ar. A faixa de elementos avaliada variou do sódio ao urânio, sem a utilização de filtro.

Um difratômetro Rigaku (Tóquio, Japão) modelo Geiger Flex, operando na geometria convencional  $\theta - 2\theta$ , foi utilizado nas análises de difração de raios X. Um tubo de cobre foi utilizado e as condições de excitação foram corrente de 40 mA, voltagem de 40 kV e taxa de escaneamento de 4° por minuto. A radiação utilizada foi a  $K_{\alpha}$  do cobre ( $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ ), sendo as medidas realizadas em temperatura ambiente.

Para a realização dos planejamentos fracionário, fatorial e composto central, foi utilizado o software Statistica 7 (StatSoft). Os espectros na região UV-Vis das amostras de extrato de própolis tiveram a linha base corrigida através do algoritmo *baseline* do PLS Toolbox, versão 5.2 (Eigenvector Technologies, Manson, USA) e do software Matlab versão 7.9 (The MathWorks, Natick, USA).

### 5.1.3 Otimização da metodologia espectrofotométrica

Nos estudos de triagem das variáveis significativas do método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu e na sua otimização, quantidades adequadas da solução padrão de ácido gálico foram adicionadas a balões volumétricos de 25 mL, conforme os níveis estabelecidos em cada planejamento (Tabelas 13, 14 e 15). Quantidades avaliadas do reagente Folin-Ciocalteu foram adicionadas aos balões, os quais permaneceram ao abrigo da luz por 8 minutos. Após esse período, quantidades adequadas de tampão de carbonato de sódio foram adicionadas e o volume completado com água deionizada. Períodos de incubação foram avaliados na faixa de 30 minutos a 2 horas.

Na triagem das variáveis significativas para determinação de fenóis totais em extratos de própolis foi avaliado o efeito das variáveis: concentração de ácido gálico, volume do reagente Folin-Ciocalteu, volume do tampão carbonato de sódio a 20% (m/v) e o tempo de reação. Após a seleção das variáveis significativas (volumes dos reagentes Folin e tampão), um planejamento fatorial completo com ponto central foi utilizado para avaliar a influência das variáveis na determinação dos compostos fenólicos totais, bem como suas possíveis interações. O tempo foi fixado em 30 minutos e a concentração de ácido gálico foi fixa em 10,0 µg/mL para todos os ensaios. As variáveis e os níveis utilizados na construção do planejamento fatorial estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com ponto central (n = 3).

Variáveis	Nível baixo	Ponto	Nível alto
	(-)	central	(+)
Volume do reagente Folin-Ciocalteu (mL)	0,5	2,75	5,0
Volume de tampão Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (20% m/v)	0,5	5,25	10,0

A partir da avaliação da influência das variáveis e suas interações, um planejamento composto central foi construído utilizando como ponto central os valores que indicaram aumento da resposta no planejamento fatorial. As variáveis e os níveis utilizados na construção deste planejamento estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Planejamento composto central para otimização dos volumes de Folin e tampão carbonato de sódio.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Volume do reagente Folin-Ciocalteu (mL)	1,83	2,75	5,0	7,25	8,17
Volume de tampão Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (20% m/v)	3,3	5,25	10,0	14,75	16,7

Objetivando encontrar o máximo de absorção possível da radiação UV-Vis e um mínimo de espalhamento da mesma, um novo planejamento composto central foi realizado utilizando os níveis e as variáveis apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Planejamento composto central para otimização de pontos de máximo de absorção e mínimo de espalhamento da radiação.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Volume do reagente Folin-Ciocalteu (mL)	0,09	0,5	1,5	2,5	2,91
Volume de tampão Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (20% m/v)	0,17	1,0	3,0	5,0	5,83

#### 5.1.4 Análise por fluorescência de raios X e difração de raios X

As soluções que apresentaram sólidos em suspensão, no processo de otimização da metodologia espectrofotométrica, foram filtradas e o resíduo obtido foi lavado com água deionizada. Este último foi levado à estufa para secagem à temperatura em torno de 70 °C. O resíduo obtido foi um sólido cristalino branco e este, após a secagem, foi pulverizado num graal de ágata para posteriores análises por fluorescência e difração de raios X.

#### 5.1.5 Parâmetros de mérito

##### 5.1.5.1 Escolha do método dos mínimos quadrados

A utilização inadequada de um método para realizar uma regressão linear pode contribuir com um erro sistemático no processo de medição. Neste sentido, antes de realizar a calibração, foi avaliado o comportamento das variâncias das respostas instrumentais. O método dos mínimos quadrados ponderado (MMQP) pode ser aplicado nos casos em que as variâncias apresentem comportamentos aleatórios (comportamento homocedástico) ou nos casos em que as variâncias apresentem comportamento heterocedástico, como por exemplo, um comportamento crescente das variâncias. O método dos mínimos quadrados ordinário (MMQO) só pode ser utilizado nos casos em que se observa um comportamento homocedástico das variâncias. O MMQO não inclui o valor da variância obtida em cada ponto da curva de calibração, na construção da regressão linear. Já o MMQP inclui esse valor na construção da regressão.

### 5.1.5.2 Avaliação da qualidade do ajuste

Para avaliar a qualidade dos ajustes feitos pelo método dos mínimos quadrados, escolhidos nos princípios do item anterior, utilizou-se os resíduos padronizados, que consistem no resíduo dividido pela incerteza em cada ponto da curva de calibração. Para um bom ajuste, os resíduos padronizados devem ter valores, em módulo, em torno de 1 [161].

### 5.1.5.3 Linearidade

Após a verificação da ausência de valores discrepantes para cada nível de concentração, utilizado na curva de calibração e avaliação da homocedasticidade dos dados, a linearidade da regressão foi avaliada em função do coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ), abrangendo a faixa de 1,0 a 8,0  $\mu\text{g/mL}$  para o ácido gálico. Esta faixa de concentração foi escolhida por ser a faixa que engloba a maioria das absorbâncias apresentadas pelas soluções de extrato de própolis. As curvas analíticas foram construídas com as soluções padrão aquosas, com triplicatas independentes em cada ponto da calibração, lidas em triplicatas aleatórias.

### 5.1.5.4 Limites de detecção e de quantificação

Para a determinação dos limites de detecção e de quantificação foram preparadas 10 replicatas independentes do branco (reagente Folin-Ciocalteu + tampão carbonato de sódio a 20% m/v), fortificadas na mais baixa concentração do analito (ácido gálico) utilizada na curva de calibração. Estas soluções foram posteriormente lidas em triplicatas aleatórias. O desvio padrão das medidas foi utilizado no cálculo destes parâmetros de mérito, calculados através das equações:

$$LD = 3 s \quad (\text{Eq. 12})$$

$$LQ = 10 s \quad (\text{Eq. 13})$$

onde  $s$  é o desvio padrão das medidas. A adição de analito às soluções do branco foi realizada com o objetivo de encontrar valores mais realísticos, sendo que, a presença do analito nas amostras fornecerá respostas que envolverão o

comportamento do analito juntamente com seus interferentes e não apenas a flutuação do branco [162, 163]. As medidas foram realizadas empregando-se as condições adequadas encontradas na otimização multivariada.

#### 5.1.5.5 Precisão

A precisão do método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu, expressa em termos da repetitividade, foi avaliada através do desvio padrão relativo (%) obtido a partir de sete amostras independentes, lidas em triplicatas aleatórias, fortificadas em três níveis de concentração para cada analito, sendo estudadas as concentrações de 1,0, 4,0 e 8,0  $\mu\text{g/mL}$  do ácido gálico.

## 5.2 Resultados e Discussão

### 5.2.1 Otimização multivariada

Uma triagem foi realizada visando identificar as variáveis que são significativas na determinação do teor de fenóis totais em extratos de própolis. Sabe-se que quanto maior a concentração de fenóis maior será a resposta na absorção da radiação e que, o reagente complexante (Folin) e o tampão adicionado ao meio, são importantes no processo de complexação.

Como os estudos presentes na literatura abordam diferentes comprimentos de onda de leitura e tempos de reação, avaliou-se inicialmente o comprimento de onda de máxima absorção. Observou-se que no comprimento de onda de 760 nm ocorre o máximo de absorção para o padrão de ácido gálico e para os extratos de própolis estudados, sendo este valor fixado para as medições.

A Figura 25 apresenta um espectro de absorção da radiação UV-Vis do ácido gálico após complexação com o Folin, seguido de tamponação com o carbonato de sódio. Como pode ser observado, o espectro apresenta duas bandas características, sendo que somente o comprimento de onda de máxima absorção na banda na região do visível é utilizado na determinação do teor de fenóis totais, através da metodologia espectrofotométrica Folin-Ciocalteu. A primeira banda não é utilizada por apresentar uma grande quantidade de ruídos.

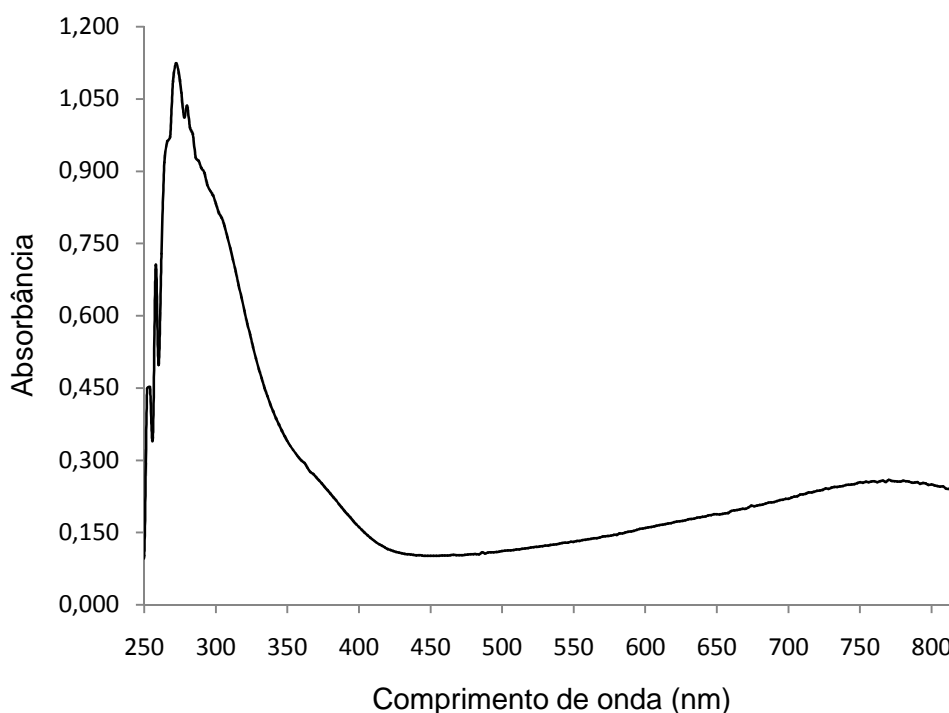


Figura 25. Espectro de absorvância na região UV-Vis, de uma solução 2,0  $\mu\text{g/mL}$  de ácido gálico obtida após reação com o reagente Folin-Ciocalteu.

Posteriormente, avaliou-se o tempo de reação na faixa de 30 a 120 minutos em três níveis de concentração de ácido gálico (1,0; 5,0 e 10,0  $\mu\text{g/mL}$ ). A Figura 26 mostra que, nesse intervalo de tempo, a absorvância nos três níveis de concentração de ácido gálico se mantém constante, demonstrando a não influência desta variável na determinação do teor de fenóis totais. Assim, tempos de apenas 30 minutos são adequados para que a reação aconteça, não necessitando de longos períodos como duas horas, que é o período mais utilizado em trabalhos da literatura, tornando, dessa maneira, a metodologia estudada mais rápida.

Um planejamento fatorial  $2^2$  com ponto central foi realizado para verificar a influência das variáveis volume de Folin e volume de tampão na absorção da radiação em 760 nm. A concentração de ácido gálico foi fixada em 10,0  $\mu\text{g/mL}$  por ser a concentração mais alta que será utilizada em estudos posteriores, e o tempo de reação foi fixado em 30 minutos por não apresentar influência significativa na resposta instrumental, como visto anteriormente.

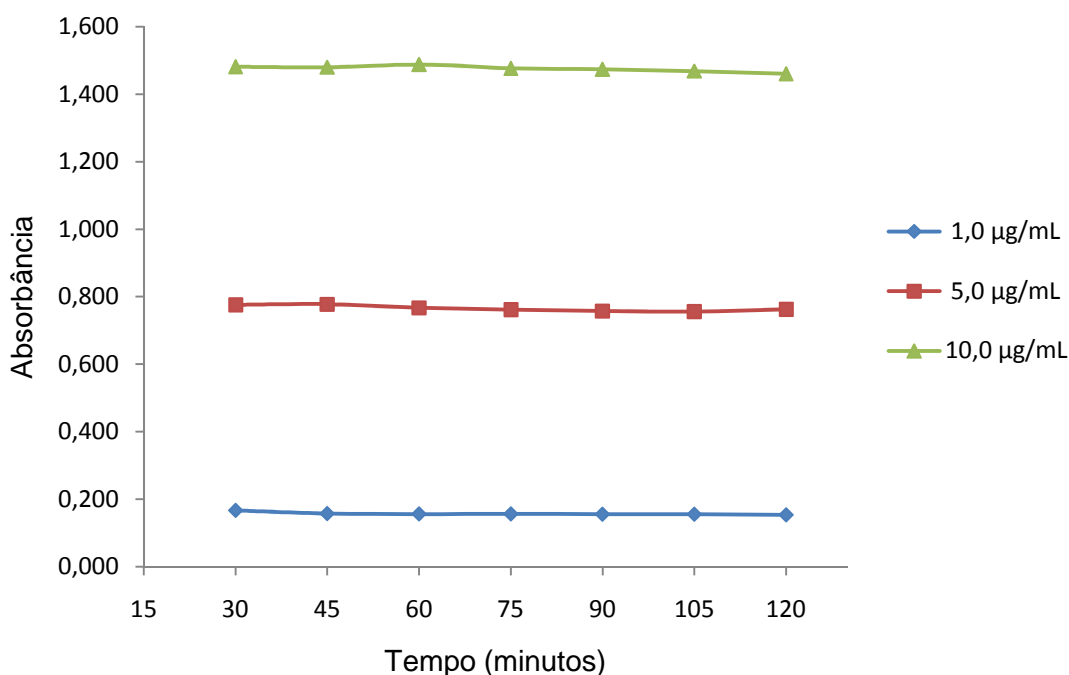


Figura 26. Absorbância obtida em vários tempos de reação.

Várias soluções branco foram preparadas de acordo com as combinações dos volumes de Folin e de tampão em cada experimento realizado no planejamento fatorial. As variáveis e os níveis utilizados na construção do planejamento fatorial estão apresentados na Tabela 13. Um total de sete ensaios foi realizado nessa etapa, na qual as variáveis estudadas e sua interação mostraram-se significativas, como pode ser observado na Figura 27.

As variáveis estudadas e a interação entre elas apresentaram efeitos significativos positivos, sendo o volume de tampão o efeito mais importante. Como a interação entre os dois fatores estudados foi significativa, torna-se necessário interpretar os efeitos dos volumes de Folin e tampão conjuntamente.

Quando se eleva o volume de tampão (Figura 28), para um volume fixo de Folin, ocorre um aumento na absorção da radiação UV-Vis, mas esse efeito é mais pronunciado com o volume de 5,0 mL de Folin. Com o volume de tampão fixado no nível inferior de 0,5 mL observa-se que quando se eleva o volume de Folin ocorre uma diminuição no valor da absorbância, enquanto que, no volume de tampão fixo em 10 mL, ocorre um aumento da mesma. O maior valor da resposta (absorbância) foi obtido utilizando 5,0 mL de Folin e 10 mL de tampão.

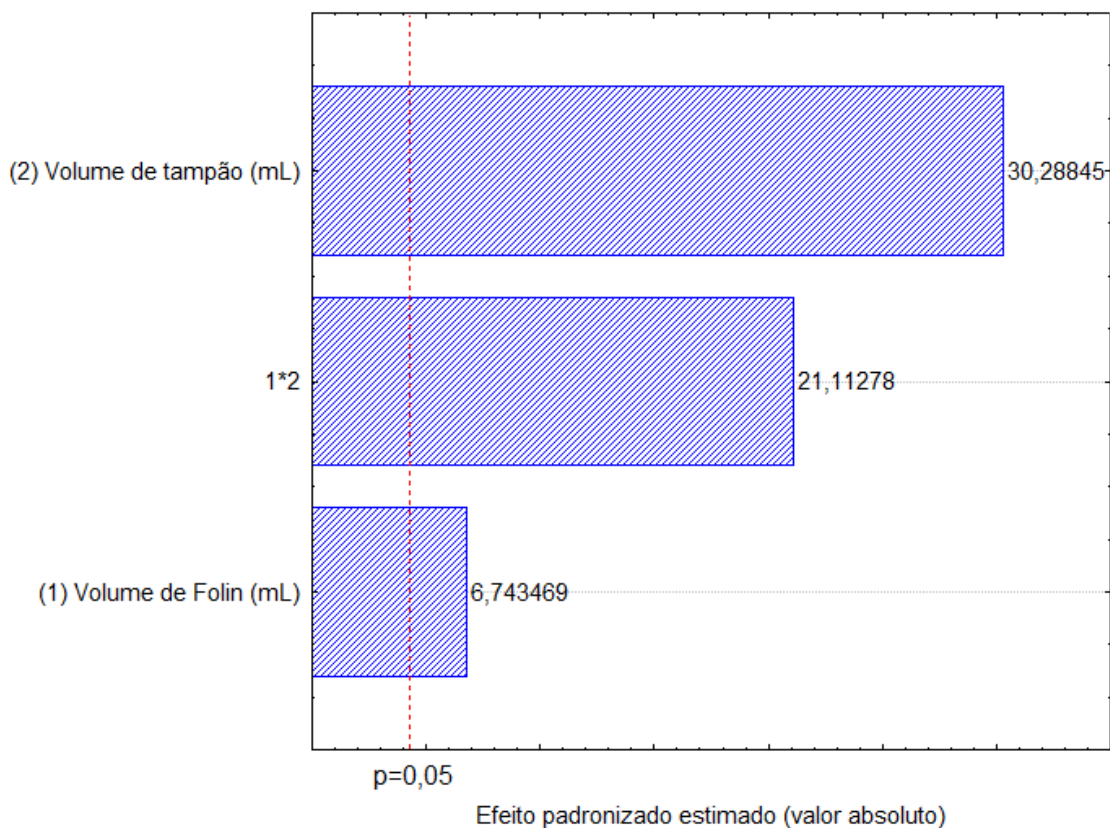


Figura 27. Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial  $2^2$ .

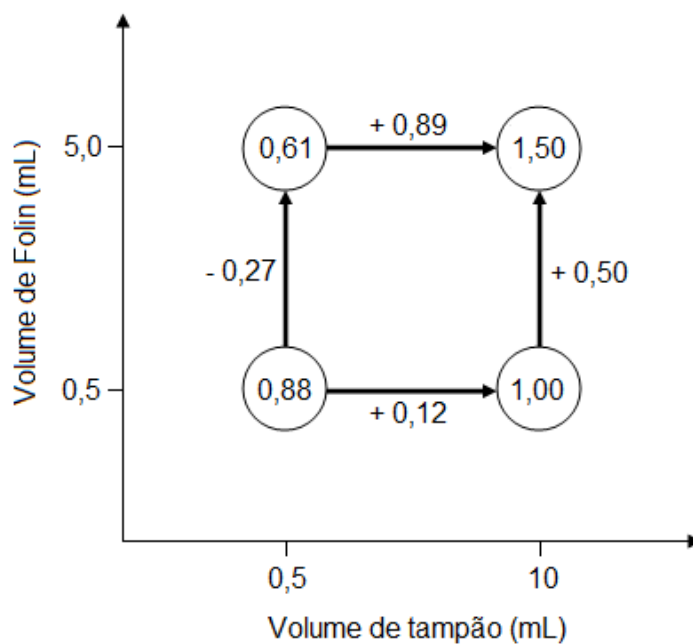


Figura 28. Diagrama para interpretação dos efeitos dos volumes de Folin e de tampão, no planejamento fatorial  $2^2$ . Os valores nos vértices do quadrado são as respostas médias (absorbâncias).

