

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Ariane Araújo Ássimos

**Avaliação da Concentração e dos Tipos de Flavonoides na
Própolis Utilizando Métodos Quimiométricos de Classificação e
Calibração**

Belo Horizonte, MG
2014

ARIANE ARAÚJO ÁSSIMOS

**Avaliação da Concentração e dos Tipos de Flavonoides na
Própolis Utilizando Métodos Quimiométricos de Classificação e
Calibração**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Química do Instituto de Ciências Exatas da
Universidade Federal de Minas Gerais como
requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química - Química Analítica

Belo Horizonte
2014

Ássimos, Ariane Araújo
A848a Avaliação da concentração e dos tipos de
2014 flavonoides na própolis, utilizando métodos
D quimiométricos de classificação e calibração
[manuscrito] / Ariane Araújo Ássimos. 2014.
[x], 100 f. : il.

Orientador: Paulo Jorge Sanches Barbeira.

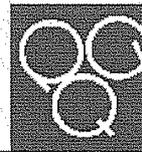
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais. Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses 2. Própole - Teses 3.
Flavonoides - Teses 4. Ácido fenólico - Teses 5. Análise
multivariada - Teses I. Barbeira, Paulo Jorge Sanches,
Orientador II. Título.

CDU 043

UFMG

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3409-5732
FAX: 031 - 3409-5711



E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br

**"Avaliação da Concentração e dos Tipos de Flavonóides na Própolis, Utilizando
Métodos Quimiométricos de Classificação e Calibração"**

Ariane Araújo Ássimos

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Paulo Jorge Sanches Barbeira - Orientador
UFMG

Profa. Isabel Cristina Pereira Fortes
UFMG

Prof. Marcelo Martins de Sena
UFMG

Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2014.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter iluminado meu caminho e me dado forças

Ao meu orientador, Prof. Paulo Barbeira, pela oportunidade de ter desenvolvido esse trabalho sobre sua orientação, pelos ensinamentos e apoio.

Agradeço aos meus pais, por me ajudarem a suportar os desafios, pelo carinho e amor, e por sempre acreditarem na minha capacidade. Obrigada pela educação que me deram, por terem transmitido os mais valiosos saberes e compartilhado comigo cada vitória.

Ao meu namorado, Leo, pela paciência e amor, pelos conselhos valiosos e por ter estado ao meu lado em todos os momentos. A sua presença foi essencial para que eu tivesse forças para chegar até aqui.

À minha irmã, Tassiane, à minha vó Billa, e à tia Dri e tia Graça, pelos momentos de alegria, por sempre terem me incentivado e por entenderem os momentos de ausência.

Agradeço a também a todos do laboratório LIMA, Rosilene, Meliza e Danniell pelas conversas e companheirismo. Agradeço também a Silvinha, “quase membro” do laboratório LIMA, por ter me proporcionado tantos momentos divertidos.

À Cristina Bernardes, pela amizade, pelos inúmeros conselhos, pelos momentos de desabafo e por ter me ensinado tanto durante esses anos. Em vários momentos difíceis as suas palavras foram essenciais para que eu conseguisse seguir em frente. Não teria chegado até aqui sem sua ajuda!

Às estagiárias Tatiane e Thália, pelo auxílio com a parte experimental.

À Mirra, por toda a ajuda e disposição nos estudos cromatográficos.

À CAPES pelo apoio financeiro

Muito Obrigada a todos!!!!

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidos métodos analíticos para avaliar a qualidade dos extratos alcoólicos comerciais de própolis, baseados em métodos quimiométricos como a calibração multivariada por mínimos quadrados parciais e a análise discriminante por mínimos quadrados parciais. Inicialmente, foram otimizadas as condições experimentais da metodologia colorimétrica utilizada para a determinação da concentração de flavonoides na própolis, que é um dos parâmetros de qualidade regulamentado pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), para que pudesse ser aplicada aos extratos comerciais de própolis. Foram avaliados o volume de amostra utilizado nas análises, a concentração de nitrato de alumínio e de acetato de lítio e o tipo de solvente. Espectros UV-Vis das amostras diluídas foram utilizados para a construção de um modelo PLS para a determinação da concentração de flavonoides nas amostras de própolis. A metodologia quimiométrica proposta mostrou-se eficiente além de ser muito menos demorada, trabalhosa, e utilizar uma quantidade de reagente bem menor do que a metodologia colorimétrica tradicional. Na segunda parte os espectros UV-Vis obtidos anteriormente foram utilizados para a construção de um modelo PLS-DA para classificar as amostras de acordo com o tipo de composto fenólico presente. O modelo construído foi capaz de discriminar as amostras de extratos comerciais de própolis em quatro classes quanto ao tipo e concentração dos compostos fenólicos presentes e mostrou ser de grande utilidade por prever quais amostras eram irregulares quanto à concentração de flavonoides. Análises cromatográficas foram feitas com amostras representativas das classes observadas no modelo PLS-DA e foi possível perceber que as principais substâncias responsáveis pela separação nas quatro classes foram o flavonoide pinocembrina, e os ácidos fenólicos artepillin C, ácido p-cumárico e ácido ferúlico.

Palavras chaves: própolis, flavonoides, compostos fenólicos, quimiometria.

ABSTRACT

In this work, analytical methods were developed to assess the quality of commercial alcoholic extracts of propolis, based on chemometric methods such as Partial Least Squares Multivariate Calibration (PLS) and Partial Least Squares Discriminating Analysis (PLS-DA). Initially, the experimental conditions of the spectrophotometric method used for determining the concentration of flavonoids in propolis, which is a quality parameter regulated by MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) were optimized, so it could be applied to commercial extracts of propolis. The volume of sample used in the analysis, the concentration of aluminum nitrate and lithium acetate, and the type of solvent were evaluated. The UV-Vis spectra of the diluted samples were used for the construction of a PLS model for determining the concentration of flavonoids in the samples of propolis. The chemometric methodology proposed has shown to be very efficient in addition of be less time-consuming, laborious, and using a much smaller amount of reagent than the traditional spectrophotometric method. In the second part the UV-Vis spectra obtained previously were used for the construction of a PLS-DA model to classify the samples according to the type of phenolic compound. The constructed model was able to discriminate samples of commercial extracts of propolis in four classes according to the type and concentration of phenolic compounds and proved to be very useful for predicting which samples were irregular in concentration of flavonoids. Chromatographic analyzes were performed on representative samples of the classes observed in the PLS-DA, and it was revealed that the main substances responsible for the separation in the four classes were the flavonoid pinocembrine and the phenolic acids artepillinC, p-coumaric acid and ferulic acid.

Keywords: propolis, flavonoids, phenolic compounds, chemometrics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Apis mellifera</i>	1
Figura 2: Produção científica sobre própolis (<i>Chemical Abstracts</i>). (a) Em relação à década de publicação (b) Em relação ao tipo de publicação.....	2
Figura 3: <i>Baccharis dracunculifolia</i> , conhecida como alecrim-do-campo, fonte da própolis verde.....	4
Figura 4: Estrutura química do artepillin C.	4
Figura 5: <i>Dalbergia ecastophyllum</i> , conhecida como rabo de bugio, fonte da própolis vermelha.	5
Figura 6: Estrutura básica dos flavonoides	9
Figura 7: Flavonoides encontrados na própolis.....	10
Figura 8: Espectro típico de um extrato alcoólico de própolis.....	11
Figura 9 : Esqueleto de uma flavona (a) ; Esqueleto de um flavonol (b).....	13
Figura 10 : Esqueleto de uma isoflavona (a); Esqueleto de uma flavanona (b); Esqueleto de uma flavanonol (c)	13
Figura 11: Espectros UV-Vis típico das classes de flavonoides. a) flavona (acacetina); b) flavonol (quercetina); c) flavanonol (taxifolina); d) isoflavona (iridina); e) flavanona (pinocembrina).....	14
Figura 12: Dados organizados em uma matriz X	16
Figura 13: Distribuição de variáveis em torno do eixo cartesiano. a) dados originais b) dados centrado na média.	17
Figura 14: Decomposição dos blocos de dados X e y	19
Figura 15: Reação de formação do complexo entre os flavonoides e Al(III)	28
Figura 16: Soluções obtidas da complexação do Al(III) com os flavonoides presentes nas amostras de própolis	32
Figura 17: Esquema da metodologia utilizada para avaliar qual volume de amostra deveria ser usado.....	36
Figura 18: Dependência da absorbância do complexo alumínio-quercetina em diferentes pH e em diferentes níveis de força iônica.....	37
Figura 19: Esquema da metodologia utilizada para avaliar qual a melhor concentração de acetato de lítio.....	38