Como o objetivo deste estudo era de maximizar o valor de absorbância, estudos na região de 5,0 mL de Folin e 10,0 mL de tampão foram realizados. Um planejamento composto central foi construído para otimizar as quantidades do reagente Folin e de tampão, utilizando os volumes dos reagentes citados acima como ponto central do planejamento. Um total de 11 ensaios foram realizados e os níveis dos reagentes utilizados na construção do planejamento composto central estão descritos na Tabela 14.

Uma região indicando um valor máximo de absorção foi encontrada para os volumes de 9,0 mL de Folin e 15,0 mL de tampão, entretanto deslocou-se os pontos do planejamento ao longo do caminho de máxima inclinação, no qual a resposta varia de forma mais pronunciada, objetivando um ponto de máximo. Os volumes citados acima foram adotados como as condições no ponto central do planejamento. No entanto, neste novo planejamento composto central, turvação das soluções e presença de sólidos em suspensão foi verificada, indicando que os máximos de absorção obtidos até o momento são, na verdade, referentes não a absorção da radiação e sim de turbidez da mesma. Os sólidos formados nessa etapa foram separados para posterior avaliação da sua composição química, por estudos espectrométricos de raios X.

Nesse sentido, tomou-se o cuidado de avaliar máximos de absorção da radiação UV-Vis para mínimos de espalhamento da mesma. Novos planejamentos composto central foram realizados juntamente com estudos envolvendo nefelometria. Os mesmos pontos do planejamento foram analisados por espectroscopia no UV-Vis na faixa de 190 a 820 nm e por nefelometria na faixa de 550 a 650 nm, que corresponde à região de espalhamento de segunda ordem, para avaliar respostas de absorção (pontos de máximo) e de espalhamento (pontos de mínimo) da radiação juntamente.

Um planejamento composto central foi realizado utilizando-se os níveis apresentados na Tabela 15, para soluções com concentração de ácido gálico a 10,0 µg/mL, com tempo de reação de 30 minutos. As variáveis de resposta utilizadas foram a absorbância em 760 nm e a emissão em 601 nm, no qual, para esta última, larguras das fendas de 3 nm para excitação e 3 nm para emissão foram utilizados, com excitação em 600 nm.

Os resultados do planejamento composto central estão apresentados na Tabela 16. As soluções preparadas nas condições adequadas apresentaram

diversas cores, variando do verde ao azul acinzentado. As soluções dos ensaios 2 e 11, por exemplo, apresentaram uma coloração verde, indicando que a relação entre os volumes dos reagentes Folin e de tampão não foram adequadas para produzir os complexos fenólicos, que dão à solução uma coloração azul intensa. Os valores de absorvância destas soluções foram menores do que as soluções que apresentaram uma coloração azul intensa, indicando uma relação entre a coloração e a quantidade de compostos fenólicos complexados. As intensidades de espalhamento da radiação dessas soluções foram baixas em relação às demais, sendo que, em ambos os ensaios, o volume de tampão foi menor do que o volume de Folin.

Já para o ensaio 8, a solução apresentou coloração azul acinzentado, com o menor valor de absorção da radiação UV-Vis e maior valor de espalhamento da mesma. Como pode ser observado na Tabela 16, uma quantidade pequena de Folin foi utilizada em relação à quantidade de tampão, sendo essa diferença a possível responsável pelo alto espalhamento da radiação.

Tabela 16. Resultados do planejamento composto central para um máximo de absorção e um mínimo de espalhamento.

Ensaio	$x_1^*$	$x_2^*$	Volume de Folin (mL)	Volume de tampão (mL)	Absorvância em 760 nm	Emissão em 601 nm
1	-1	-1	0,50	1,00	1,030	67,4
2	+1	-1	2,50	1,00	0,894	124,7
3	-1	+1	0,50	5,00	1,067	291,6
4	+1	+1	2,50	5,00	1,471	201,0
5 (PC)	0	0	1,50	3,00	1,342	126,2
6 (PC)	0	0	1,50	3,00	1,350	127,0
7 (PC)	0	0	1,50	3,00	1,369	126,8
8	$-\sqrt{2}$	0	0,09	3,00	0,337	461,3
9	0	$+\sqrt{2}$	1,50	5,83	1,359	291,7
10	$+\sqrt{2}$	0	2,91	3,00	1,258	173,7
11	0	$-\sqrt{2}$	1,50	0,17	0,535	99,5

\* Valores codificados com  $x_1$  para volume de Folin-Ciocalteu e  $x_2$  para volume de tampão carbonato de sódio a 20% (m/v).

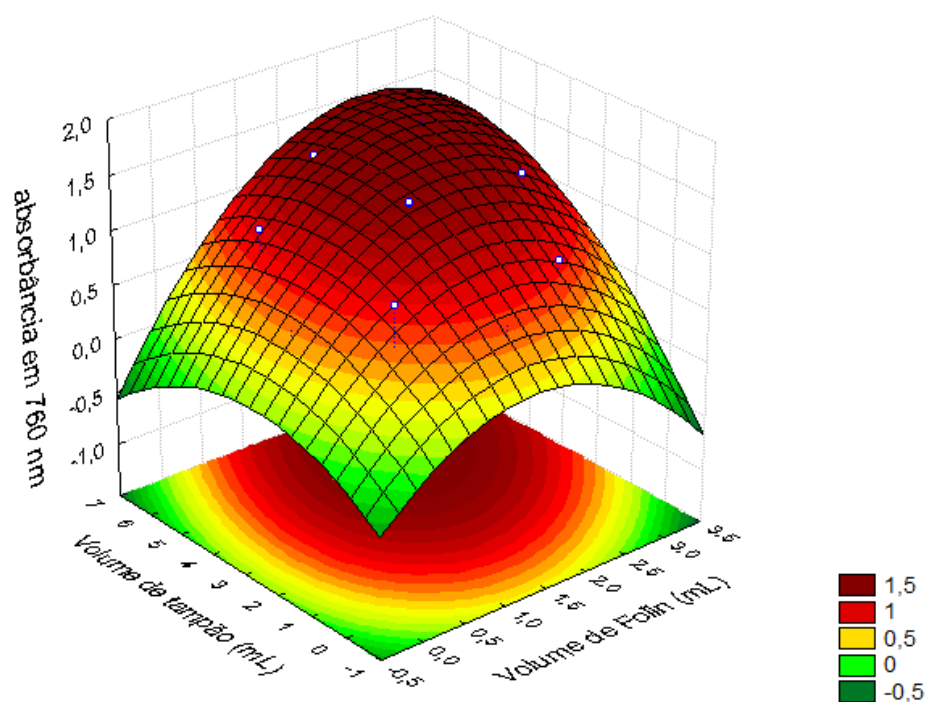
As condições experimentais do primeiro ensaio, apresentadas na Tabela 16, foram as que proporcionaram menor espalhamento da radiação e as do oitavo ensaio foram as que proporcionaram maior espalhamento da mesma, indicando, dessa maneira, a presença de materiais em suspensão, mesmo não sendo possível a visualização destes materiais a olho nu.

As superfícies de resposta (Figura 29) construídas a partir dos dados apresentados na Tabela 16, mostram um máximo de absorção da radiação UV-Vis com valores críticos de 2,31 mL de reagente Folin e 5,33 mL de tampão no ponto de máximo (Figura 29(a)) e um mínimo de espalhamento da radiação com valores críticos de 1,61 mL de reagente Folin e 0,83 mL de tampão (Figura 29(b)). Estes valores podem ser melhor visualizados através das curvas de nível (Figura 30), nas quais pode-se observar que o ponto de máximo encontrado para a absorção da radiação não coincide com o ponto de mínimo de espalhamento da mesma.

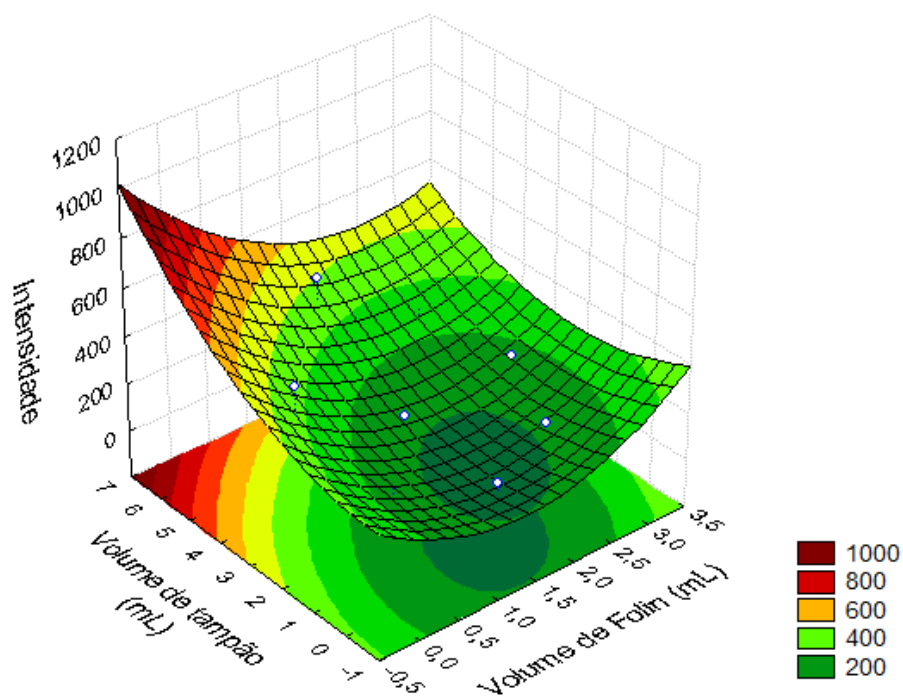
Os espalhamentos da radiação em todos os pontos do planejamento composto central foram avaliados em relação ao espalhamento da água deionizada utilizada na preparação das soluções. Como pode ser observado na Figura 31, o ensaio 1, de menor valor de espalhamento em relação aos demais, apresentou espalhamentos semelhantes ao da água deionizada. O ensaio 11 também apresentou espalhamentos próximos ao da água deionizada, porém maiores do que os obtidos no primeiro ensaio, com a desvantagem de se utilizar uma quantidade de reagente Folin maior, aumentando, assim, o custo da análise.

Neste sentido, as condições do primeiro ensaio, que correspondem a um volume de 0,5 mL de reagente Folin e 1,0 mL de tampão a 20% (m/v), foram as escolhidas como a melhor opção para a determinação de fenóis totais através do método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu, por apresentarem ao mesmo tempo baixo espalhamento da radiação e adequados valores de absorção da radiação UV-Vis. Os volumes acima citados de cada reagente foram utilizados nos ensaios posteriores da otimização desta metodologia.

A otimização experimental do método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu teve como vantagens a redução nas quantidades dos reagentes Folin e tampão em relação a vários trabalhos presentes na literatura e a redução do tempo de análise para 30 minutos, sendo que, períodos de até duas horas são utilizados na literatura para a mesma análise. Estes fatores tornam a metodologia colorimétrica mais rápida e com um menor custo em relação a outras metodologias propostas na literatura.

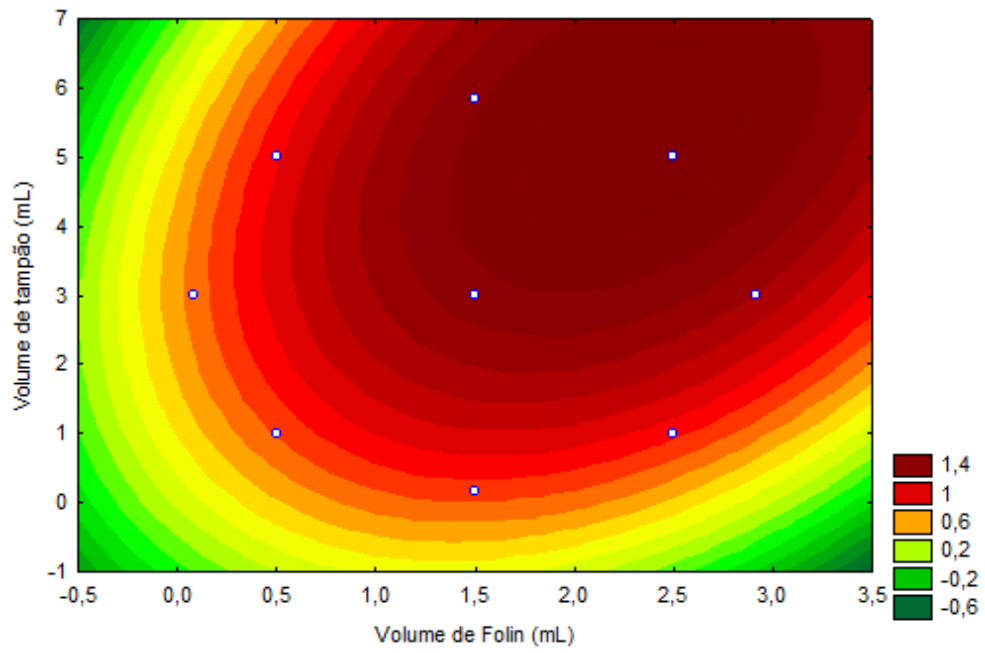


(a)

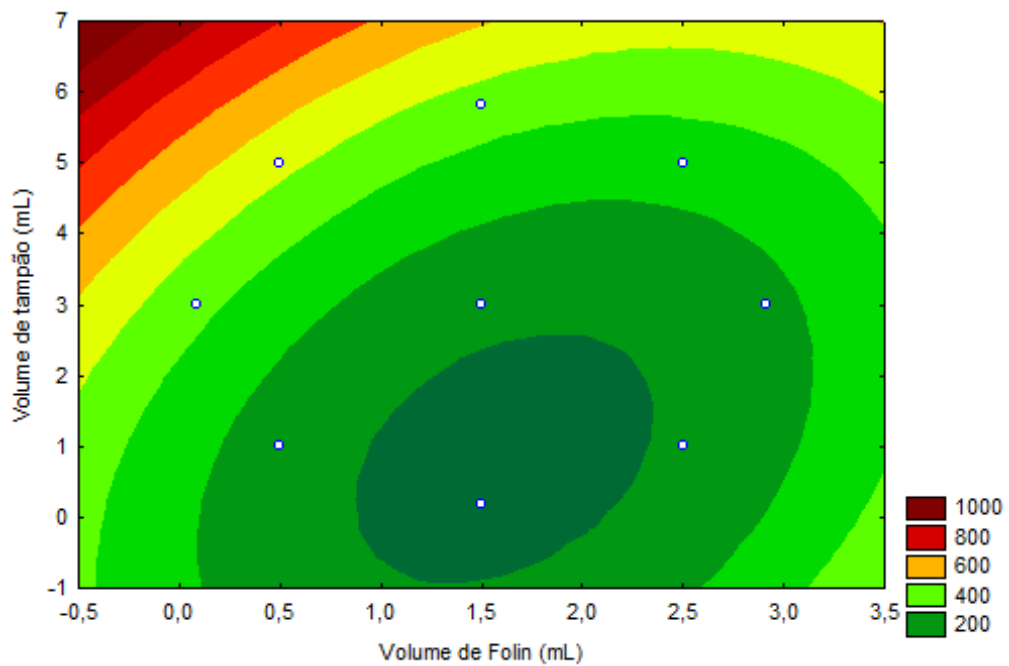


(b)

Figura 29. Superfícies de resposta para o planejamento composto central.  
 (a) Para um máximo de absorção da radiação UV-Vis. (b) Para um mínimo de espalhamento da mesma.



(a)



(b)

Figura 30. Curvas de nível para o planejamento composto central. (a) Para um máximo de absorção da radiação. (b) Para um mínimo de espalhamento.

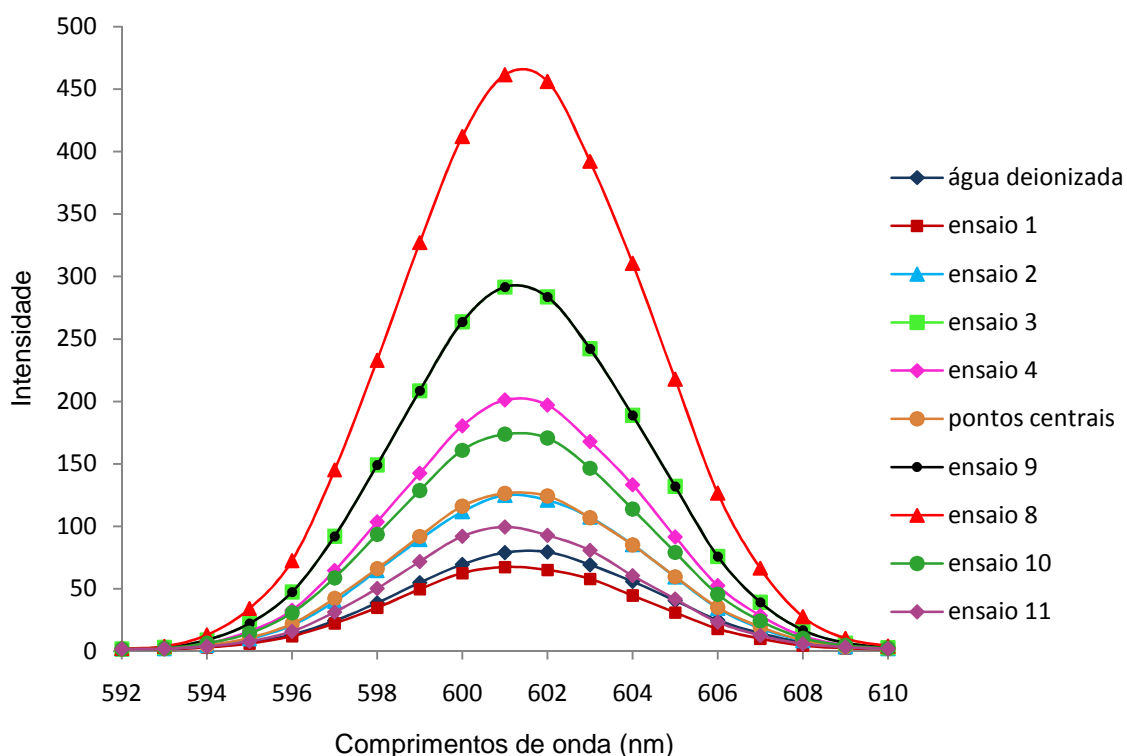


Figura 31. Espalhamentos da radiação em todos os pontos do planejamento composto central.

### 5.2.2 Avaliação do espalhamento da radiação em extratos de própolis

Após otimização das condições experimentais para o emprego do método espectrofotométrico na determinação do teor de fenóis totais, extratos das regiões sul e sudeste, dos tipos comum e verde e com diferentes teores de extrato seco, foram utilizados para avaliação do espalhamento da radiação de extratos de própolis. O volume de 5  $\mu\text{L}$  de extrato foi utilizado juntamente com 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu e 1,0 mL de tampão carbonato de sódio a 20% (m/v), seguindo as condições já descritas na parte experimental, para a metodologia espectrofotométrica. A Tabela 17 apresenta os extratos estudados, com as respectivas intensidades de espalhamento da radiação em 601 nm e absorvância em 760 nm.

Tabela 17. Espalhamento da radiação e absorvância de extratos de própolis, na determinação do teor de fenóis totais.

Amostra	Estado	Região	Teor de extrato seco (% m/v)	Intensidade (em 600 nm)	Absorvância (em 760 nm)	
água deionizada	-	-	-	4,5	-	
branco	-	-	-	48,4	-	
Comum	C8	MG	Sudeste	5,43 ± 0,06	87,7	0,537
	C14	MG		3,51 ± 0,04	75,5	0,193
	C17	SP		2,74 ± 0,06	193,7	0,289
	C26	SP		15,05 ± 0,19	31,8	0,577
	C68	MG		15,48 ± 0,45	122,9	0,499
	C75	SP		16,69 ± 0,39	185,4	0,309
Verde	V3	SP	Sudeste	5,83 ± 0,05	95,8	0,221
	V9	SP		6,10 ± 0,06	101,9	0,230
	V22	SP		7,24 ± 0,17	51,3	0,427
	V6	MG		17,88 ± 0,61	31,8	0,852
	V23	SP		16,50 ± 0,21	63,5	0,700
	V25	MG		15,93 ± 0,31	24,2	0,904
Comum	C101	RS	Sul	5,57 ± 0,21	98,1	0,262
	C41	PR		5,40 ± 0,06	104,7	0,495
	C77	PR		5,56 ± 0,08	155,2	0,900
	C38	SC		15,58 ± 0,19	111,6	0,826
	C81	SC		15,82 ± 0,26	244,2	0,900
	C93	SC		16,32 ± 0,13	146,6	0,440

A Figura 32 apresenta os espalhamentos da radiação dos extratos de própolis estudados, bem como os espalhamentos referentes à água deionizada e ao branco utilizado nas medições do teor de fenóis (0,5 mL de Folin-Ciocalteu + 1,0 mL de tampão carbonato de sódio a 20% m/v, solubilizados para um volume total de 25 mL). O teor de extrato seco não teve nenhuma relação com o espalhamento da radiação, sendo que tanto extratos com altos teores de extrato seco quanto extratos com baixos teores apresentaram altos espalhamentos da radiação, como pode ser observado na Tabela 17. Os extratos de própolis verde foram os que apresentaram menores espalhamentos, compatíveis com o espalhamento apresentado pelo branco

(Figura 32). Considerando o tipo de própolis e a região que o extrato foi envazado, também não se observou nenhuma relação com altos espalhamentos da radiação. O espalhamento é característico da composição química de cada extrato.