Figura 20: Espectro obtidos para a avaliação da concentração de acetato de lítio para uma amostra de própolis	38
Figura 21: Espectros obtidos para a avaliação da concentração de acetato de lítio para o padrão quercetina	39
Figura 22: Esquema da metodologia utilizada para avaliar qual a melhor concentração de nitrato de alumínio	40
Figura 23: Espectro obtidos para a avaliação da concentração de nitrato de alumínio para uma amostra de própolis e o padrão (quercetina)	40
Figura 24: Cromatograma de uma amostra extrato alcoólico de própolis obtido por outros autores: (a) – [78] (b) – [79] (c) – [60] (d) – [59] ; cromatograma obtido nesse trabalho: (e) . 1) ácido caféico 2) ácido p-cumárico 3) ácido ferúlico 4) ácido cinâmico 5) quercetina 6) naringenina 7) kaempferol 8) pinocembrina 9) crisina 10) acacetina 11) galangina 12) artepillin C.	46
Figura 25: Curva analítica obtida utilizando como padrão a quercetina	47
Figura 26: Espectro dos complexos formados entre os flavonoides presentes nas amostras de própolis e o alumínio, de acordo com a concentração de flavonoides.	49
Figura 27: Histograma com as concentrações de flavonoides para as amostras de extrato de própolis	50
Figura 28: Relação entre os parâmetros teor de extrato seco e concentração de flavonoides. (Os valores mínimos estipulados pelo MAPA encontram-se marcados com linha tracejada). .	51
Figura 29: Cromatograma de uma amostra extrato alcoólico de própolis. 1) ácido caféico 2) ácido p-cumárico 3) ácido ferúlico 4) ácido cinâmico 5) quercetina 6) naringenina 7) kaempferol 8) pinocembrina 9) crisina 10) acacetina 11) galangina 12) artepillin C.	52
Figura 30: Espectros de absorção na região UV-Vis das amostras diluídas em etanol 95% utilizadas na construção do modelo	57
Figura 31: Coeficientes de regressão do modelo PLS	59
Figura 32: Gráfico de resíduos versus concentração de flavonoides determinado pelo método de referência. (●) Amostras de calibração; (▼) Amostras de validação.	60
Figura 33: Valores da concentração de flavonoides prevista em função da concentração de flavonoides medida. (●) Amostras de calibração; (▼) Amostras de validação.	61
Figura 34: Espectros das amostras de extrato de própolis na presença de Al(III)	67
Figura 35: Escores do modelo PCA. (a) CP1 vs CP2 (b) CP1 vs CP3	68
Figura 36: Espectros das amostras separados de acordo com as classes observadas no PCA	69

Figura 37: Gráfico dos pesos em CP1, CP2 e CP3 para o modelo PCA.	70
Figura 38: Amostras classificadas pelo modelo PLS-DA. Os símbolos cheios correspondem às amostras de validação, os símbolos vazios às de calibração. (a) Classe 1 (b) Classe 2 (c) Classe 3 (d) Classe 4.....	72
Figura 39: Coeficientes de regressão para o modelo PLS-DA.....	73
Figura 40: Cromatograma de amostras representativas das classes observadas no PLS-DA. 1) ácido caféico 2) ácido p-cumárico 3) ácido ferúlico 4) ácido cinâmico 5) quercetina 6) naringenina 7) kaempferol 8) pinocembrina 9) crisina 10) acacetina 11) galangina 12) artepillin C.....	74