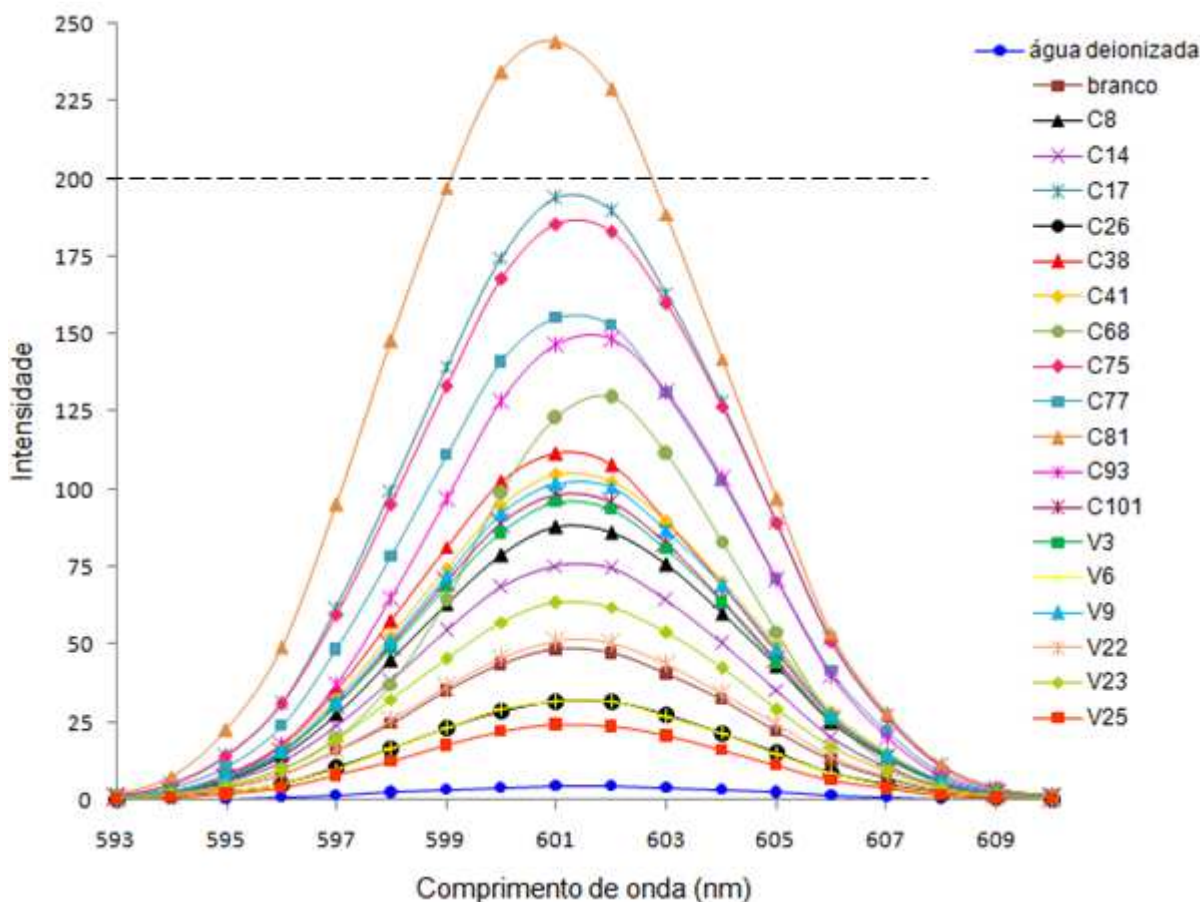


Figura 32. Espalhamentos da radiação para os extratos de própolis estudados.

Para se ter um padrão de comparação para avaliar se os espalhamentos apresentados pelas amostras de extrato de própolis são altos o suficiente para interferirem no resultado do teor de fenóis, utilizou-se a superfície de resposta construída a partir de espalhamentos na otimização da metodologia (Figura 29(b)). Como pode ser observado na Figura 29(b), a região de mínimo espalhamento da radiação engloba a faixa que vai até o valor de intensidade da radiação espalhada igual a 200. Dentre as amostras avaliadas, o maior valor de espalhamento foi para a amostra C81 (intensidade igual a 244,2), que está próxima da região de mínimo espalhamento da radiação.

Nesse sentido, pode-se dizer que os volumes dos reagentes otimizados, na seção anterior, com o padrão de ácido gálico, também são adequados para as

análises de amostras de extrato de própolis e que a resposta para o teor de fenóis não terá influência significativa advinda de possíveis espalhamentos da radiação.

### 5.2.3 Avaliação da composição química do sólido cristalino

Para avaliar a composição química do sólido cristalino branco formado durante o processo de otimização da metodologia espectrofotométrica, utilizou-se métodos qualitativos de análise e as espectrometrias de fluorescência de raios X e de difração de raios X.

Após a secagem e pulverização do sólido cristalino, testes qualitativos foram realizados para uma identificação prévia da composição química do sólido formado. Cerca de 100 mg do sólido foram misturados com 50 mL de ácido clorídrico concentrado (37% m/m) para verificar se haveria formação de bolhas, que são provenientes da decomposição de carbonatos. Nesse teste, observou-se a formação de poucas bolhas de gás, indicando a possível presença de carbonatos.

Análises de fluorescência de raios X foram realizadas visando avaliar qualitativamente os elementos químicos presentes no sólido branco. Como pode ser observado na Figura 33, os elementos químicos identificados no composto foram fósforo, molibdênio, tungstênio, cálcio, cobre e ferro. Sabe-se que estes elementos (com exceção do cálcio, cobre e ferro) estão presentes nas substâncias que compõem o reagente Folin-Ciocalteu.

A análise semi-quantitativa, realizada por fluorescência de raios X, indica um maior teor de fósforo (91,7% m/m) na composição química do sólido analisado, seguido pelo tungstênio (7,7% m/m). Estes resultados sugerem a possível presença de ânions contendo fósforo, como por exemplo, fosfatos.

A espectrometria por difração de raios X foi utilizada com o objetivo de avaliar a composição química da(s) substância(s) presente(s) no resíduo formado. O difratograma do sólido cristalino está apresentado na Figura 34 e a sua interpretação foi realizada utilizando o banco de dados do *Index to the Powder Diffraction File* [164], baseando-se nos valores das distâncias interplanares dos picos mais intensos seguidos pelos picos de menores intensidades, para confirmação da composição da substância analisada.

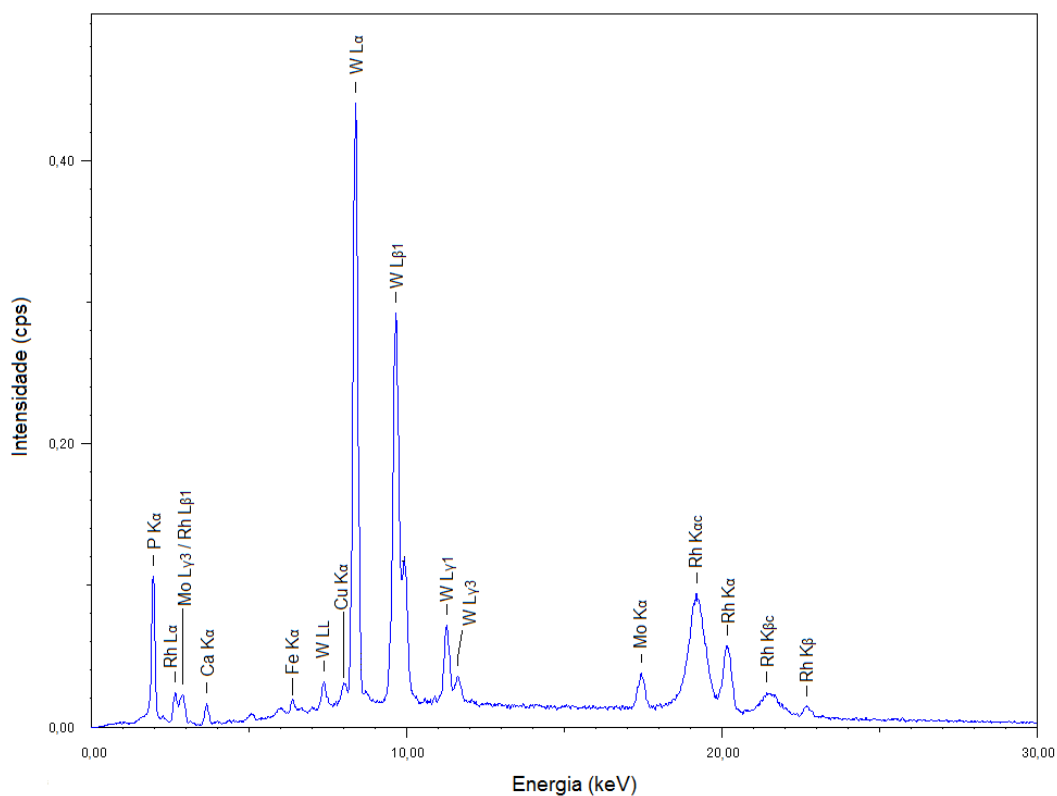


Figura 33. Espectro de fluorescência de raios X do sólido branco formado no planejamento composto central.

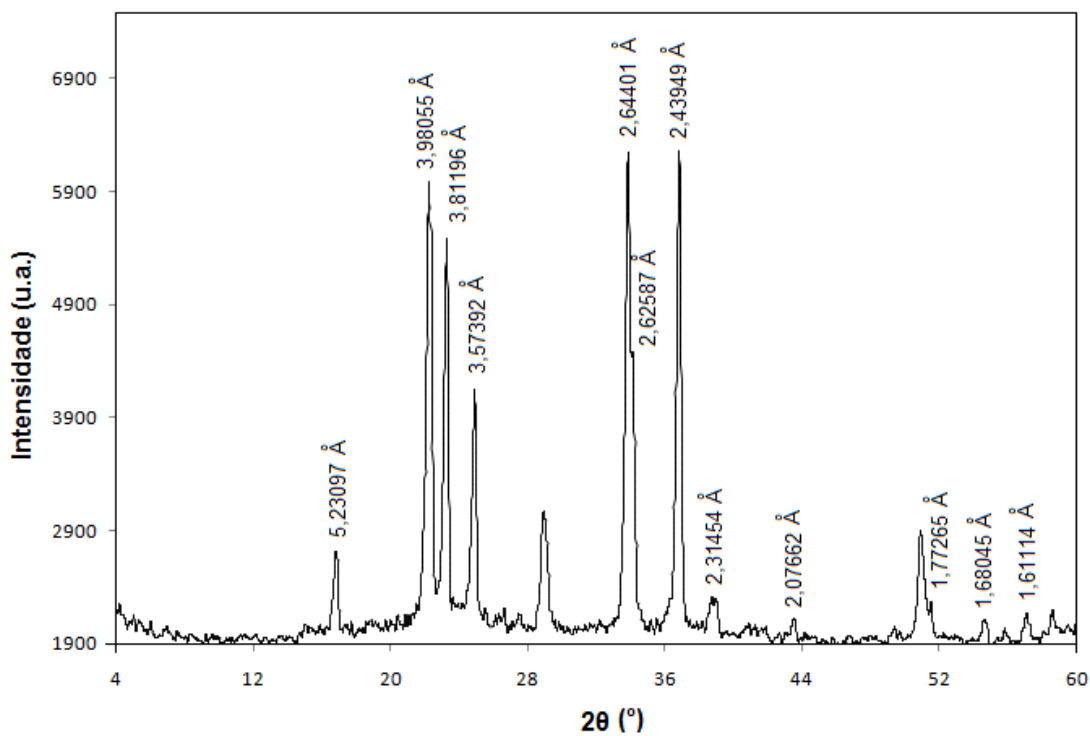


Figura 34. Difratoograma do sólido cristalino formado. As distâncias interplanares demonstradas na figura conferem com as apresentadas pelo fosfato de lítio.

Com base nos resultados obtidos através da fluorescência de raios X, na análise qualitativa e no difratograma do sólido cristalino, pode-se inferir que, possivelmente, o sólido cristalino branco é formado por uma mistura contendo a presença de carbonato(s), por ter ocorrido a formação de bolhas na mistura do sólido cristalino com o ácido clorídrico, e de fosfato de lítio, por todos os picos (com as distâncias interplanares demonstradas no difratograma) conferirem com os picos e com as intensidades apresentados pelo fosfato de lítio.

O reagente Folin-Ciocalteu apresenta na sua formulação tanto o íon fosfato quanto o íon lítio, sendo este último advindo do sulfato de lítio, uma das substâncias que compõem o reagente Folin. O lítio não foi identificado nas análises por fluorescência de raios X porque possui número atômico ( $Z = 3$ ) menor que o detectável por esta técnica, que é acima do oxigênio ( $Z = 8$ ). Não foram observados picos referentes a compostos contendo tungstênio e carbonatos no difratograma porque estes podem estar na forma amorfa ou em pequenas concentrações.

As soluções do planejamento composto central que apresentaram a formação de corpo de fundo tiveram o pH avaliado para verificar a sua influência na precipitação do fosfato de lítio. Todas as soluções avaliadas apresentaram o pH em torno de 8,6, indicando que este não contribui para a precipitação do fosfato de lítio. A precipitação se deve ao aumento da concentração do reagente Folin-Ciocalteu na solução, que chega a quase 50% do volume da solução preparada (12,2 mL de Folin + 10,0 mL de tampão carbonato de sódio a 30% (m/v), em 25 mL de solução), ultrapassando assim, o seu coeficiente de solubilidade.

## **5.2.4 Parâmetros de mérito**

### **5.2.4.1 Método dos mínimos quadrados**

Na avaliação do método dos mínimos quadrados mais adequado aos dados deste estudo, a variância em cada ponto da calibração foi utilizada para verificar o comportamento do conjunto de dados. Um total de 8 pontos, na faixa de concentração de 1,0 a 8,0  $\mu\text{g/mL}$ , foram estudados na calibração do ácido gálico.

Como pode ser observado na Figura 35, os dados obtidos para o ácido gálico apresentaram variâncias com valores aleatórios, indicando que os dados possuem um comportamento homocedástico. Para esclarecer o comportamento destes dados, seus resíduos também foram avaliados indicando comportamento aleatório. Sendo assim, a regressão linear foi construída baseando-se no método dos mínimos quadrados ordinário, que é um método mais simples por não exigir nenhuma ponderação.

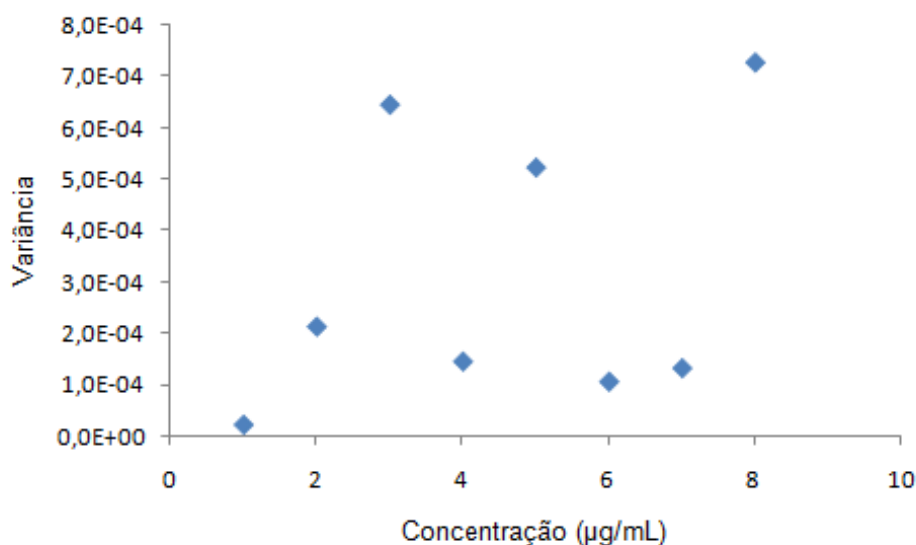


Figura 35. Homocedasticidade dos dados experimentais.

#### 5.2.4.2 Avaliação da qualidade do ajuste e linearidade

Para avaliar a qualidade dos ajustes realizados para o ácido gálico, utilizaram-se os resíduos padronizados de cada ponto utilizado nas curvas de calibração. Os valores dos resíduos padronizados para o ácido estudado estiveram em torno de 1, em módulo, indicando que a regressão está bem ajustada (Figura 36).

Juntamente com a avaliação da qualidade do ajuste da regressão, uma faixa de linearidade foi estudada na concentração de 1,0 a 10,0 µg/mL para o ácido gálico. Entretanto, a regressão foi linear até a concentração igual a 8,0 µg/mL. Sendo assim, a faixa linear obtida para o ácido gálico foi de 1,0 a 8,0 µg/mL, apresentando um coeficiente de correlação de 0,998.

Desse modo, a linearidade na faixa estudada pode ser confirmada pela avaliação do ajuste feito pelos resíduos padronizados em cada ponto da curva de calibração e pelo adequado coeficiente de correlação obtido.

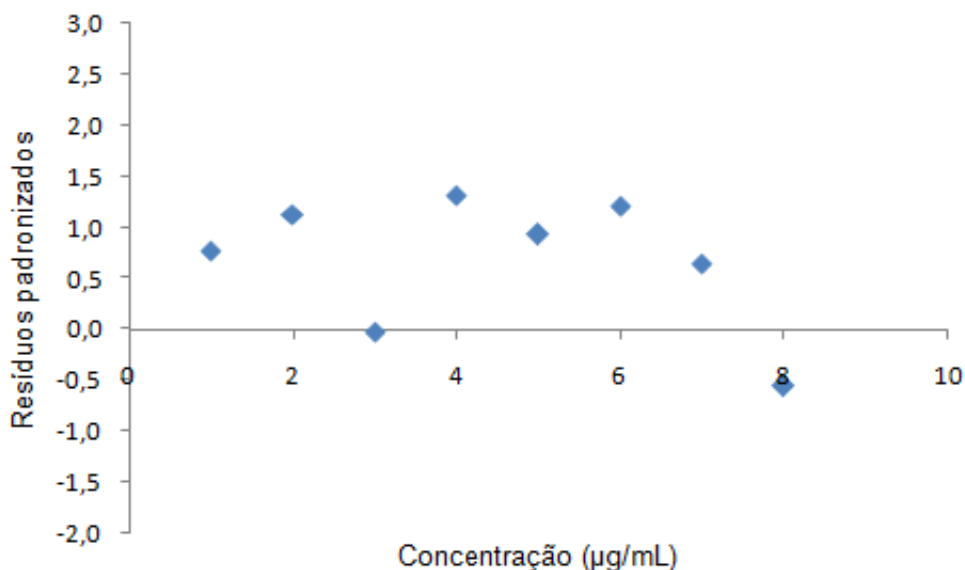


Figura 36. Resíduos padronizados para o ácido gálico.

#### 5.2.4.3 Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados através da adição de ácido gálico na menor concentração utilizada na construção da curva de calibração (1,0 µg/mL), a fim de se obter valores referentes ao comportamento do analito junto com seus possíveis interferentes e não somente às flutuações do branco. Com a obtenção dos limites de quantificação, a faixa de trabalho para o ácido gálico pode ser estipulada. Os valores obtidos referentes ao LD, LQ e a faixa de trabalho estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Limites de detecção, de quantificação e faixa de trabalho para o ácido gálico.

Fenol	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)	Faixa de trabalho (µg/mL)
Ácido gálico	0,08	0,26	0,26 a 8,0

#### 5.2.4.4 Precisão

Para avaliar a precisão do método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu, três níveis de concentração (nível baixo, médio e alto) utilizados na construção da curva de calibração para o ácido gálico foram estudados, tendo cada nível sete replicatas independentes analisadas em triplicatas aleatórias. A precisão foi expressa em termos do coeficiente de variação (%), demonstrando a repetitividade do método.