LISTA DE TABELAS

TABELA I: Classificação da Própolis Brasileira de acordo com características físico-químicas e origem geográfica.....	3
TABELA II: Requisitos físico-químicos exigidos pelo MAPA para a comercialização da própolis bruta e dos extratos hidroalcoólicos	6
TABELA III: Principais ácidos fenólicos derivados do ácido benzoico	7
TABELA IV: Principais ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico	8
TABELA V: Alguns compostos fenólicos e suas bandas de absorção no ultravioleta	12
TABELA VI: Condições Cromatográficas de estudos que utilizaram HPLC para a quantificação dos flavonoides	25
Tabela VII: Resumo de alguns trabalhos que utilizaram CG para a quantificação dos flavonoides	27
TABELA VIII: Resumos de alguns trabalhos que utilizaram a espectrofotometria para a quantificação dos flavonoides.	30
TABELA IX: Amostras selecionadas para avaliação do volume a ser utilizado nos ensaios..	36
TABELA X: Programação do gradiente para a separação do ácido caféico, ácido p-cumárico e ácido ferúlico	42
TABELA XI: Programa de gradiente para a separação do ácido trans-cinâmico, quercetina, naringenina, kaempferol e pinocembrina	43
TABELA XII: Gradiente de eluição utilizado para a separação dos flavonoides, crisina, acacetina e galangina	44
TABELA XIII: Programação do gradiente final	44
TABELA XIV Deslocamentos batocrômicos observados e absorção máxima das soluções dos flavonoides na adição de Al(III).....	48
TABELA XV: Estrutura e tempo de retenção (t_r) dos compostos avaliados na cromatografia	53
TABELA XVI: Parâmetros obtidos das curvas de calibração por HPLC	54
TABELA XVII: Concentração de flavonoides nas amostras pelo método cromatográfico e espectrofotométrico.....	55
TABELA XVIII: Principais figuras de mérito para o modelo PLS.....	62
TABELA XIX: Porcentagens de variância explicada pelo modelo PLS-DA.....	70
TABELA XX: Sensibilidade e Especificidade do modelo PLS-DA.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

CAS: do inglês, “Chemical Abstracts Service”.

CV: do inglês, “Cross Validation”.

DAD: do inglês, “Diode Array Detector”.

DNP: 2,4- dinitrofenilhidrazina.

DPR: Desvio Padrão Relativo.

Er: Erro Relativo.

ESI-MS: do inglês, “Electrospray Ionization Mass Spectrometry”.

GC: do inglês, “Gas Chromatography”.

GC-MS: do inglês, “Gas Chromatograph – Mass Spectrometry”.

HCA: do inglês, “Hierarchical Cluster Analysis”.

HPLC: do inglês, “High Performance Liquid Chromatography”.

HPLC-RP: do inglês, “High Performance Liquid Chromatograph – Reverse Phase”.

HRGC: do inglês, “High-Temperature High-Resolution Gas Chromatograph”.

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

PAD: do inglês, “Photodiode Array Detector”.

PCA: do inglês, “Principal Component Analysis”.

PLS: do inglês, “Partial Least Squares”.

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

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”.

UV-Vis: Ultravioleta-visível.

VL: Variável Latente

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	1
1.1	Própolis.....	1
1.2	Composição Química.....	5
1.3	Compostos fenólicos.....	7
1.3.1	Ácidos Fenólicos.....	7
1.3.2	Flavonoides.....	8
1.3.3	Própolis e Espectroscopia Eletrônica.....	10
1.4	Quimiometria.....	15
1.4.1	A Organização dos Dados.....	15
1.4.2	Pré-processamento dos Dados.....	16
1.4.3	Reconhecimento de Padrões.....	17
1.4.4	Calibração Multivariada.....	18
1.4.5	Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais – PLS-DA.....	21
2.	Objetivos.....	22
3.	Desenvolvimento de um método de calibração multivariada para Quantificação de flavonoides nos extratos comerciais de própolis.....	23
3.1	Métodos Analíticos para a Determinação de Flavonoides na Própolis.....	23
3.2	Materiais e Métodos.....	31
3.2.1	Amostras.....	31
3.2.2	Reagentes.....	31
3.2.3	Metodologia: método espectrofotométrico.....	31
3.2.4	Metodologia: método cromatográfico.....	33
3.2.5	Tratamento Estatístico dos Resultados.....	33
3.2.6	Análise Quimiométrica.....	34
3.3	Resultados e Discussão.....	35
3.3.1	Método espectrofotométrico – ajuste das condições experimentais.....	35