Tabela 19. Repetitividade do método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu.

Fenol	Níveis de concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	1,0	4,0	8,0
Ácido gálico	2,1%	2,2%	2,4%

Como pode ser observado na Tabela 19, valores adequados de precisão foram alcançados com esta metodologia, tornando-a adequada para as quantificações de fenóis totais em extratos de própolis comerciais em diferentes níveis de concentração.

#### 5.2.4.5 Exatidão

A exatidão da metodologia utilizando HPLC-DAD na quantificação de compostos fenólicos em própolis já foi verificada por outros autores [22, 68, 141], a partir de adição e recuperação de analitos, em processos que envolvem a extração dos compostos fenólicos presentes na própolis bruta. Luo e colaboradores [141] obtiveram valores na faixa de 84,2 a 118,6% de recuperação, enquanto que no estudo de Pellati e colaboradores [22], a faixa de recuperação foi de 96 a 105%, demonstrando, assim, a exatidão da metodologia proposta.

### 5.3 Conclusões

A otimização da metodologia espectrofotométrica Folin-Ciocalteu, para determinação de fenóis em extratos de própolis, agregou várias vantagens à

metodologia proposta, como redução de custos e no tempo de análise e, a principal, que é tornar o método exato. Com a verificação da possível ocorrência de espalhamentos da radiação em determinadas condições de análise, muitos trabalhos presentes na literatura envolvendo a determinação de fenóis não só em própolis, mas também em outros tipos de matrizes, podem ter a exatidão do método comprometida.

Em muitos trabalhos condições extremas são utilizadas, como a grande quantidade de reagente Folin e de tampão utilizada na determinação de fenóis totais em extratos de própolis numa dada concentração. A possível formação de sólido em suspensão, que muitas vezes pode ser omitido pela coloração azul apresentada pelas soluções, como verificado nesse trabalho, pode comprometer a exatidão do método.

Neste trabalho, pode-se verificar através das espectrometrias de fluorescência e de difração de raios X, que a composição química do sólido cristalino formado em condições experimentais que envolveram grandes quantidades dos reagentes Folin e de tampão, é principalmente de fosfato de lítio.

As quantidades utilizadas dos reagentes Folin e de tampão foram também adequadas para as análises em extratos de própolis. Baixos valores de espalhamento foram encontrados e estes não tiveram nenhuma relação com o tipo de própolis utilizada na extração, com a região de envase ou com o teor de extrato seco dos extratos comerciais de própolis.

A avaliação dos parâmetros de mérito realizada após toda a otimização da metodologia espectrofotométrica proposta neste trabalho, apresentou valores adequados, demonstrando que a mesma pode ser empregada para a determinação do teor de fenóis totais em extratos de própolis comerciais.

**CAPÍTULO 6*****Determinação do Teor de Fenóis Totais em Extratos  
Alcoólicos de Própolis***

---

## 6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS EM EXTRATOS ALCOÓLICOS DE PRÓPOLIS

Embora exista um grande número de estudos sobre a composição química e propriedades biológicas da própolis, na última década, poucos estudos focando a quantificação dos compostos fenólicos presentes na própolis e em seus derivados têm sido realizados. Com relação à própolis brasileira, existe um grande número de trabalhos envolvendo a identificação de compostos fenólicos em própolis de diferentes tipos e regiões, entretanto, são raros os trabalhos envolvendo a quantificação destes compostos.

Diversas técnicas analíticas têm sido empregadas nos estudos de identificação e de quantificação de fenóis em própolis, como as cromatografias líquida e gasosa, acopladas a vários tipos de detectores, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear, dentre várias outras. Dentre estas, a mais difundida e utilizada é a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, pois os fenóis presentes na própolis apresentam comumente características polares e baixa volatilidade.

Entretanto, como as técnicas cromatográficas possuem elevado custo e são laboriosas, metodologias espectrofotométricas podem ser utilizadas para uma rápida determinação do teor de fenóis totais em própolis, em análises de rotina que envolva o controle de qualidade de produtos comerciais. A metodologia Folin-Ciocalteu é uma das mais empregadas na determinação do teor de fenóis totais em própolis, como discutido e apresentado no capítulo anterior, por ser rápida e de baixo custo.

Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi quantificar os fenóis presentes nos extratos de própolis comerciais a partir da metodologia espectrofotométrica Folin-Ciocalteu, otimizada no capítulo anterior. Neste trabalho, também foi realizada a identificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos das regiões sul e sudeste, e os resultados obtidos na metodologia espectrofotométrica para o teor de fenóis totais foram comparados com os obtidos na metodologia cromatográfica utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com fase reversa.

## 6.1 Materiais e métodos

### 6.1.1 Amostras e reagentes

Para as análises espectrofotométricas, os reagentes e soluções descritos no item 5.1.1 foram utilizados neste estudo. Nos estudos cromatográficos, os padrões de flavonóides e ácidos fenólicos foram investigados: ácido *p*-cumárico, quercetina, pinocembrina, crisina, ácido trans-cinâmico, ácido ferúlico, kaempferol, acacetina, ácido caféico, galangina (todos acima da Sigma-Aldrich) e artepillin C (Wako Pure Chemicals, Tóquio, Japão) todos de grau cromatográfico, assim como os solventes utilizados na fase móvel como metanol e ácido fórmico (J.T. Baker), e o etanol absoluto (Sigma-Aldrich) utilizado na diluição dos extratos de própolis. A água utilizada na fase móvel foi purificada usando um sistema Milli-Q Plus (Millipore, Milford, USA).

Soluções padrão de cada composto analisado foram preparadas como segue: massas em torno de 1,0 mg foi pesada e diluída com etanol absoluto num balão volumétrico de 5,0 mL, obtendo-se soluções com concentrações em torno de 200 µg/mL. Para construção da curva de calibração, uma mistura contendo todos os padrões foi realizada seguida de diluições adequadas para obtenção de oito pontos na faixa de 0,28 a 13,1 µg/mL. Esta faixa de concentração foi escolhida por ser a região condizente com as concentrações dos extratos de própolis (diluídos) em diversos teores de extrato seco. Foram preparadas triplicatas independentes para cada nível de concentração, com duas injeções para cada amostra. As curvas de calibração foram obtidas plotando a área integrada do pico do composto em questão *versus* a concentração da amostra.

Para a determinação do teor de fenóis totais pela metodologia cromatográfica, as soluções dos extratos de própolis foram obtidas diluindo 5,0 µL dos extratos comerciais de própolis para 25 mL com etanol absoluto. As soluções foram preparadas em duplicatas independentes, com duas injeções para cada amostra.

### 6.1.2 Instrumentação

Para os estudos espectrofotométricos foi utilizado um espectrofotômetro da marca Hewlet-Packard, modelo 8451A, com cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm. Os espectros de absorção de cada amostra foram obtidos realizando uma varredura do comprimento de onda de 190 a 820 nm, com incrementos de 2 nm.

Para os estudos cromatográficos foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência Finnigan Surveyor (Thermo Scientific), equipado com detector de arranjo de diodos (PDA Plus Detector) e coluna cromatográfica de fase reversa C<sub>18</sub> Shim-Pack XR-ODS (Shimadzu), com dimensões de 3,0 mm x 100 mm e diâmetro de partícula de 3 µm. A fase móvel utilizada foi composta de água com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (solvente A) e metanol (solvente B). O gradiente iniciou com 10% do solvente B até 12 minutos, 50% de B até 14 minutos, 70% de B até 39 minutos, 100% de B até 47 minutos e, por fim, 10% de B até 55 minutos. Uma alíquota de 20 µL de amostra foi injetada no sistema de HPLC e as análises foram realizadas com taxa de fluxo de 0,2 mL/min, numa temperatura constante de 40 °C.

### 6.1.3. Metodologia espectrofotométrica

Na determinação do teor de fenóis totais a partir da metodologia espectrofotométrica, 5 µL de extrato de própolis foram adicionados em um balão volumétrico de 25 mL. Uma pequena quantidade de água deionizada foi adicionada e, posteriormente, 500 µL do reagente Folin-Ciocalteu foram adicionados ao balão, permanecendo ao abrigo da luz por 8 minutos. Após esse período, 1 mL de tampão de carbonato de sódio a 20% (m/v) foram adicionados e o volume completado com água deionizada. A solução permaneceu ao abrigo da luz por 30 minutos e, logo após esse período, as medidas espectrofotométricas foram realizadas.

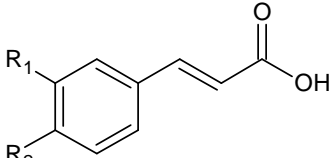
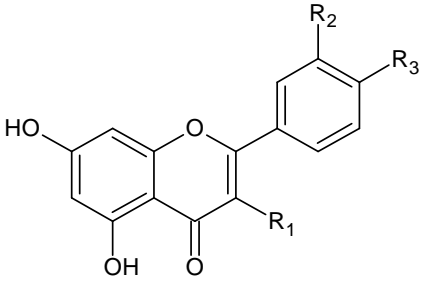
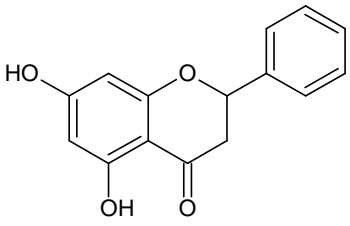
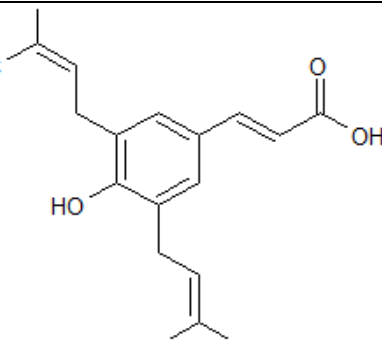
### 6.1.4 Metodologia cromatográfica

Os resultados obtidos com a metodologia colorimétrica Folin-Ciocalteu na determinação do teor de fenóis totais em extratos de própolis brasileira foram

comparados com os obtidos a partir de medidas cromatográficas baseadas na metodologia proposta por Popova e colaboradores [94] com algumas modificações.

Os cromatogramas foram processados utilizando *software* específico e os comprimentos de onda (UV-Vis) utilizados na integração dos cromatogramas de cada padrão analisado estão representados na Tabela 20, juntamente com seus tempos de retenção e estruturas químicas. A identificação dos compostos foi realizada pela comparação dos tempos de retenção e dos espectros de absorção na região UV-Vis com os obtidos para os padrões.

Tabela 20. Estruturas, tempo de retenção, comprimento de onda máximo e identidade dos compostos avaliados.

Composto	Estrutura	Grupos substituintes			Tempo de retenção (min)	$\lambda$ (nm)
		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>		
1: Ácido caféico		OH	OH	-	15,3	324
2: Ácido <i>p</i> -cumárico		H	OH	-	18,7	310
3: Ácido ferúlico		OCH <sub>3</sub>	OH	-	19,5	323
4: Ácido cinâmico		H	H	-	26,7	276
5: Quercetina		OH	OH	OH	26,3	372
6: Kaempferol		OH	H	OH	30,7	367
7: Crisina		H	H	H	40,3	268
8: Galangina		OH	H	H	42,6	360
9: Acacetina		H	H	OCH <sub>3</sub>	41,4	335
10: Pinocembrina		-	-	-	37,9	290
11: Artepillin C		-	-	-	50,4	316

#### 6.1.4.1 Parâmetros de mérito do método analítico de HPLC

O método descrito foi validado de acordo com as recomendações do INMETRO [163] e EURACHEM [165]. Os parâmetros de mérito avaliados foram: o método dos mínimos quadrados a ser utilizado, a qualidade do ajuste, efeito de matriz, linearidade, limites de detecção e quantificação e precisão. A exatidão não pode ser verificada por adição e recuperação de analito pois a metodologia se baseia na diluição dos extratos comerciais de própolis.

As curvas de calibração foram construídas a partir de oito pontos, na faixa de concentração de 0,28 a 13,11  $\mu\text{g/mL}$ . Essa faixa de concentração foi escolhida por abranger a maior parte dos compostos presentes nos extratos de própolis que juntos possuem uma absorbância em torno de 1,0. Para se obter absorbâncias em torno desse valor, volumes de 15  $\mu\text{L}$  de extrato de própolis comercial foram diluídos para 25 mL com etanol absoluto.

A avaliação do melhor método de regressão (método dos mínimos quadrados ordinário e o método dos mínimos quadrados ponderado) foi realizada considerando o padrão de comportamento de cada analito (comportamento homoscedástico ou heteroscedástico). A avaliação da qualidade do ajuste aplicado foi feita através dos resíduos padronizados, que consistem nos valores dos resíduos divididos pela incerteza em cada ponto da curva de calibração.

A avaliação de possíveis efeitos de matriz foi realizada utilizando extratos de própolis comum e verde. Para isso, foram preparadas duas soluções estoque (uma com própolis verde e a outra com própolis comum) diluindo 25  $\mu\text{L}$  de extrato de própolis num balão volumétrico de 25 mL com etanol absoluto. Após essa diluição, 1,0 mL da solução estoque foi adicionado em balões de 5 mL juntamente com os padrões na concentração referente a cada ponto da curva de calibração. O volume foi completado com etanol absoluto. Após a avaliação do método dos mínimos quadrados mais adequado aos dados e a qualidade do ajuste, as inclinações das duas curvas de calibração (etanólica e matrizada) foram comparadas utilizando o teste t de Student, para verificar se ocorre influência da matriz na separação dos compostos fenólicos presentes na própolis.

A linearidade de cada regressão foi avaliada em termos do coeficiente de correlação nas faixas de concentração que variaram de 0,28 a 13,11  $\mu\text{g/mL}$ . Para a determinação dos limites de detecção e de quantificação, foram preparadas

10 replicatas independentes do branco, fortificadas na mais baixa concentração de cada analito utilizado na preparação da curva de calibração. Estas replicatas foram injetadas em triplicatas aleatórias. Para o cálculo dos limites de detecção e de quantificação utilizou-se as equações 12 e 13 [163, 165].

A precisão foi avaliada em termos de repetitividade em três níveis de concentrações (nível baixo, médio e alto), para todos os analitos estudados e expressa pelo coeficiente de variação em porcentagem (desvio padrão relativo, DPR). Foram preparadas sete replicatas independentes em cada nível e cada amostra foi injetada em triplicata no mesmo dia e pelo mesmo operador (precisão intra-ensaio).

## 6.2 Resultados e discussão

No desenvolvimento do método analítico de HPLC, inicialmente foram investigadas diferentes condições cromatográficas para melhorar a separação dos compostos fenólicos presentes nos extratos, para um adequado tempo e resolução dos picos. Nesse sentido, a melhor separação e resolução dos picos foram obtidas usando os parâmetros descritos nas condições instrumentais, com tempo de análise de 55 minutos. A fase móvel foi acidificada com ácido fórmico com objetivo de aumentar a resolução e restringir a ionização dos compostos fenólicos que possuem vários grupos hidroxila na cadeia.

Além dos compostos fenólicos mostrados na Tabela 20, também foi testado o ácido gálico, entretanto, este não pode ser utilizado nos estudos cromatográficos porque ficou pouco retido na coluna, aparecendo junto com o pico do tempo morto da coluna. Isso se deve à estrutura deste ácido fenólico, que possui vários grupos hidroxila, dificultando a sua retenção na coluna de C<sub>18</sub>.

Os compostos fenólicos ácido vanílico e cumarina, que não estão presentes em própolis, segundo a literatura, foram testados como padrão interno. Entretanto, estes sofreram coeluição com outros compostos fenólicos envolvidos no processo de quantificação e, por este motivo, não puderam ser utilizados. Padrões dos compostos estudados foram injetados de tempo em tempo, juntamente com as amostras de extrato de própolis, para assegurar a repetitividade das injeções.

A Figura 37 apresenta um cromatograma de uma solução com todos os padrões estudados para o comprimento de onda de 290 nm. Vale ressaltar que cada

padrão foi avaliado em determinado comprimento de onda, como foi apresentado na Tabela 20, no qual a resolução e a separação entre os picos é melhor definida. Como pode ser observado os ácidos fenólicos (com exceção do artepillin C, que possui grupos prenil) tiveram um tempo de retenção menor do que os flavonóides estudados neste trabalho. Isso se deve ao fato de os flavonóides possuírem uma cadeia carbônica maior que os ácidos fenólicos, que favorece uma maior interação com a coluna cromatográfica de fase reversa (apolar), gerando uma maior retenção. Ácidos fenólicos e flavonóides de classes iguais podem eluir diferentemente dependendo do grau de hidroxilação e metilação. O aumento da hidroxilação reduz o tempo de retenção e o aumento da metilação aumenta a retenção dos compostos na coluna cromatográfica.

O cálculo da área do pico referente a cada padrão foi feito baseando-se no comprimento de onda específico para cada analito (Tabela 20). Cada comprimento de onda escolhido se refere ao comprimento de onda máximo para um dado analito ou um valor de comprimento de onda que não seja máximo, mas que possa proporcionar boa resolução ( $R_s > 1,5$ ) em relação aos picos adjacentes.

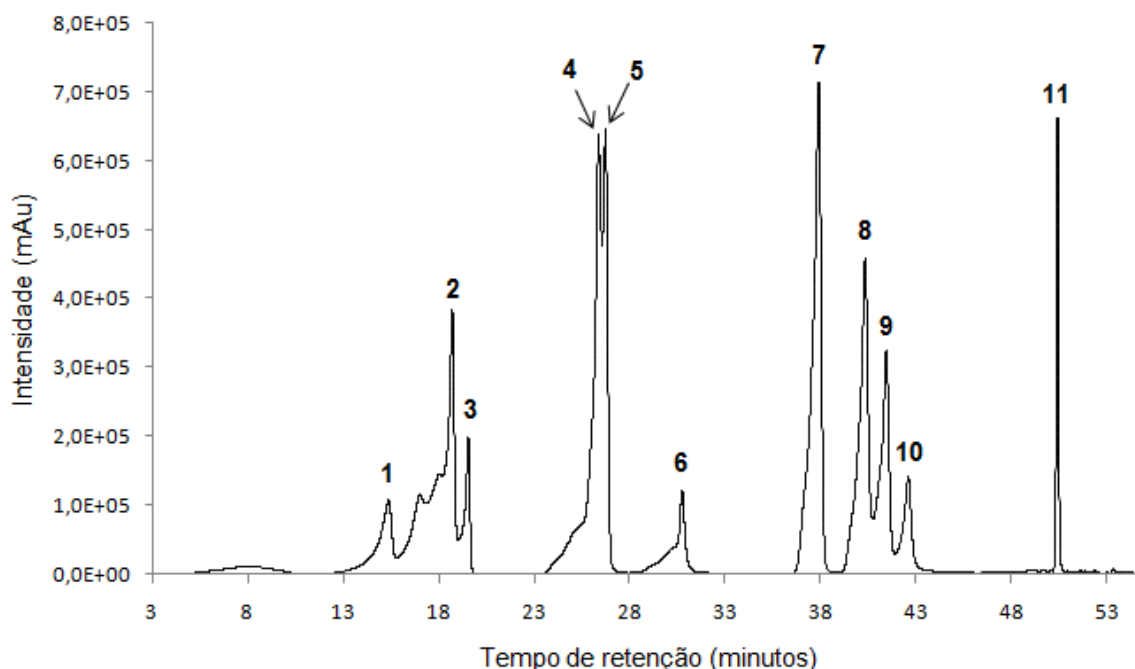


Figura 37. Cromatograma de uma solução padrão contendo todos os analitos, para o comprimento de onda de 290 nm. 1 – ácido caféico; 2 – ácido p-cumárico; 3 – ácido ferúlico; 4 – quercetina; 5 – ácido cinâmico; 6 – kaempferol; 7 – pinocembrina; 8 – crisina; 9 – acacetina; 10 – galangina; 11 – artepillin C.

### 6.2.1 Parâmetros de mérito do método de HPLC

A avaliação do método de regressão mais adequado para cada analito foi realizada baseando-se no comportamento das variâncias dos pontos utilizados nas curvas de calibração. Para todos os compostos fenólicos em estudo observou-se um aumento na variância dos dados com o aumento da concentração, indicando um comportamento heteroscedástico dos dados. Por este motivo, o método dos mínimos quadrados ponderado foi o escolhido.

Para avaliar a qualidade do ajuste feito pelo método dos mínimos quadrados ponderado, foram utilizados os resíduos padronizados. Para todos os analitos os resíduos padronizados tiveram valores, em módulo, em torno de 1, indicando que a aplicação do método de regressão escolhido foi adequada.

Mesmo utilizando uma técnica de separação cromatográfica, avaliou-se a possibilidade de efeitos de matriz utilizando uma amostra de extrato de própolis verde (região sudeste) e outra de própolis comum (região sul). Após a comparação das inclinações de cada curva de calibração (etanólica e matrizada) através do teste *t* de Student, não foi verificada diferença significativa entre os valores das inclinações a um nível de confiança de 95%, indicando que a matriz, mesmo sendo complexa, não influencia a separação dos compostos fenólicos presentes nos extratos de própolis.

A Tabela 21 apresenta algumas figuras de mérito para as curvas de calibração obtidas. Como pode ser observado, para todos os analitos estudados, as regressões apresentaram boa linearidade, com coeficientes de correlação acima de 0,994. Os limites de detecção e quantificação estiveram na faixa de 0,01 a 0,07 µg/mL e 0,03 a 0,25 µg/mL, respectivamente. Estes valores são menores do que os limites reportados por outros autores para a quantificação de compostos fenólicos por HPLC-DAD em própolis de diferentes países [22, 141].

A precisão do método foi avaliada em três níveis de concentração e expressa pelo desvio padrão relativo (DPR), obtido através das áreas dos picos de injeções sucessivas de soluções padrões durante um dia (precisão intra-ensaio). Os valores encontrados para cada analito em cada nível de concentração avaliado estão representados na Tabela 22. Pode-se observar que os valores encontrados estão abaixo de 10%, indicando que o método é adequado para determinação de compostos fenólicos em extratos de própolis.

Tabela 21. Parâmetros de mérito dos compostos fenólicos avaliados por HPLC.

<b>Composto</b>	<b>Coefficiente de correlação</b>	<b>LD (µg/mL)</b>	<b>LQ (µg/mL)</b>	<b>Faixa de trabalho (µg/mL)</b>
Ácido caféico	0,9940	0,04	0,12	0,12 – 13,11
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,9996	0,04	0,14	0,14 – 12,10
Ácido ferúlico	0,9989	0,04	0,13	0,13 – 11,09
Quercetina	0,9997	0,03	0,10	0,10 – 12,10
Ácido cinâmico	0,9976	0,07	0,25	0,25 – 13,11
Kaempferol	0,9999	0,01	0,03	0,03 – 12,10
Pinocembrina	0,9989	0,02	0,05	0,05 – 11,09
Crisina	0,9991	0,02	0,08	0,08 – 11,09
Acacetina	0,9996	0,04	0,14	0,14 – 11,09
Galangina	0,9998	0,04	0,12	0,12 – 13,11
Artepillin C	0,9980	0,03	0,09	0,09 – 11,09

Tabela 22. Precisão para cada composto fenólico estudado em diferentes níveis de concentração.

<b>Composto</b>	<b>Níveis</b>		
	<b>0,33 µg/mL</b>	<b>4,25 µg/mL</b>	<b>9,91 µg/mL</b>
Ácido cinâmico	9,3%	2,8%	3,6%
Ácido caféico	3,5%	1,5%	1,3%
Galangina	3,2%	2,4%	3,9%
	<b>0,30 µg/mL</b>	<b>3,65 µg/mL</b>	<b>9,15 µg/mL</b>
Ácido <i>p</i> -cumárico	5,8%	2,4%	2,5%
Quercetina	4,0%	3,1%	2,0%
Kaempferol	2,1%	2,6%	3,2%
	<b>0,28 µg/mL</b>	<b>3,35 µg/mL</b>	<b>8,39 µg/mL</b>
Pinocembrina	1,8%	2,8%	1,5%
Crisina	2,6%	1,4%	2,1%
Ácido ferúlico	3,1%	6,8%	3,3%
Acacetina	4,1%	2,6%	0,8%
Artepillin C	2,9%	1,1%	1,4%

### 6.2.2 Análise de extratos de própolis comerciais e verificação dos resultados por HPLC

As Figuras 38 e 39 apresentam os cromatogramas dos extratos de própolis das regiões sul e sudeste do país (própolis comum e verde). Diferentes perfis químicos foram observados nos cromatogramas dos extratos de própolis de ambas as regiões. Nos extratos de própolis da região sul pode-se observar uma predominância de flavonóides e outros compostos não identificados, que possuem grande interação com a coluna de C<sub>18</sub>. Os principais compostos fenólicos identificados em extratos de própolis da região sul foram artemillin C, pinocembrina, acacetina, galangina, crisina, ácido cinâmico e ácido *p*-cumárico. O flavonóide pinocembrina e, em alguns casos, o ácido fenólico artemillin C foram os compostos majoritários encontrados neste tipo de própolis.

Adelmann e colaboradores [166] encontraram nos seus estudos a pinocembrina como composto fenólico majoritário, tanto na própolis quanto em brotos de álamo, ambos colhidos numa região do Estado do Paraná, em que a flora é predominantemente de espécies de álamo (*Populus* sp.). Park e colaboradores [5] também encontraram pinocembrina como um dos compostos majoritários em própolis da região sul (Santa Catarina), juntamente com outros compostos como pinobanksina, crisina e galangina.

Nos extratos de própolis da região sudeste e nos extratos de própolis verde, também da região sudeste, pode-se observar uma grande quantidade de ácidos fenólicos como o ácido *p*-cumárico e, principalmente, artemillin C, que se encontra em tempo de retenção alto por possuir em sua cadeia grupos prenil. Os principais flavonóides identificados nestes extratos foram pinocembrina, acacetina e galangina. Os extratos de própolis da região sudeste apresentaram como compostos majoritários o flavonóide pinocembrina e o ácido fenólico artemillin C.

O artemillin C tem sido relatado na literatura como o composto fenólico majoritário em própolis verde [52, 55, 68, 71, 132, 167]. Na literatura estão presentes vários estudos envolvendo a utilização do artemillin C como um agente antitumoral, antioxidante, antiinflamatório, antibacteriano, na prevenção de diversas doenças dentre outras aplicações [67, 83, 168-171].

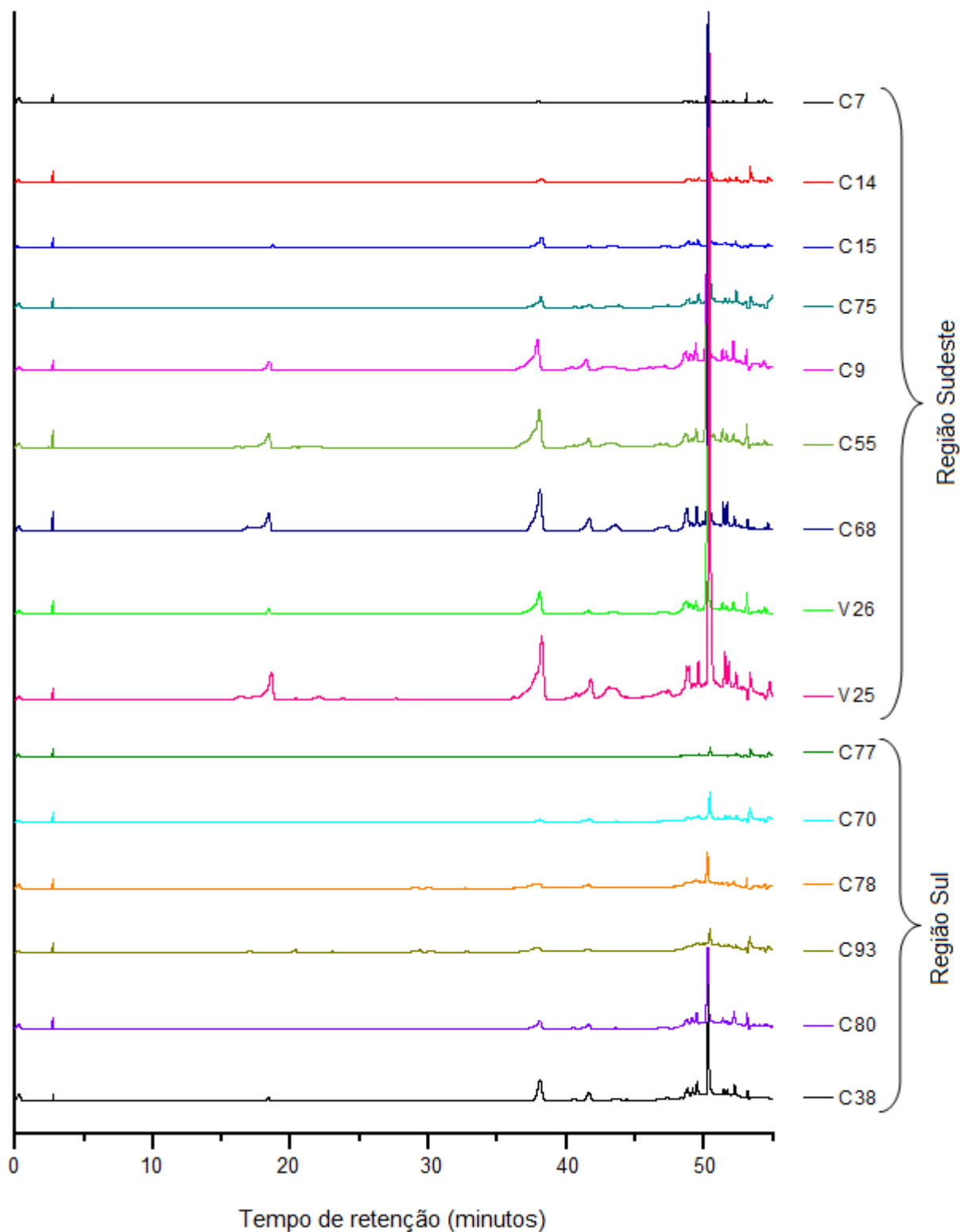


Figura 38. Cromatogramas de extratos de própolis das regiões sul e sudeste do Brasil, para o comprimento de onda de 310 nm.

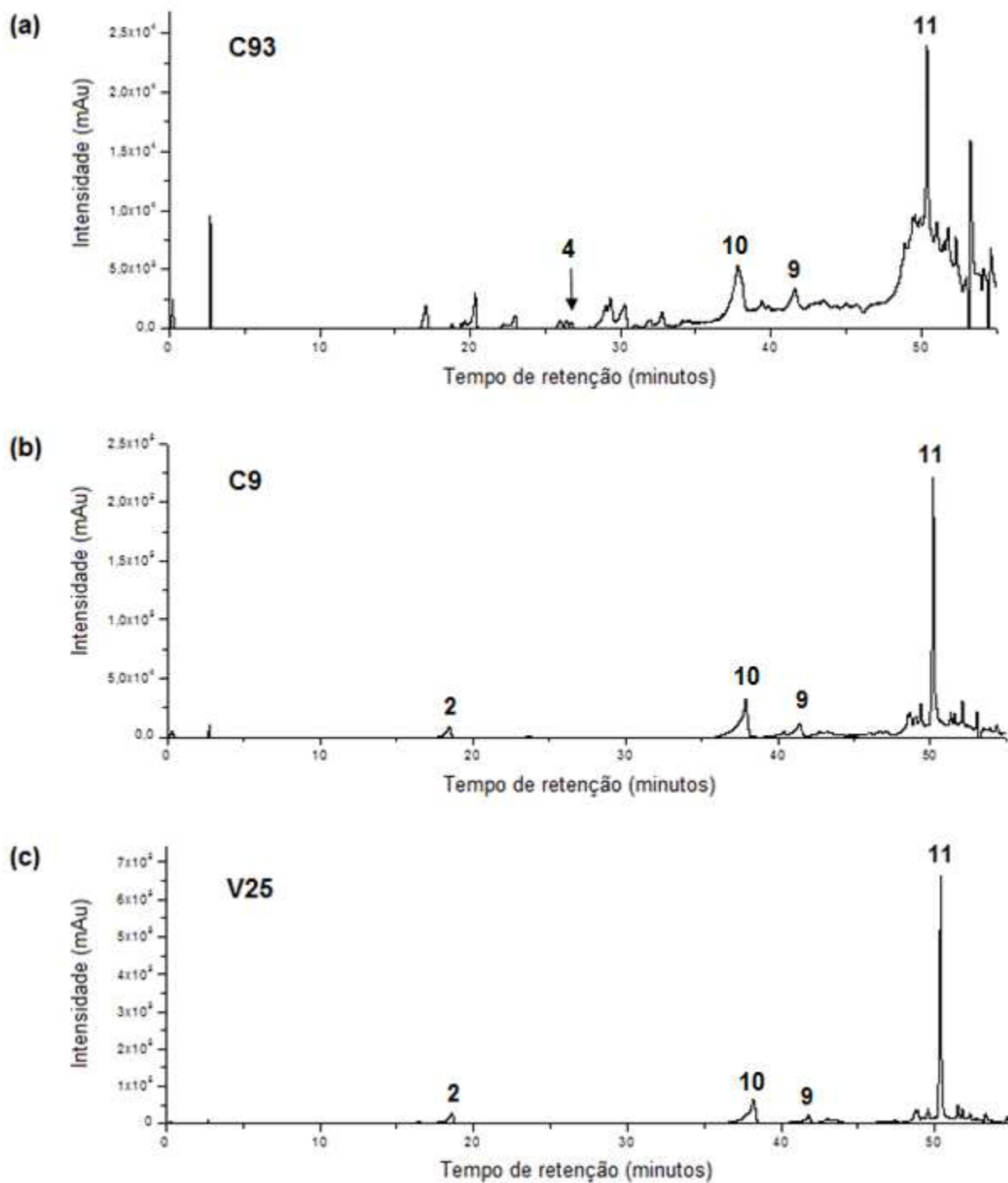


Figura 39. Cromatogramas de extratos de própolis comum e verde, das regiões sul e sudeste do Brasil, para o comprimento de onda de 310 nm. (a) Extrato de própolis comum envazado na cidade de Urubici – SC. (b) Extrato de própolis comum envazado na cidade de Nova Lima – MG. (c) Extrato de própolis verde envazado na cidade de Cláudio – MG. (A numeração dos compostos fenólicos está apresentada na Tabela 20)

Analisando os cromatogramas de extratos de própolis comum da região sudeste e os cromatogramas dos extratos de própolis verde, é nítida a semelhança entre os perfis destes extratos, justificando a separação não ocorrida dos extratos por tipo (comum e verde) nos estudos de classificação. Isso mostra que os extratos advindos da região sudeste, independente da sua rotulação como sendo de própolis comum ou verde, possivelmente apresentarão composição química semelhante.

Com relação aos compostos fenólicos avaliados, não foram observados quercetina e ácido caféico nos extratos de própolis das regiões sul e sudeste estudados neste trabalho. O flavonóide quercetina é muito relatado em própolis de zonas temperadas, enquanto que o ácido caféico e seus derivados podem ser encontrados em própolis de zonas tropicais, de acordo com a literatura [5, 41, 167].

Visando uma comparação entre os resultados obtidos pelas metodologias espectrofotométrica e cromatográfica na determinação do teor de fenóis totais, foram analisadas 15 amostras de extratos de própolis das regiões sul e sudeste (tipos comum e verde), com vários teores de extrato seco.

Considerando a alta quantidade de ácido *p*-cumárico, pinocembrina e galangina encontrada nos extratos de própolis das duas regiões, estes compostos juntamente com o ácido gálico e uma mistura de pinocembrina e ácido *p*-cumárico (proporção de 1:1) foram avaliados como compostos de referência na determinação do teor de fenóis totais a partir da metodologia espectrofotométrica Folin-Ciocalteu.

Uma curva de calibração foi construída para cada padrão de composto fenólico, contendo oito pontos que variaram na faixa de 1,0 a 17,0 µg/mL. As regressões foram avaliadas em relação ao tipo de ajuste (MMQO ou MMQP) e sua qualidade. Em todos os casos os resíduos tiveram comportamento aleatório sendo utilizado, dessa maneira, o método dos mínimos quadrados ordinário.

Como pode ser observado na Tabela 23, dos compostos fenólicos avaliados, o ácido gálico foi o que apresentou maior absorvidade molar no comprimento de onda de 760 nm. O ácido gálico possui a estrutura mais simples de todos os ácidos fenólicos e isso facilita sua complexação com os metais presentes no reagente Folin-Ciocalteu, gerando uma maior resposta de absorção do que os outros compostos, que possuem uma estrutura mais complexa. Desse modo, utilizou-se o ácido gálico como composto de referência na metodologia espectrofotométrica para determinação do teor de fenóis totais.

A Tabela 24 apresenta os valores encontrados para o teor de fenóis totais encontrados nos extratos empregando a metodologia espectrofotométrica e HPLC, além dos valores de  $t$  obtidos para as diferenças individuais para cada amostra.

Tabela 23. Absortividades molares no comprimento de onda de 760 nm.

Composto	Classe	Absortividade molar (L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
Ácido gálico	Ácido fenólico	19455 ± 354
Ácido <i>p</i> -cumárico	Ácido fenólico	10152 ± 72
Galangina	Flavonóide	15038 ± 180
Pinocebrina	Flavonóide	10905 ± 87
Pinocebrina + Ácido <i>p</i> -cumárico (1:1)	Flavonóide + Ácido fenólico	9891 ± 109

Tabela 24. Teor de fenóis totais em extratos de própolis das regiões sul e sudeste.

Amostra	Estado	Fenóis totais por HPLC-DAD (g/L)	Fenóis totais por espectrofotometria (g/L)	$t_{\text{calc}}^*$
C7	MG	4,78 ± 0,19	5,13 ± 0,41	2,291
C9	MG	20,67 ± 0,56	26,61 ± 2,89	3,871
C14	MG	4,06 ± 0,16	8,76 ± 0,37	41,844
C15	SP	4,55 ± 0,18	11,86 ± 1,00	24,103
C55	MG	27,29 ± 0,63	36,46 ± 1,75	16,292
C68	MG	29,81 ± 0,69	43,96 ± 2,16	10,359
C75	SP	6,86 ± 0,27	27,48 ± 2,43	15,433
V25	MG	54,91 ± 1,26	50,49 ± 0,95	13,315
V26	MG	13,07 ± 0,35	20,88 ± 1,56	16,438
C38	SC	8,59 ± 0,33	36,90 ± 3,72	25,175
C70	PR	3,03 ± 0,12	18,41 ± 0,38	84,176
C77	PR	1,83 ± 0,07	9,33 ± 0,30	53,654
C78	PR	3,81 ± 0,15	24,13 ± 3,28	20,554
C80	PR	6,08 ± 0,24	19,85 ± 0,65	43,450
C93	SC	5,45 ± 0,21	26,73 ± 1,60	43,989

\*  $t_{5,95\%}=2,571$

Para avaliar a concordância entre os valores obtidos pelos dois métodos, um teste t pareado foi realizado, encontrando o valor de t igual a 5,944. Por esse valor ser maior que o valor de t crítico para 14 graus de liberdade e 95% de confiança ( $t_{14,95\%} = 2,145$ ), pode-se concluir que as metodologias espectrofotométrica e HPLC são significativamente diferentes.

Como pode ser observado na Tabela 24, das 15 amostras avaliadas, somente para uma amostra (C7) os valores para o teor de fenóis totais obtidos por ambas as metodologias foram semelhantes, para cinco graus de liberdade e nível de confiança de 95% ( $t_{5,95\%} = 2,571$ ). Para as demais amostras os valores obtidos não foram coincidentes entre si, sendo que em todos os casos os valores obtidos através da metodologia espectrofotométrica foram maiores que os valores obtidos pela metodologia cromatográfica. Essa diferença entre os teores de fenóis tende a ser maior se forem utilizados os outros padrões citados na Tabela 23 ao invés do ácido gálico, no cálculo do teor de fenóis a partir da metodologia espectrofotométrica.

Mesmo utilizando os compostos descritos na literatura como os majoritários em própolis das regiões sudeste e sul do Brasil, a diferença entre os valores encontrados pode ser explicada pela alta quantidade de compostos com picos na região próxima do tempo de retenção do artepillin C, que não foram utilizados no processo de quantificação pela metodologia cromatográfica, e aparecem nos cromatogramas da maior parte das amostras. Na literatura existem muitos trabalhos envolvendo estudos de identificação de compostos fenólicos em própolis brasileira, mas poucos trabalhos tratam de estudos de quantificação dos mesmos.