3.3.2 Metodologia cromatográfica – ajuste das condições experimentais	41
3.3.3 Determinação da concentração de flavonóides nos extratos comerciais de própolis pelo método espectrofotométrico	47
3.3.4 Determinação da concentração de flavonoides nos extratos comerciais de própolis pelo método cromatográfico	52
3.3.5 Construção do modelo de calibração multivariada	56
3.4 Conclusão	62
4. Utilização dos complexos de Alumínio e PLS-DA para a discriminação de extratos comerciais de própolis	64
4.1 Materiais e Métodos.....	64
4.1.1 Amostras.....	64
4.1.2 Reagentes.....	65
4.1.3 Metodologia espectrofotométrica	65
4.1.4 Metodologia cromatográfica.....	65
4.1.5 Análise Quimiométrica.....	66
4.2 Resultados e Discussão	66
4.2.1 Construção do modelo PLS-DA	66
4.2.2 Conclusão	76
5. Considerações Finais	77
6. Referências Bibliográficas	79

1. INTRODUÇÃO

1.1 Própolis

A própolis (CAS No. 9009-62-5) é uma resina de coloração e resistência variada produzida pelas abelhas através da mistura de substâncias coletadas de diversas partes das plantas (brotos, botões florais e exsudatos resinosos) com secreções produzidas por seu organismo, cera e pólen para a obtenção do produto final. São conhecidas atualmente mais de 20 mil espécies de abelhas sendo que as da espécie *Apis mellifera* (Figura 1) são as mais conhecidas e difundidas entre os apicultores para a produção de própolis e mel. [1-5]



Figura 1: *Apis mellifera*

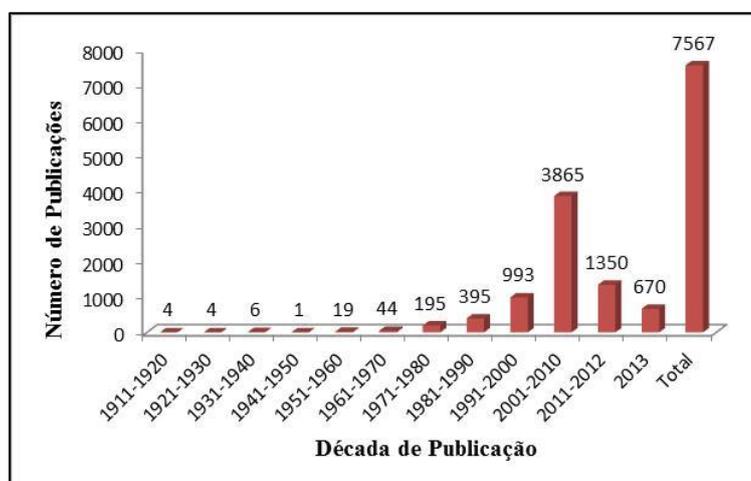
FONTE: www.ciencias.ies-bezmiliana.org (Acessado em 11/12/13)

O termo própolis deriva do grego: *pro* – em defesa de, e *polis* – cidade. A própolis é utilizada pelas abelhas para fechar frestas da colmeia, embalsamar insetos mortos e manter o ambiente asséptico. [3, 6-8]

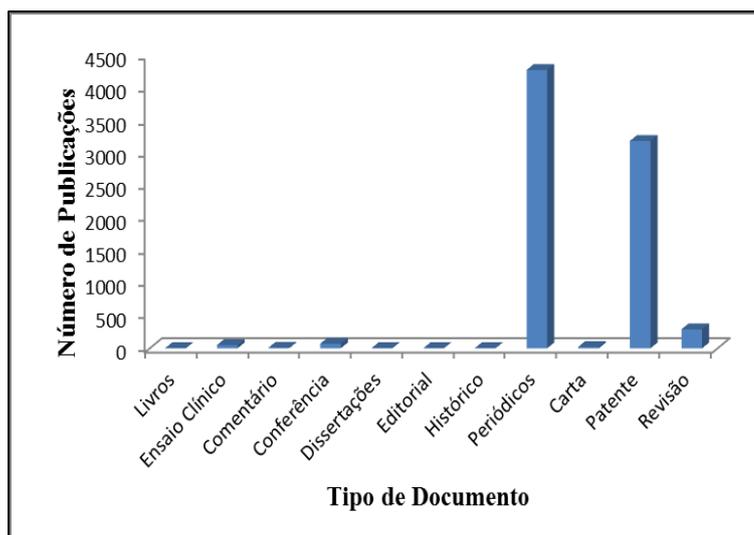
O uso da própolis na medicina popular remonta a pelo menos 300 a.C.. No Egito antigo a própolis era utilizada no embalsamento dos mortos. Também há registros da utilização da própolis pelos gregos e romanos. Suas propriedades medicinais foram reconhecidas por Aristóteles, Dioscórides, Plínio e Galeno. As propriedades biológicas da própolis também foram reconhecidas por outras civilizações, como os Incas que a empregavam como antipirético. [2, 4, 6, 9;10]

A popularização do uso da própolis se deve as diversas propriedades biológicas que são atribuídas a ela, como efeito hepatoprotetor, atividade antitumoral, atividade antioxidante, atividade microbiana, atividade anti-inflamatória, efeito contra a replicação do vírus HIV-1, atividade antifúngica, imunomodulatória, entre outras. [6;7, 11-14]

O primeiro trabalho indexado no *Chemical Abstract* sobre própolis foi publicado em 1903 e a primeira patente foi escrita em 1904 (*USA-Composition for treating pins and piano strings*) [15]. A Figura 2 mostra o número de publicações sobre própolis ao longo das décadas e os tipos de documentos publicados. O interesse global a respeito da pesquisa sobre própolis se deve a diversidade das propriedades biológicas e ao alto valor agregado. [2, 7, 9]



(a)



(b)

Figura 2: Produção científica sobre própolis (*Chemical Abstracts*). (a) Em relação à década de publicação (b) Em relação ao tipo de publicação.

Em relação à produção de própolis, segundo Toreti et. al. [2] o Brasil exportou em 2012 cerca de 40 toneladas de própolis, correspondendo a cerca de cinco milhões de dólares. O mercado asiático é o principal destino dessas exportações, sendo que 92% de toda a própolis *in natura* consumida no Japão é de origem brasileira e o frasco do extrato alcoólico da substância é vendido a US\$ 110. Em torno de 70% da produção de própolis do Brasil vem de Minas Gerais, onde foram produzidas em 2012 cerca de 30 toneladas de própolis. É importante ressaltar que o preço da própolis varia de acordo com o tipo, pois o valor do produto está relacionado com sua composição química e atividades biológicas, que variam em função de sua origem botânica. [2, 16]

Recentemente, as própolis brasileiras foram classificadas em 13 tipos de acordo com a composição química e atividades biológicas (Tabela I). Cinco tipos são provenientes da região sul, um proveniente do sudeste e centro-oeste, e sete do nordeste. Os tipos que apresentaram melhor atividade antimicrobiana foram G3, G6 e G12. [2, 17]

TABELA I: Classificação da Própolis Brasileira de acordo com características físico-químicas e origem geográfica

Tipo	Cor	Origem da Própolis
G1 (RS5)	Amarelo	Sul
G2 (RS1)	Marrom	Sul
G3 (PR7)	Marrom Escuro	Sul
G4 (PR8)	Marrom	Sul
G5 (PR9)	Marrom Esverdeado	Sul
G6 (BA11)	Marrom Avermelhado	Nordeste
G7 (BA51)	Marrom Esverdeado	Nordeste
G8 (PE5)	Marrom Escuro	Nordeste
G9 (PE3)	Amarelo	Nordeste
G10 (CE3)	Amarelo Escuro	Nordeste
G11 (PI11)	Amarelo	Nordeste
G12 (SP12)	Verde ou Marrom Esverdeado	Sudeste
G13 (AL)	Vermelha	Nordeste

Fonte: Adaptado de Toreti et. al. , 2013. [2]

A própolis da região sudeste do Brasil é uma das mais bem cotadas no mercado internacional por se tratar da própolis verde, cuja origem botânica é a planta *Baccharis dracunculifolia* (Figura 3), conhecida popularmente como alecrim-do-campo. Os principais componentes da própolis verde são os fenil propanóides prenilados, que são ácidos fenólicos contendo um grupo prenila. Essas substâncias são formadas a partir do ácido cinâmico e seus derivados, como o artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) (Figura 4), marcador químico da própolis verde, sendo a substância majoritária. A cotação média da própolis verde de Minas Gerais no exterior é da ordem de US\$ 120 o quilo. [14, 18-21]