Com relação aos possíveis compostos fenólicos não identificados, Kumazawa e colaboradores [52] encontraram em própolis verde e em folhas de *Baccharis dracunculifolia*, ambas coletadas no Estado de Minas Gerais, compostos que possuem tempos de retenção altos, na região em torno do pico do artepillin C. Estes compostos são derivados prenilados do ácido *p*-cumárico.

Nos estudos de Marcucci e colaboradores [86] também foram encontrados derivados prenilados do ácido *p*-cumárico em amostras de própolis coletadas no Estado do Paraná. Midorikawa e colaboradores [106] encontraram em própolis dos Estados de Minas Gerais e Paraná, compostos prenilados derivados do ácido *p*-cumárico e outros compostos como ácido 15-acetoxiisocuprêssico, ácido agático, ácido agático 15-metil éster, ácido agatálico, ácido cuprêssico e betuletol. Em ambos os estudos, os compostos descritos acima apresentaram alta retenção na coluna

cromatográfica, na faixa de tempo de retenção próxima ao apresentado pelo artepillin C.

O método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu, empregado na determinação do teor de fenóis totais em própolis, já teve a sua exatidão avaliada em outros estudos presentes na literatura. Nos estudos de Popova e colaboradores [94] o método Folin-Ciocalteu mostrou-se exato, a partir da comparação entre os resultados obtidos através das metodologias espectrofotométrica e HPLC-DAD. Neste estudo foram utilizadas seis amostras de própolis de álamo, advindas dos países Itália, Bulgária e Suíça. Estas amostras são ricas em flavonóides, principalmente flavanonas e flavonóis. Por este motivo, os autores utilizaram uma mistura de pinocembrina e galangina, na proporção de 2:1, como referência na metodologia espectrofotométrica, por esta mistura fornecer uma recuperação maior do que outros padrões testados. Os valores obtidos para o teor de fenóis totais em ambas as metodologias foram coincidentes entre si, para um nível de confiança de 99%.

### 6.2.3 Avaliação de deslocamento de banda

Sabe-se que substituintes presentes no anel benzênico podem causar deslocamentos do máximo de absorção para comprimentos de onda maiores ou menores. Assim, antes de determinar o teor de fenóis totais dos extratos de própolis, avaliaram-se possíveis deslocamentos do máximo de absorção para cada extrato analisado.

Para a determinação do teor de fenóis totais, as soluções dos extratos de própolis foram preparadas em quintuplicatas independentes e cada replicata foi lida em triplicata. Das 66 amostras analisadas, 21 amostras apresentaram deslocamento hipsocrômico, ou seja, deslocamento do máximo de absorção para menores comprimentos de onda. A Figura 40 apresenta bandas de absorção na região UV-Vis de cinco amostras que apresentaram deslocamento hipsocrômico e outras cinco amostras que não apresentaram deslocamento do máximo de absorção. Nesta figura foi adicionado o espectro de absorção de uma solução de ácido gálico 1,0 µg/mL. A Tabela 25 apresenta os extratos que tiveram o deslocamento

hipsocrômico e os respectivos teores de fenóis obtidos no comprimento de onda de máxima absorção e no comprimento de onda de 760 nm.

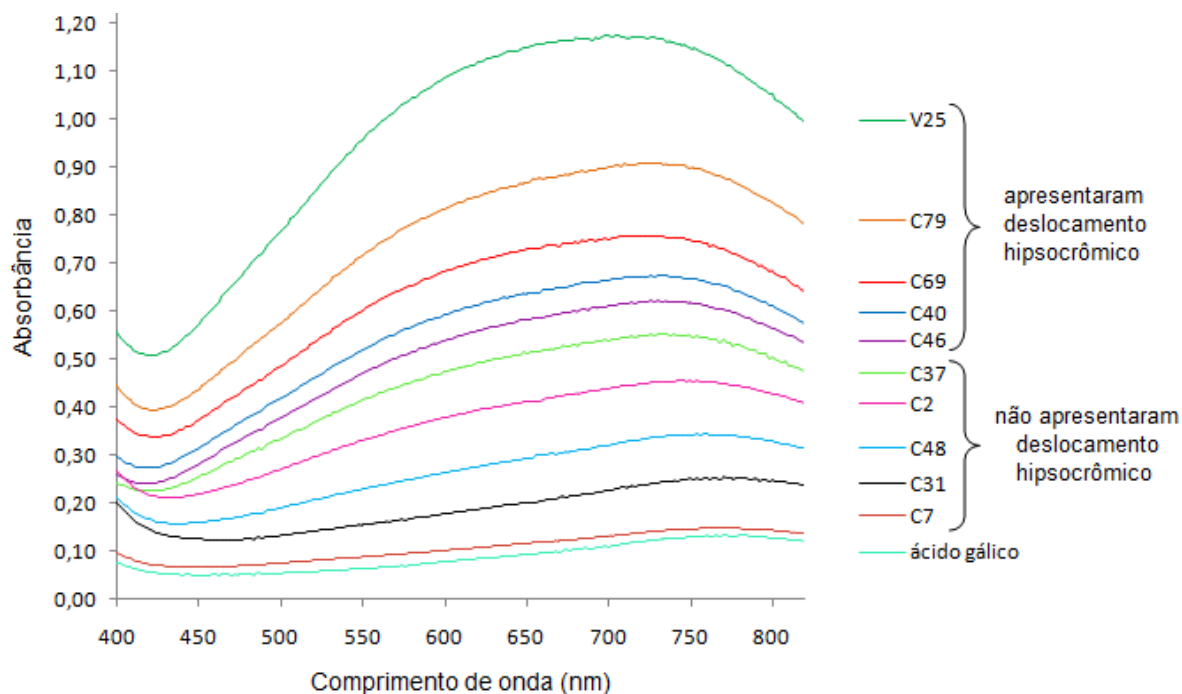


Figura 40. Bandas de absorção de extratos de própolis e seus possíveis deslocamentos hipsocrômicos.

Como pode ser observado na Figura 40, os extratos que apresentaram deslocamento hipsocrômico são os que apresentaram maior teor de fenóis. Quanto maior a concentração de fenóis, maior é o deslocamento do máximo de absorção para menores comprimentos de onda. Extratos de ambas as regiões estudadas e de ambos os tipos de própolis apresentaram deslocamento hipsocrômico. Assim, pode-se dizer que o deslocamento hipsocrômico pode ocorrer em extratos de qualquer região e de qualquer tipo de própolis.

Os deslocamentos hipsocrômicos não tiveram nenhuma relação com o teor de extrato seco, sendo que extratos com altos e baixos teores de extrato seco apresentaram deslocamento do máximo de absorção. Os deslocamentos hipsocrômicos também não tiveram nenhuma relação com a região de onde os extratos advêm. Como pode ser observado na Tabela 25, o maior deslocamento ocorreu para a amostra C95, com o comprimento de onda com máxima absorção em 692 nm, e o menor deslocamento foi verificado para a amostra C55, para o comprimento de onda de 736 nm. Extratos com teores de fenóis maiores que a

amostra C95 apresentaram deslocamentos do máximo de absorção para comprimentos de onda maiores que esta.

Tabela 25. Teor de fenóis obtidos para o comprimento de onda de máxima absorção e para o comprimento de onda de 760 nm.

Amostra	Estado	$\lambda$ máxima absorção	Teor de extrato seco (% m/v)	Teor de fenóis no $\lambda_{\text{máx.}}$ ( $\text{g L}^{-1}$ )	Teor de fenóis em 760 nm ( $\text{g L}^{-1}$ )	Teste t *
C34	MG	732	16,82 ± 0,23	36,16 ± 4,65	36,56 ± 4,94	0,163
C46	SP	728	7,01 ± 0,02	25,79 ± 2,04	26,16 ± 2,10	0,350
C27	MG	718	11,30 ± 0,22	23,70 ± 1,00	23,91 ± 1,00	0,398
C56	MG	722	8,40 ± 0,13	42,59 ± 4,25	43,88 ± 4,48	0,579
C49	MG	732	6,75 ± 0,04	20,63 ± 0,73	20,25 ± 0,77	1,119
C68	MG	722	15,48 ± 0,45	43,96 ± 2,16	45,30 ± 2,31	1,176
C69	MG	730	12,23 ± 0,18	30,48 ± 1,60	31,16 ± 1,65	0,823
C55	MG	736	15,48 ± 0,32	35,24 ± 2,34	35,90 ± 2,44	0,537
C90	RJ	714	12,04 ± 0,08	42,49 ± 3,16	43,65 ± 3,40	0,696
C95	MG	692	10,06 ± 0,11	48,16 ± 3,83	49,86 ± 4,14	0,834
C97	MG	732	10,72 ± 0,28	27,54 ± 2,53	28,01 ± 2,65	0,354
V17	SP	714	44,80 ± 0,66	56,06 ± 5,49	58,81 ± 5,95	0,945
V21	MG	724	14,55 ± 0,04	50,12 ± 2,30	51,73 ± 2,36	1,356
V25	MG	726	15,93 ± 0,31	49,16 ± 4,28	50,66 ± 4,52	0,768
V28	MG	716	25,83 ± 0,33	42,80 ± 4,11	43,91 ± 4,34	0,513
V20	MG	724	14,74 ± 0,50	34,82 ± 3,53	35,63 ± 3,68	0,441
V39	MG	726	18,42 ± 0,42	58,51 ± 3,52	60,21 ± 3,80	1,418
V40	SP	712	9,39 ± 0,27	53,60 ± 3,96	55,71 ± 4,32	1,142
C79	PR	720	12,06 ± 0,10	38,99 ± 0,85	39,74 ± 0,89	1,679
C41	PR	732	5,40 ± 0,06	25,27 ± 1,59	25,73 ± 1,64	0,555
C40	PR	724	14,51 ± 0,27	28,97 ± 1,24	29,54 ± 1,31	0,868

\*  $t_{8,95\%}=2,306$

Dessa maneira, a composição química de cada amostra pode influenciar no deslocamento, uma vez que, o que é medido em cada amostra é a absorção da radiação UV-Vis dos complexos formados entre os compostos fenólicos presentes na própolis e os metais presentes no reagente Folin-Ciocalteu. Diferentes padrões de substituição de grupos presentes no anel benzênico dos fenóis podem influenciar o deslocamento do máximo de absorção dos extratos de própolis. Quanto maiores forem as quantidades de grupos substituintes no anel benzênico dos fenóis capazes

de formar complexos com os metais presentes no reagente Folin-Ciocalteu, maiores serão os deslocamentos dos máximos de absorção.

Com o intuito de avaliar se os deslocamentos hipsocrômicos interferem significativamente nos valores obtidos na quantificação dos teores de fenóis, os resultados obtidos no comprimento de onda de máxima absorção foram comparados com os obtidos em 760 nm, que é comprimento de onda utilizado na metodologia espectrofotométrica proposta neste trabalho.

Como pode ser observado na Tabela 25, o teste t aplicado para as diferenças individuais (para cada amostra) apresentou valores menores que o t crítico, indicando que os teores de fenóis totais obtidos em ambos os comprimentos de onda avaliados não foram estatisticamente diferentes entre si, para o nível de confiança de 95%. Dessa maneira, o comprimento de onda de 760 nm pode ser utilizado para a leitura de todas as amostras analisadas.

#### **6.2.4 Quantificação do teor de fenóis totais de extratos de própolis comerciais a partir do método Folin-Ciocalteu**

Após a otimização e validação do método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu e a avaliação do deslocamento hipsocrômico, a determinação do teor de fenóis totais de 66 extratos de própolis comerciais foi realizada pela metodologia proposta, sendo 17 extratos de própolis verde e 49 extratos de própolis comum (9 extratos da região sul e 40 da região sudeste). Os teores de fenóis totais (Tabela 26) foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico em 100 mg de extrato de própolis, mg de ácido gálico em 100 mg de extrato seco e como g de ácido gálico em 1 L de extrato de própolis).

Os valores encontrados de teor de fenóis totais variaram na faixa de 0,85 a 11,06% (m/m) em relação à massa de extrato de própolis, todos acima do limite mínimo de 0,5% (m/m) estabelecido pelo MAPA. Os teores de fenóis totais também foram expressos em outras unidades na Tabela 26 para facilitar a comparação dos resultados obtidos neste trabalho com outros da literatura. Os teores de fenóis também se apresentaram na faixa de 5,05 a 57,10% (m/m) em relação à massa de extrato seco e de 7,12 a 60,7 g/L, para extratos comerciais de própolis com teores de extrato seco na faixa de 2,35 a 28,87% (m/v).

Tabela 26. Teores de fenóis totais em extratos de própolis comerciais oriundos das regiões sul e sudeste do Brasil. (continua)

Região e tipo	Amostra	Teor de extrato seco (% m/v)	Teor de fenóis (g L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Teor de fenóis (% m/m) <sup>b</sup>	Teor de fenóis (% m/m) <sup>c</sup>	DPR (%) <sup>d</sup>
Sudeste (comum)	C3	6,48 ± 0,16	16,91 ± 0,32	2,51 ± 0,09	26,08 ± 0,81	3,1
	C7	2,35 ± 0,04	5,13 ± 0,41	0,85 ± 0,07	21,80 ± 1,76	8,1
	C14	3,51 ± 0,04	8,76 ± 0,37	1,31 ± 0,08	24,93 ± 1,08	4,3
	C27	11,30 ± 0,22	23,13 ± 0,06	3,55 ± 0,17	20,48 ± 0,41	2,0
	C28	12,09 ± 0,39	37,44 ± 2,20	6,02 ± 0,48	30,96 ± 2,08	6,7
	C33	10,63 ± 0,04	48,93 ± 4,28	8,83 ± 1,02	46,04 ± 4,03	8,7
	C34	16,82 ± 0,23	36,47 ± 1,91	5,02 ± 0,34	21,23 ± 1,39	6,6
	C37	11,21 ± 0,13	23,41 ± 1,31	3,02 ± 0,23	20,89 ± 1,19	5,7
	C48	4,34 ± 0,05	14,42 ± 0,91	2,02 ± 0,18	33,24 ± 2,12	6,4
	C49	6,75 ± 0,04	20,63 ± 0,73	3,12 ± 0,22	30,57 ± 1,11	3,6
	C50	13,84 ± 0,30	25,96 ± 2,41	3,17 ± 0,36	18,76 ± 1,79	9,5
	C51	13,39 ± 0,07	27,26 ± 0,59	3,44 ± 0,14	20,36 ± 0,45	2,2
	C52	15,15 ± 0,21	40,07 ± 1,37	4,48 ± 0,25	26,45 ± 0,98	3,7
	C72	14,20 ± 0,06	27,23 ± 2,63	3,44 ± 0,38	19,17 ± 1,86	9,7
	C86	12,75 ± 0,32	37,00 ± 2,39	5,15 ± 0,48	29,02 ± 2,02	7,0
	C87	10,14 ± 0,11	19,73 ± 0,30	2,61 ± 0,14	19,47 ± 0,36	1,8
	C91	14,11 ± 0,12	7,12 ± 0,62	0,97 ± 0,10	5,05 ± 0,44	8,8
	C95	10,06 ± 0,11	48,16 ± 3,83	11,06 ± 1,07	47,86 ± 3,84	8,0
	C96	6,87 ± 0,05	10,55 ± 0,50	1,58 ± 0,12	15,36 ± 0,74	4,8
	C97	10,72 ± 0,28	27,54 ± 2,53	4,75 ± 0,59	25,69 ± 2,45	9,5
	C53	28,87 ± 0,49	50,21 ± 1,96	5,78 ± 0,40	17,39 ± 0,74	4,3
	C55	15,48 ± 0,32	36,46 ± 1,75	3,90 ± 0,31	23,55 ± 1,23	5,2
	C56	8,40 ± 0,13	43,80 ± 3,86	5,37 ± 0,53	52,16 ± 4,67	8,9
	C57	4,77 ± 0,26	13,04 ± 0,24	1,99 ± 0,13	27,33 ± 1,58	5,8
	C60	11,31 ± 0,09	22,89 ± 1,25	3,14 ± 0,25	20,23 ± 1,12	5,5
	C68	15,48 ± 0,45	43,96 ± 2,16	6,54 ± 0,50	28,39 ± 1,63	5,7
	C69	12,23 ± 0,18	30,91 ± 1,59	4,30 ± 0,38	25,27 ± 1,35	5,3
	C5	12,93 ± 0,47	38,60 ± 3,64	4,54 ± 0,47	29,84 ± 3,01	10,1
	C15	4,35 ± 0,07	11,86 ± 1,00	1,71 ± 0,17	27,26 ± 2,34	8,6
C29	11,72 ± 0,12	14,25 ± 0,76	2,23 ± 0,15	12,16 ± 0,66	5,4	

<sup>a</sup> g de ácido gálico em 1 L de extrato de própolis<sup>b</sup> mg de ácido gálico em 100 mg de extrato de própolis<sup>c</sup> mg de ácido gálico em 100 mg de extrato seco<sup>d</sup> desvio padrão relativo para o teor de fenóis em relação ao extrato seco

Tabela 26. Teores de fenóis totais em extratos de própolis comerciais oriundos das regiões sul e sudeste do Brasil. (continuação)

Região e tipo	Amostra	Teor de extrato seco (% m/v)	Teor de fenóis (g L <sup>-1</sup> ) a	Teor de fenóis (% m/m) <sup>b</sup>	Teor de fenóis (% m/m) <sup>c</sup>	DPR (%) <sup>d</sup>
Sudeste (comum)	C43	6,24 ± 0,09	10,38 ± 0,41	2,06 ± 0,19	16,63 ± 0,71	4,2
	C45	24,80 ± 0,06	42,97 ± 1,35	7,07 ± 0,55	17,32 ± 0,54	3,1
	C46	7,01 ± 0,02	25,13 ± 1,29	3,75 ± 0,27	35,83 ± 1,84	5,1
	C54	13,45 ± 0,26	22,78 ± 0,86	3,67 ± 0,31	16,94 ± 0,72	4,2
	C82	27,25 ± 0,33	53,93 ± 0,89	7,27 ± 0,82	19,79 ± 0,40	2,0
	C84	8,42 ± 0,08	46,87 ± 0,40	6,89 ± 0,30	55,63 ± 0,71	1,3
	C85	11,00 ± 0,11	18,07 ± 0,78	2,57 ± 0,22	16,43 ± 0,73	4,4
	C88	10,02 ± 0,17	18,69 ± 0,44	2,86 ± 0,19	18,66 ± 0,55	2,9
	C90	12,04 ± 0,08	42,49 ± 3,16	5,82 ± 0,65	35,28 ± 2,64	7,5
	C64	8,92 ± 0,15	20,88 ± 1,61	2,46 ± 0,23	23,40 ± 1,85	7,9
Sudeste (verde)	V25	15,93 ± 0,31	50,49 ± 0,95	7,30 ± 0,51	31,69 ± 0,86	2,7
	V26	8,43 ± 0,08	20,88 ± 1,56	2,92 ± 0,27	24,78 ± 1,86	7,5
	V28	25,83 ± 0,33	41,39 ± 1,88	6,65 ± 0,55	16,02 ± 0,75	4,7
	V34	14,77 ± 0,26	39,42 ± 0,66	6,08 ± 0,32	26,68 ± 0,65	2,4
	V12	15,06 ± 0,56	37,12 ± 3,71	5,95 ± 0,66	24,66 ± 2,63	10,7
	V13	15,48 ± 0,46	30,83 ± 2,04	5,39 ± 0,48	19,91 ± 1,44	7,2
	V14	9,99 ± 0,02	20,81 ± 1,08	3,35 ± 0,22	20,84 ± 1,09	5,2
	V20	14,74 ± 0,50	35,80 ± 3,35	5,91 ± 0,62	24,29 ± 2,42	10,0
	V21	14,55 ± 0,04	50,13 ± 0,12	7,33 ± 0,37	34,46 ± 0,13	0,4
	V36	20,57 ± 0,13	34,40 ± 0,97	4,87 ± 0,33	16,73 ± 0,48	2,9
	V38	10,18 ± 0,08	30,20 ± 1,67	4,72 ± 0,35	29,68 ± 1,66	5,6
	V39	18,42 ± 0,42	58,51 ± 3,52	8,58 ± 0,76	31,76 ± 2,04	6,4
	V27	10,88 ± 0,22	16,12 ± 1,36	2,67 ± 0,29	14,82 ± 1,28	8,7
	V29	14,72 ± 0,09	53,75 ± 1,12	8,42 ± 0,41	36,52 ± 0,80	2,2
	V30	11,18 ± 0,08	60,53 ± 4,73	9,52 ± 1,01	54,12 ± 4,25	7,9
	V33	11,16 ± 0,12	16,83 ± 0,70	1,97 ± 0,14	15,09 ± 0,65	4,3
	V40	9,39 ± 0,27	53,60 ± 3,96	6,38 ± 0,60	57,10 ± 4,52	7,9

<sup>a</sup> g de ácido gálico em 1 L de extrato de própolis

<sup>b</sup> mg de ácido gálico em 100 mg de extrato de própolis

<sup>c</sup> mg de ácido gálico em 100 mg de extrato seco

<sup>d</sup> desvio padrão relativo para o teor de fenóis em relação ao extrato seco

Tabela 26. Teores de fenóis totais em extratos de própolis comerciais oriundos das regiões sul e sudeste do Brasil. (continuação)

Região e tipo	Amostra	Teor de extrato seco (% m/v)	Teor de fenóis (g L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Teor de fenóis (% m/m) <sup>b</sup>	Teor de fenóis (% m/m) <sup>c</sup>	DPR (%) <sup>d</sup>
Sul (comum)	C35	11,59 ± 0,17	18,14 ± 0,98	2,95 ± 0,21	15,65 ± 0,88	5,6
	C40	14,51 ± 0,27	28,32 ± 0,29	4,69 ± 0,39	19,51 ± 0,41	2,1
	C41	5,40 ± 0,06	26,15 ± 0,80	4,65 ± 0,41	48,44 ± 1,58	3,3
	C21	13,56 ± 0,29	39,08 ± 1,06	4,37 ± 0,26	28,82 ± 0,99	3,5
	C70	14,54 ± 0,09	18,41 ± 0,38	3,29 ± 0,43	12,66 ± 0,27	2,2
	C77	5,56 ± 0,08	9,33 ± 0,30	1,83 ± 0,22	16,80 ± 0,58	3,5
	C79	12,06 ± 0,10	38,99 ± 0,85	7,19 ± 0,58	32,34 ± 0,76	2,3
	C80	8,94 ± 0,09	19,85 ± 0,65	2,89 ± 0,21	22,22 ± 0,76	3,4
	C93	16,32 ± 0,13	26,73 ± 1,60	3,24 ± 0,28	16,38 ± 0,99	6,1

<sup>a</sup> g de ácido gálico em 1 L de extrato de própolis

<sup>b</sup> mg de ácido gálico em 100 mg de extrato de própolis

<sup>c</sup> mg de ácido gálico em 100 mg de extrato seco

<sup>d</sup> desvio padrão relativo para o teor de fenóis em relação ao extrato seco

O desvio padrão relativo obtido para cada amostra analisada variou de 0,4 a 10,7%. Altos valores encontrados para o desvio padrão relativo das medidas, para algumas amostras, podem ser atribuídos ao pequeno volume de extrato (5 µL) utilizado nos ensaios. Esse volume foi utilizado por apresentar valores de absorbância próximos de 1 para a maioria das amostras analisadas, adequado para as condições que foram anteriormente otimizadas, como a quantidade dos reagentes Folin-Ciocalteu e tampão carbonato de sódio. Optou-se por não utilizar diluições sucessivas da amostra para evitar a adição de erros sistemáticos no processo de medição.

Comparando os resultados obtidos para o teor de fenóis totais baseado na massa de extrato seco, não foi possível observar uma relação entre o teor de fenóis, o tipo de própolis utilizada na extração e a origem da mesma.

A instrução normativa do MAPA [19] regulamenta o mínimo de 0,5% (m/m) de fenóis totais em extratos de própolis, para que estes possam ser comercializados. Entretanto, a instrução normativa do MAPA não deixa claro se o cálculo do teor de fenóis totais em extratos de própolis (e não em própolis bruta) deve-se basear na massa de extrato de própolis, na massa de extrato seco ou na massa de própolis que foi solubilizada.

Correlacionando os dois parâmetros físico-químicos, teor de extrato seco e teor de fenóis totais, exigidos pelo MAPA, para o controle da qualidade de extratos de própolis, observou-se que mesmo amostras com teor de extrato seco abaixo do limite mínimo estabelecido pelo MAPA para sua comercialização (11% m/v) apresentaram valores para o teor de fenóis totais acima do estabelecido pela legislação (0,5% m/m). A Figura 41 apresenta a relação entre estes parâmetros com os valores mínimos estipulados pela legislação brasileira.

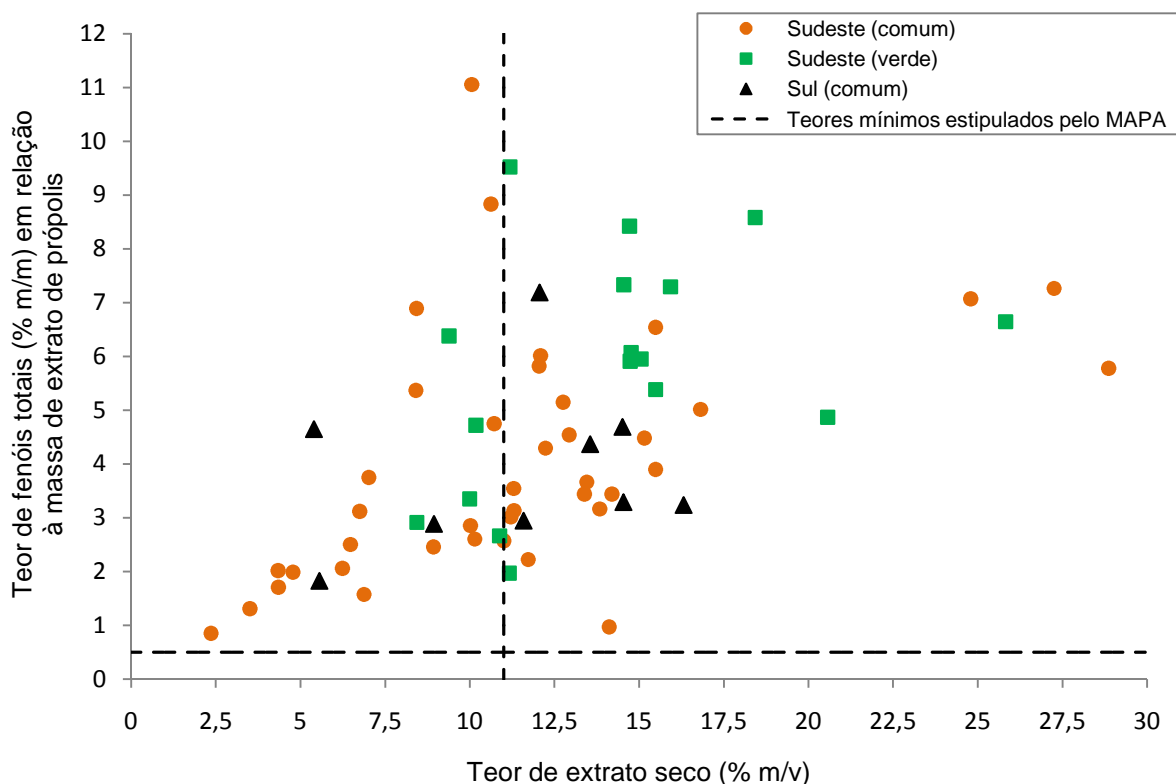


Figura 41. Relação entre os parâmetros de qualidade teor de fenóis totais e teor de extrato seco. (Os valores mínimos estipulados pela legislação brasileira encontram-se marcados com uma linha tracejada na figura).

Esse fato demonstra que há uma contradição dentro da própria legislação na fixação dos valores mínimos de qualidade para estes parâmetros, para comercialização de extratos de própolis. Os resultados mostram que extratos de própolis com teores de extrato seco abaixo de 11% (m/v) podem apresentar altos valores de fenóis totais, podendo estes serem maiores que os valores apresentados por extratos com altos teores de extrato seco, como pode ser observado na Figura 41.

Não existe um consenso na literatura na forma como expressar o teor de fenóis totais em extratos de própolis. Alguns trabalhos expressam o teor de fenóis em relação ao extrato seco e em outros, em relação à massa de própolis utilizada para preparar o extrato, dificultando, dessa maneira, a comparação entre resultados obtidos por outros pesquisadores.

Nos estudos de Silva e colaboradores [172] 49 extratos de própolis comerciais de várias regiões do Brasil foram analisados e correlacionados com suas atividades antimicrobiana e antioxidante. Neste estudo, os autores não avaliaram o teor de extrato seco dos extratos estudados e o teor de fenóis totais foi reportado como g de ácido gálico por 100 mL de extrato de própolis. Os teores de fenóis totais encontrados estiveram na faixa de 4,1 a 39,0 g L<sup>-1</sup>, valores semelhantes aos encontrados neste estudo.

Buriol e colaboradores [85] estudaram a composição química e a atividade biológica de extratos oleosos de própolis da cidade Prudentópolis, Estado do Paraná, encontrando teores de fenóis que variaram de 8,55 a 15,95 % (m/m) em relação ao teor de extrato seco. Estes valores variaram conforme o teor alcoólico utilizado no processo de extração.

### 6.3 Conclusões

A metodologia espectrofotométrica proposta foi validada, apresentando adequados valores para os parâmetros de mérito avaliados. Entretanto, a exatidão ficou comprometida, pois a maioria das amostras analisadas apresentou compostos que não foram utilizados no processo de quantificação.

Os extratos de própolis de ambas as regiões sul e sudeste apresentaram uma grande quantidade de compostos, sendo que, para a maioria dos extratos estudados, os compostos majoritários foram o flavonóide pinocembrina e o ácido fenólico artepillin C. Isso se justifica pela preferência das abelhas por espécies de *Baccharis* para retirada de resinas na produção da própolis, que são ricas destes compostos fenólicos.

O deslocamento hipsocrômico do comprimento de onda de máxima absorção, apresentado em algumas amostras não teve influência significativa nos resultados finais para o teor de fenóis totais em extratos de própolis.

Os teores de fenóis totais encontrados estão de acordo com outros resultados apresentados na literatura. Estes teores foram superiores ao valor mínimo exigido pelo MAPA, inclusive para extratos que tiveram teores de extrato seco abaixo do valor mínimo de 11% (m/v), exigido para este último parâmetro. Neste sentido, os resultados obtidos indicam a necessidade de uma revisão dos parâmetros físico-químicos e seus valores mínimos, contidos na instrução normativa do MAPA, para que estes possam realmente assegurar a qualidade dos produtos apícolas brasileiros.

## **CAPÍTULO 7**

### ***Considerações Finais***

---

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta tese, metodologias quimiométricas juntamente com metodologias espectrofotométricas foram desenvolvidas para avaliação de parâmetros de qualidade de extratos de própolis comerciais. A utilização de métodos de classificação, na identificação da possível origem da própolis utilizada na produção de extratos, mostrou-se uma alternativa adequada para identificar a região que os mesmos advêm, garantindo a procedência. Sabe-se que a própolis verde, produzida na região sudeste do Brasil, é mais valorizada no mercado internacional, por ser rica em compostos fenólicos, como o artepillin C. Este tipo de própolis só é encontrado no Brasil, tendo preferência manifestada pelo Japão por causa das suas propriedades antioxidante, antiinflamatória, antitumoral e outras. Nesse sentido, a identificação da região produtora garante que extratos de outras regiões do país rotulados como sendo de própolis verde, possam ser identificados e notificados.

O método de calibração multivariada PLS, desenvolvido para determinação do teor de extrato seco em extratos comerciais de própolis, pode ser utilizado como método de *screening* para identificar extratos que não atendem o limite mínimo estabelecido para este parâmetro de qualidade, pela instrução normativa nº 3, de 2001, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. A metodologia proposta neste trabalho tem a vantagem de ser rápida, menos laboriosa e envolver menos reagentes que a metodologia tradicional gravimétrica. Esta metodologia pode ser implementada em análises de rotina para um rápido controle de qualidade destes produtos.

Na literatura estão presentes várias condições instrumentais na utilização do método Folin-Ciocalteu, para determinação do teor de fenóis totais em própolis. A otimização experimental do método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu, realizada neste trabalho, apresentou vantagens como a redução nas quantidades de reagentes, além da redução do tempo de análise. Estes fatores tornam a metodologia espectrofotométrica proposta mais rápida e com um menor custo em relação a outras metodologias propostas na literatura.

Entretanto, a principal vantagem desta metodologia é a garantia da exatidão. Os valores otimizados das condições experimentais garantem um mínimo de espalhamento da radiação para um máximo de absorção da radiação na região do

UV-Vis, não só para soluções padrão, mas também para as soluções de extratos de própolis.

Neste estudo foi possível verificar que em condições experimentais que envolvam uma grande quantidade dos reagentes Folin e de tampão pode ocorrer a formação de sólidos em suspensão, compostos principalmente por fosfato de lítio. Estes sólidos, que muitas vezes não são visualizados a olho nu, podem interferir significativamente na resposta instrumental e, conseqüentemente, na exatidão da medida.

A avaliação dos parâmetros de mérito realizada após a otimização da metodologia espectrofotométrica apresentou valores adequados, demonstrando que a mesma pode ser empregada para a determinação do teor de fenóis totais.

A determinação do teor de fenóis totais em extratos comerciais de própolis das regiões sul e sudeste do Brasil foi realizada através do método Folin-Ciocalteu. Os valores encontrados de teor de fenóis totais variaram na faixa de 0,85 a 11,1% (m/m) em relação à massa de extrato de própolis, para extratos com teores de extrato seco de 2,35 a 28,8% (m/v).

Neste trabalho, foi possível verificar que extratos alcoólicos com teores de extrato seco abaixo do mínimo estabelecido pela legislação brasileira apresentaram valores acima do mínimo estabelecido para o teor de fenóis totais.

Análises cromatográficas também foram realizadas, encontrando diversas classes de compostos fenólicos nos extratos das regiões sul e sudeste. Pode-se verificar que os extratos da região sudeste, de ambas própolis verde e comum, apresentaram composição química semelhante, encontrando como compostos majoritários o ácido fenólico artepillin C e o flavonóide pinocembrina.

Já os extratos de própolis da região sul apresentaram uma grande variação nas suas composições químicas, sendo que, os extratos produzidos nos estados próximos da região sudeste apresentaram compostos fenólicos semelhantes ao desta região. Em muitos extratos, pode-se verificar a presença do artepillin C, composto que é advindo de espécies de *Baccharis*, predominante em vegetação de cerrado. Entretanto, a questão da compra de própolis bruta de outras localidades por entrepostos dificulta a afirmação da real composição química dos extratos de própolis da região sul do país.

Nos estudos cromatográficos foi possível identificar outros compostos fenólicos que não são classificados na literatura como pertencentes ao grupo de

compostos majoritários em própolis das regiões sul e sudeste. Verificou-se neste estudo que estes compostos interferem no teor de fenóis totais e que estes compostos são significativos na determinação deste parâmetro. Em estudos futuros, a identificação e a quantificação destes compostos em extratos de própolis serão realizadas.

Estudos na área de controle de qualidade de produtos apícolas têm sido incipientes. No Brasil, este setor da economia tem crescido, necessitando cada vez mais de controles mais rígidos que garantam a qualidade de seus produtos. Nesse sentido, todos os estudos desenvolvidos nesta tese contribuíram significativamente para uma melhor avaliação da qualidade dos extratos comerciais de própolis brasileira. Os resultados encontrados evidenciam necessidade de revisão da legislação brasileira em vigor, sendo que esta encontra-se sem nenhuma revisão a pelo menos 11 anos.

## **CAPÍTULO 8**

### ***Referências Bibliográficas***

---

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bankova, V.S., S.L. de Castro, and M.C. Marcucci, *Propolis: recent advances in chemistry and plant origin*. *Apidologie*, 2000. **31**(1): p. 3-15.
2. Salatino, A., et al., *Origin and chemical variation of Brazilian propolis*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2005. **2**(1): p. 33-38.
3. Teixeira, É.W., et al., *Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2005. **2**(1): p. 85-92.
4. Sahinler, N. and O. Kaftanoglu, *Natural product propolis: chemical composition*. *Natural Product Research*, 2005. **19**(2): p. 183-188.
5. Park, Y.K., S.M. Alencar, and C.L. Aguiar, *Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002. **50**(9): p. 2502-2506.
6. Marcucci, M.C., *Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity*. *Apidologie*, 1995. **26**(2): p. 83-99.
7. Sforcin, J.M. and V. Bankova, *Propolis: is there a potential for the development of new drugs?* *Journal of Ethnopharmacology*, 2010. **133**(2): p. 253-260.
8. de Funari, C.S., V. de Oliveira Ferro, and M.B. Mathor, *Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC.(Compositae) and its effects on mouse fibroblasts*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007. **111**(2): p. 206-212.
9. Bankova, V., *Chemical diversity of propolis and the problem of standardization*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005. **100**(1-2): p. 114-117.
10. Lustosa, S.R., et al., *Própolis: atualizações sobre a química ea farmacologia*. *Braz. J. Pharmacog*, 2008. **18**: p. 447-454.
11. dos Santos Pereira, A., F.R.M.S. Seixas, and F.R. de Aquino Neto, *Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras*. *Quim. Nova*, 2002. **25**(2): p. 321-326.
12. SCIENCE DIRECT. Disponível em:  
<[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleListURL&\\_method=list&\\_ArticleListID=33650486&\\_sort=r&\\_st=4&\\_acct=C000228598&\\_version=1&\\_urlV](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=33650486&_sort=r&_st=4&_acct=C000228598&_version=1&_urlV)

- ersion=0&\_userid=10&md5=51641dade1c42e095c7304ae1a3a32ab&searchtype=a>. Acessado em 14 de novembro de 2012.
13. EUROPEAN PATENT OFFICE. Disponível em:  
<[http://worldwide.espacenet.com/searchResults?compact=false&ST=advanced&TI=propolis&locale=en\\_EP&DB=EPODOC](http://worldwide.espacenet.com/searchResults?compact=false&ST=advanced&TI=propolis&locale=en_EP&DB=EPODOC)>. Acessado em 14 de novembro de 2012.
  14. NOTÍCIAS DO CAMPO. **Apicultura muda o cenário no sertão de Alagoas.** Disponível em:  
<[http://www.noticiasdocampo.com.br/site/index.php?option=com\\_content&task=view&id=6763](http://www.noticiasdocampo.com.br/site/index.php?option=com_content&task=view&id=6763)>. Acessado em 14 de novembro de 2012.
  15. AGÊNCIA SEBRAE DE NOTÍCIAS. **Própolis vermelha de Alagoas recebe Indicação Geográfica.** Disponível em:  
<<http://www.agenciasebrae.com.br/noticia/13577439/ultimas-noticias/propolis-vermelha-de-alagoas-recebe-indicacao-geografica/>>. Acessado em 13 de outubro de 2012.
  16. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Minas Gerais é o primeiro estado a obter denominação de origem para produção de própolis verde.** Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/acontece-no-ima/1241-minas-gerais-e-o-primeiro-estado-a-obter-denominacao-de-origem-para-producao-de-propolis-verde>>. Acessado em 10 de outubro de 2012.
  17. SEBRAE. **Exportação brasileira de própolis.** Disponível em:  
<<http://www.sebrae.com.br/setor/apicultura/sobre-apicultura/mercado/exportacoes/Exportacao%20Mel%20-%20Janeiro%202011.pdf>>. Acessado em 09 de agosto de 2012.
  18. Belmiro, M.S., Y. Yumi Oki, and G.W. Fernandes, **Própolis: Nosso Tesouro. Mensagem Doce**, São Paulo, n. 112, julho. 2011. Disponível em:  
<<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/112/artigo2.htm>>. Acessado em 18 de novembro de 2012.
  19. BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa. 2001.

20. Gómez-Caravaca, A., et al., *Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006. **41**(4): p. 1220-1234.
21. Mello, B.C.B.S., J.C.C. Petrus, and M.D. Hubinger, *Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration*. Journal of Food Engineering, 2010. **96**(4): p. 533-539.
22. Pellati, F., et al., *HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011.
23. Sforcin, J., R. Orsi, and V. Bankova, *Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production*. Journal of Ethnopharmacology, 2005. **98**(3): p. 301-305.
24. Markham, K.R., et al., *HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis*. Phytochemistry, 1996. **42**(1): p. 205-211.
25. Sulaiman, G.M., et al., *Chemical Characterization of Iraqi Propolis Samples and Assessing their Antioxidant Potentials*. Food and Chemical Toxicology, 2011.
26. Ahn, M.R., et al., *Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China*. Food Chemistry, 2007. **101**(4): p. 1383-1392.
27. Nagy, E., et al., *Investigation of the chemical constituents, particularly the flavonoid components, of propolis and Populi gemma by the GC/MS method*. Stud. Org. Chem.(Amsterdam), 1986. **23**: p. 223–232.
28. Salatino, A., et al., *Origin and chemical variation of Brazilian propolis*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2005. **2**(1): p. 33-38.
29. Popravko, S., II. *Chemical Composition of Propolis. A Remarkable hive product, propolis: scientific data and suggestions concerning its composition, properties and possible use in therapeutics*, 1978: p. 15.
30. Campo, F.M., et al., *GC-MS determination of isoflavonoids in seven red Cuban propolis samples*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(21): p. 9927.

31. Dausch, A., et al., *Brazilian Red Propolis--Chemical Composition and Botanical Origin*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2008. **5**(4): p. 435-441.
32. Lotti, C., et al., *Chemical constituents of red Mexican propolis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(4): p. 2209-2213.
33. Trusheva, B., et al., *A new type of European propolis, containing bioactive labdanes*. Rivista Italiana EPPOS, 2003. **13**(36): p. 3-8.
34. Melliou, E. and I. Chinou, *Chemical analysis and antimicrobial activity of Greek propolis*. Planta Medica, 2004. **70**(6): p. 515-519.
35. Popova, M.P., et al., *GC-MS Profiling of Diterpene Compounds in Mediterranean Propolis from Greece*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(5): p. 3167-3176.
36. Popova, M.P., et al., *Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis*. Phytochemistry, 2009. **70**(10): p. 1262-1271.
37. Cuesta-Rubio, O., et al., *Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis; biological activity of nemorosone*. Zeitschrift fur Naturforschung C, 2002. **57**(3/4): p. 372-378.
38. Trusheva, B., et al., *New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis*. Fitoterapia, 2004. **75**(7-8): p. 683-689.
39. Chen, Y.W., et al., *Characterisation of Taiwanese propolis collected from different locations and seasons*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2008. **88**(3): p. 412-419.
40. Kumazawa, S., et al., *Plant origin of Okinawan propolis: honeybee behavior observation and phytochemical analysis*. Naturwissenschaften, 2008. **95**(8): p. 781-786.
41. Bankova, V., et al., *Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis*. Apidologie, 1998. **29**(4): p. 361-367.
42. Albuquerque, I.L., et al., *Ácido canárico (3, 4-seco derivado do lupano) em própolis do Ceará*. Quimica Nova, 2007. **30**(4): p. 828-831.
43. Banskota, A.H., et al., *Two novel cytotoxic benzofuran derivatives from Brazilian propolis*. Journal of Natural Products, 2000. **63**(9): p. 1277-1279.
44. da Silva, M.S.S., et al., *Triterpenóides tipo cicloartano de própolis de Teresina-PI*. Quim. Nova, 2005. **28**(5): p. 801-804.

45. Ito, J., et al., *Anti-AIDS Agents*. 48. 1 *Anti-HIV Activity of Moronic Acid Derivatives and the New Melliferone-Related Triterpenoid Isolated from Brazilian Propolis*. *Journal of Natural Products*, 2001. **64**(10): p. 1278-1281.
46. Teixeira, É.W., *Bauer-7-en-3beta-yl acetate: a major constituent of unusual samples of Brazilian propolis*. *Quimica Nova*, 2006. **29**(2): p. 245-246.
47. Trusheva, B., et al., *Bioactive constituents of Brazilian red propolis*. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2006. **3**(2): p. 249.
48. Park, Y.K., M. Ikegaki, and S.M. Alencar, *Classificação das própolis brasileiras a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas*. *Mensagem doce*, 2000. **58**(9): p. 3-7.
49. Park, Y.K., et al., *Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal*. *Ciência Rural*, 2002. **2**(1): p. 997-1003.
50. Castro, M.L., et al., *Identification of a bioactive compound isolated from Brazilian propolis type 6*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2009. **17**(14): p. 5332-5335.
51. Bankova, V.S., S.L. de Castro, and M.C. Marcucci, *Propolis: recent advances in chemistry and plant origin*. *Apidologie*, 2000. **31**(1): p. 3-16.
52. Kumazawa, S., et al., *Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2003. **51**(6): p. 740-742.
53. Simões, L., et al., *Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004. **94**(1): p. 59-65.
54. Fukuda, M., et al., *Studies on the constituents of the leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their cytotoxic activity*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2006. **54**(10): p. 1465-1468.
55. Park, Y.K., et al., *Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004. **52**(5): p. 1100-1103.
56. Alencar, S.M., et al., *Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais; Chemical composition of *Baccharis dracunculifolia*, the botanical source of propolis from*

- the states of São Paulo and Minas Gerais, Brazil*. Ciênc. rural, 2005. **35**(4): p. 909-915.
57. NATUREZONE. **Brazilian Green Propolis**. Disponível em: <[http://www.naturezone.eu/Green%20Propolis/b\\_green%20propolis.html](http://www.naturezone.eu/Green%20Propolis/b_green%20propolis.html)>. Acessado em 11 de outubro de 2011.
58. Salomão, K., et al., *Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis*. Letters in Applied Microbiology, 2004. **38**(2): p. 87-92.
59. Kimoto, T., et al., *Renal carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice, and protection from it by Brazilian propolis and artepillin C*. Pathology International, 2000. **50**(9): p. 679-689.
60. Kimoto, T., et al., *Cell cycle and apoptosis in cancer induced by the artepillin C extracted from Brazilian propolis*. Gan to kagaku ryōhō, 1996. **23**(13): p. 1855-1859.
61. Kimoto, T., et al., *Apoptosis of human leukemia cells induced by Artepillin C, an active ingredient of Brazilian propolis*. Anticancer research, 2001. **21**(1A): p. 221-228.
62. Shimizu, K., et al., *Artepillin C in Brazilian propolis induces G0/G1 arrest via stimulation of Cip1/p21 expression in human colon cancer cells*. Molecular carcinogenesis, 2005. **44**(4): p. 293-299.
63. Oršolić, N., A. Brbot Šaranović, and I. Bašić, *Direct and indirect mechanism (s) of antitumour activity of propolis and its polyphenolic compounds*. Planta Med, 2006. **72**(1): p. 20-27.
64. Gekker, G., et al., *Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures*. Journal of Ethnopharmacology, 2005. **102**(2): p. 158-163.
65. Kimoto, T., H. Chaen, and M. Kurimoto, *Apoptosis-controlling agent*. 1998, Google Patents.
66. Hayashi, K., et al., *Isolation of antioxidative compounds from Brazilian propolis: 3, 4-dihydroxy-5-prenylcinnamic acid, a novel potent antioxidant*. Chem. Pharm. Bull, 1999. **47**(11): p. 1521-1524.
67. Nakanishi, I., et al., *Efficient radical scavenging ability of artepillin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2003. **1**(9): p. 1452-1454.

68. Matsuda, A.H. and L.B. De Almeida-Muradian, *Validated method for the quantification of artemillin-C in Brazilian propolis*. *Phytochemical Analysis*, 2008. **19**(2): p. 179-183.
69. Silva, B.B., et al., *Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis*. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2008. **5**: p. 313-316.
70. Alencar, S., et al., *Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007. **113**(2): p. 278-283.
71. Teixeira, E.W., et al., *Plant origin of green propolis: Bee behavior, plant anatomy and chemistry*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2005. **2**(1): p. 85-92.
72. Trusheva, B., et al., *Bioactive constituents of Brazilian red propolis*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2006. **3**(2): p. 249-254.
73. Piccinelli, A.L., et al., *Isoflavonoids isolated from Cuban propolis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005. **53**(23): p. 9010-9016.
74. Alencar, S.M., et al., *Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007. **113**(2): p. 278-283.
75. de Castro Ishida, V.F., et al., *A new type of Brazilian propolis: Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria*. *Food Chemistry*, 2010.
76. Castro, M.L., et al., *Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica*. *Química Nova*, 2007. **30**(7): p. 1512.
77. Li, F., et al., *Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2008. **16**(10): p. 5434-5440.
78. Cabral, I.S.R., et al., *Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira*. *Quim Nova*, 2009. **32**: p. 1523-1527.
79. Nunes, L.C.C., et al., *Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina**. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 2009. **19**(2B): p. 524-529.

80. Lee, Y.N., et al., *Isolation and purification of 3, 5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin C) in Brazilian propolis by supercritical fluid extractions*. Separation and Purification Technology, 2007. **54**(1): p. 130-138.
81. Teixeira, E.W., et al., *Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant activity of Brazilian Propolis Samples*. Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM, 2008.
82. Tazawa, S., T. Warashina, and T. Noro, *Studies on the constituents of Brazilian propolis*. II. Chemical and Pharmaceutical Bulletin-Tokyo-, 1999. **47**: p. 1388-1392.
83. Shimizu, K., et al., *Antioxidative bioavailability of artemillin C in Brazilian propolis*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2004. **424**(2): p. 181-188.
84. Chang, R., et al., *Analysis of a Brazilian green propolis from Baccharis dracunculifolia by HPLC-APCI-MS and GC-MS*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2008. **18**(4): p. 549-556.
85. Buriol, L., et al., *Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico*. Quim. Nova, 2009. **32**(2): p. 296-302.
86. Marcucci, M.C., et al., *Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities*. Journal of Ethnopharmacology, 2001. **74**(2): p. 105-112.
87. Martos, I., et al., *Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. **45**(8): p. 2824-2829.
88. Bankova, V., et al., *Chemical composition of European propolis: Expected and unexpected results*. Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences, 2002. **57**(5-6): p. 530-533.
89. Popova, M., et al., *Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition*. Phytomedicine, 2005. **12**(3): p. 221-228.
90. *Farmacopeia Brasileira*. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu. São Paulo, . 1988.
91. Kumazawa, S., T. Hamasaka, and T. Nakayama, *Antioxidant activity of propolis of various geographic origins*. Food Chemistry, 2004. **84**(3): p. 329-339.

92. Hady, A., K. Faten, and A. Hegazi, *Chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of east Nile delta propolis*. *Z Naturforsch*, 2002. **57**: p. 386-394.
93. Hegazi, A.G. and F.K.A. El Hady, *Egyptian propolis: 3. Antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands*. *Zeitschrift fur Naturforschung C*, 2002. **57**(3/4): p. 395-402.
94. Popova, M., et al., *Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis*. *Phytochemical Analysis*, 2004. **15**(4): p. 235-240.
95. Cao, Y., Y. Wang, and Q. Yuan, *Analysis of flavonoids and phenolic acid in propolis by capillary electrophoresis*. *Chromatographia*, 2004. **59**(1): p. 135-140.
96. Custodio, A.R., et al., *Clustering of comb and propolis waxes based on the distribution of aliphatic constituents*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2003. **14**(3): p. 354-357.
97. Bosio, K., et al., *In vitro activity of propolis against Streptococcus pyogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 2000. **31**(2): p. 174-177.
98. Salomao, K., et al., *Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis*. *Letters in Applied Microbiology*, 2004. **38**(2): p. 87-92.
99. Bankova, V., et al., *Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 1992. **607**(1): p. 150-153.
100. Sawaya, A.C.H.F., et al., *Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis*. *Analyst*, 2004. **129**(8): p. 739-744.
101. Ahn, M.R., et al., *Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004. **52**(24): p. 7286-7292.
102. Gil, M.I., et al., *Plant phenolic metabolites and floral origin of rosemary honey*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995. **43**(11): p. 2833-2838.
103. Pietta, P., C. Gardana, and A. Pietta, *Analytical methods for quality control of propolis*. *Fitoterapia*, 2002. **73**: p. S7-S20.
104. Pereira, A.S., et al., *Rapid screening of polar compounds in Brazilian propolis by high-temperature high-resolution gas chromatography-mass spectrometry*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000. **48**(11): p. 5226-5230.

105. Negri, G., M.L.F. Salatino, and A. Salatino, *Unusual chemical composition of a sample of Brazilian propolis, as assessed by analysis of a chloroform extract*. Journal of Apicultural Research, 2003. **42**(4): p. 53-56.
106. Midorikawa, K., et al., *Liquid chromatography–mass spectrometry analysis of propolis*. Phytochemical Analysis, 2001. **12**(6): p. 366-373.
107. Fortaleza-CE, B., *Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico*. Quim. Nova, 2009. **32**(2): p. 296-302.
108. Trusheva, B., D. Trunkova, and V. Bankova, *Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study*. Chemistry Central Journal, 2007. **1**(1): p. 13.
109. Hernandez, I.M., et al., *Studies on the Constituents of Yellow Cuban Propolis: GC-MS Determination of Triterpenoids and Flavonoids*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(8): p. 4725-4730.
110. Kujumgiev, A., et al., *Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin*. Journal of Ethnopharmacology, 1999. **64**(3): p. 235-240.
111. Banskota, A.H., Y. Tezuka, and S. Kadota, *Recent progress in pharmacological research of propolis*. Phytotherapy Research, 2001. **15**(7): p. 561-571.
112. Bonvehi, J.S., F.V. Coll, and R.E. Jorda, *The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics*. Journal of the American Oil Chemists Society, 1994. **71**(5): p. 529-532.
113. Liu, Q., W. Cai, and X. Shao, *Determination of seven polyphenols in water by high performance liquid chromatography combined with preconcentration*. Talanta, 2008. **77**(2): p. 679-683.
114. Tsao, R. and R. Yang, *Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 2003. **1018**(1): p. 29-40.
115. Ignat, I., I. Volf, and V.I. Popa, *A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables*. Food Chemistry, 2010.

116. Woisky, R.G. and A. Salatino, *Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control*. Journal of Apicultural Research, 1998. **37**(2): p. 99-105.
117. Nagy, M. and D. Grancai, *Colorimetric determination of flavanones in propolis*. Pharmazie, 1996. **51**(2): p. 100-101.
118. FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu. v. 2, n. 4, 2002. Suplemento. .
119. FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1998.
120. EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 4 ed. Strasbourg: Council of Europe. 2002.
121. AOAC INTERNATIONAL. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16. ed. Gaithersburg: AOAC International, 1997b. v.2. Cap.26.
122. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials. England: World Health Organization Editor, 1998.
123. Massart, D., et al., *Handbook of chemometrics and qualimetrics, Parts A and B*. 1997, Elsevier, Amsterdam.
124. Ferreira, M.M.C., et al., *Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial*. Quimica Nova, 1999. **22**(5): p. 724-731.
125. Martens, H. and T. Naes, *Multivariate calibration*. 1992: John Wiley & Sons Inc.
126. Zorzetti, B.M. and J.J. Harynyuk, *Using GCx GC-FID profiles to estimate the age of weathered gasoline samples*. Analytical and Bioanalytical Chemistry: p. 1-9.
127. Barker, M. and W. Rayens, *Partial least squares for discrimination*. Journal of chemometrics, 2003. **17**(3): p. 166-173.
128. Kennard, R.W. and L.A. Stone, *Computer aided design of experiments*. Technometrics, 1969: p. 137-148.
129. Markham, K., *Techniques of flavonoid identification*. 1982: Academic Press.
130. Skoog, D.A., F.J. Holler, and T.A. Nieman, *Princípios de análise instrumental*. 5ª ed. ed. 2002, Porto Alegre: Bookman.
131. Bankova, V., et al., *Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis*. Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences, 1996. **51**(5-6): p. 277.
132. Lee, Y.N., et al., *Isolation and purification of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin C) in Brazilian propolis by supercritical fluid extractions*. Separation and Purification Technology, 2007. **54**(1): p. 130-138.

133. Hegazi, A.G. and F.K.A. El Hady, *Egyptian propolis: 3. Antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands*. Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences, 2002. **57**(3-4): p. 395-402.
134. EUROPEAN PHARMAPOEIA. 3<sup>rd</sup> Edition - Supplement 2001. Council of Europe, Strasbourg. 2000.
135. Annual Book of ASTM Standards. Standards practices for infrared multivariate quantitative analysis, E1655-05, ASTM International: West Conshohocken, 2005.
136. Valderrama, P., J.W.B. Braga, and 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*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(21): p. 8331-8338.
137. Silva, M.A.M., et al., *Development and analytical validation of a multivariate calibration method for determination of amoxicillin in suspension formulations by near infrared spectroscopy*. Talanta, 2012. **89**: p. 342-351.
138. Aliboni, A., A. D'Andrea, and P. Massanisso, *Treatment of propolis specimens from Central Italy to yield a product with a lower charge of allergenic species*. Separation and Purification Technology, 2011. **82**: p. 71-75.
139. Pellati, F., et al., *HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011. **55**(5): p. 934-948.
140. Barbarić, M., et al., *Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells*. Journal of Ethnopharmacology, 2011. **135**(3): p. 772-778.
141. Luo, C., et al., *Determination of flavonoids in propolis-rich functional foods by reversed phase high performance liquid chromatography with diode array detection*. Food Chemistry, 2011. **127**(1): p. 314-320.
142. Bononi, M. and F. Tateo, *Liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of chloramphenicol in propolis extracts available on the Italian market*. Journal of Food Composition and Analysis, 2008. **21**(1): p. 84-89.
143. Martens, H. and T. Naes, *Multivariate calibration*. New York: Wiley, 1996.

144. International Conference on Harmonisation (ICH); Validation of analytical procedures: Methodology, Q2B, 1997.
145. Moffat, A.C., et al., *Meeting the International Conference on Harmonisation's Guidelines on Validation of Analytical Procedures: Quantification as exemplified by a near-infrared reflectance assay of paracetamol in intact tablets*. *Analyst*, 2000. **125**(7): p. 1341-1351.
146. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Garantia da Qualidade Analítica: Resíduos e contaminantes em alimentos. Brasília, 2011.
147. Environmental Protection Agency - EPA. Guidance for Methods Development and Methods Validation for the RCRA Program. 1998.
148. Antolovich, M. and K. Robards, *Analytical chemistry of fruit bioflavonoids a review*. *Analyst*, 1997. **122**: p. 11R-34R.
149. Singleton, V. and J.A. Rossi Jr, *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1965. **16**(3): p. 144.
150. Singleton, V. and R. Orthofer, *M. Lamuela-Raventos, 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent*. *Methods Enzymol.* **299**: p. 152-178.
151. Roginsky, V. and E.A. Lissi, *Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food*. *Food Chemistry*, 2005. **92**(2): p. 235-254.
152. Folin, O., *Tyrosine and tryptophan determination in proteins*. 1927: *J. Biol. Chem.* p. 649–673.
153. Everette, J.D., et al., *Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin– Ciocalteu Reagent*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010.
154. Cunha, I., et al., *Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2004. **15**(6): p. 964-970.
155. Crozier, A., I.B. Jaganath, and M.N. Clifford, *Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health*. *Natural product reports*, 2009. **26**(8): p. 1001-1043.
156. Peterson, G.L., *Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall*. *Analytical biochemistry*, 1979. **100**(2): p. 201-220.

157. Box, J., *Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters*. Water Research, 1983. **17**(5): p. 511-525.
158. Gulcin, I., et al., *Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey*. Food and Chemical Toxicology, 2010. **48**(8-9): p. 2227-2238.
159. Moreira, L., et al., *Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal*. Food and Chemical Toxicology, 2008. **46**(11): p. 3482-3485.
160. Negrão Murakami, A.N., et al., *Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) extract through nanofiltration*. LWT-Food Science and Technology, 2011.
161. Hamilton, W.C., *Statistics in physical science. Estimation, hypothesis testing, and least squares*. New York: Ronald Press, 1964, 1964. **1**.
162. EURACHEM/CITAC, *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. EURACHEM/CITAC Guide*. 2000.
163. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). DQO-CGRE-008: Orientação sobre validação de métodos analíticos. 2010.
164. Index to the (Inorganic) Powder Diffraction File. Joint Committee on Powder Diffraction Standards. Philadelphia, 1972.
165. Eurachem/Citac. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 1 ed., 1998.
166. Adelman, J., et al., *Exotic flora dependence of an unusual Brazilian propolis: The pinocembrin biomarker by capillary techniques*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007. **43**(1): p. 174-178.
167. Chang, R., et al., *Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS*. Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy, 2008. **18**(4): p. 549-556.
168. Chikaraishi, Y., et al., *Angiostatic effects of Brazilian green propolis and its chemical constituents*. Molecular Nutrition & Food Research, 2010. **54**(4): p. 566-575.

169. Paulino, N., et al., *Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis*. *European Journal of Pharmacology*, 2008. **587**(1-3): p. 296-301.
170. Salomao, K., et al., *Brazilian propolis: Correlation between chemical composition and antimicrobial activity*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2008. **5**(3): p. 317-324.
171. de Barros, M.P., et al., *Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007. **110**(3): p. 567-571.
172. da Silva, J.F.M., et al., *Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities*. *Food Chemistry*, 2006. **99**(3): p. 431-435.