Figura 3: *Baccharis dracunculifolia*, conhecida como alecrim-do-campo, fonte da própolis verde
FONTE: revistaplaneta.terra.com.br; www.reidaverdade.net; www.panoramio.com (Acessado em 02/01/14)

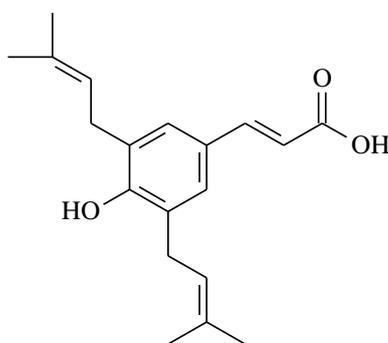


Figura 4: Estrutura química do artepillin C.

O 13º tipo de própolis foi o mais recentemente classificado. Essa própolis é originária da região de mangue do estado do Alagoas, e sua origem botânica é a leguminosa *Dalbergia ecastophyllum* (Figura 5), conhecida popularmente como rabo de bugio devido à sua coloração vermelha intensa. A própolis vermelha vem demonstrando várias atividades biológicas e pode valer cinco vezes mais que a própolis verde. O produto chega a custar R\$ 500 o quilo no mercado externo. [15, 22-23]



Figura 5: *Dalbergia ecastophyllum*, conhecida como rabo de bugio, fonte da própolis vermelha.

FONTE: meliponariojandaira.blogspot.com; www.agricultura.al.gov.br; www.portaldenoticias.net

(Acessado em 02/01/14)

1.2 Composição Química

A composição química da própolis é muito complexa e depende da biodiversidade da flora regional, mas de forma geral ela é constituída de aproximadamente 30% de ceras, 50% de resinas vegetais, 10% de óleos voláteis, 5% de pólen e 5% de outras substâncias, incluindo compostos orgânicos e microelementos. [2, 24-25]

Mais de 300 constituintes já foram descritos em própolis de diferentes origens. Alguns componentes estão presentes em todas as amostras de própolis, enquanto outros só são encontrados em própolis derivadas de espécies específicas de plantas. Entre os constituintes da própolis temos os flavonoides (como a galangina, quercetina, pinocembrina e kaempferol), fenóis, ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos e cetonas, terpenóides e fenil propanóides (como

os ácidos caféico e clorogênico), esteroides, aminoácidos, polissacarídeos, ácidos graxos e outros componentes em pequenas quantidades. [2, 7, 17, 26]

Dentre todos esses compostos químicos destacam-se os compostos fenólicos, que são os ácidos fenólicos e flavonoides, pois a eles são atribuídas as diversas atividades biológicas presentes na própolis. Na Europa, América do Norte e oeste da Ásia, a fonte botânica predominante para a produção da própolis é o exsudato do botão de álamo (*Populus* sp.) Estudos mostram que a própolis de locais com clima temperado possuem composição química similar, sendo que os principais compostos bioativos são os flavonoides. Já as própolis originárias de locais com clima tropical e subtropical possuem composição química muito mais complexa, sendo que os principais compostos bioativos são os ácidos fenólicos, o que confere propriedades biológicas diferenciadas. [6-7, 17, 27-29]

No Brasil a própolis é comercializada principalmente sobre a forma de extratos alcoólicos e aquosos, e podem ser encontrados extratos da própolis verde e vermelha e outros sem denominação. Os produtos apícolas são registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e apresentam legislações específicas. Para assegurar a qualidade da própolis, tanto na forma bruta quanto na forma de extrato, utilizam-se as normas do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Própolis. Na Tabela II podem ser verificados alguns requisitos físico-químicos exigidos pelo MAPA. [30]

TABELA II: Requisitos físico-químicos exigidos pelo MAPA para a comercialização da própolis bruta e dos extratos hidroalcoólicos

Parâmetros	Própolis Bruta	Extrato Hidroalcoólico
Perda por dessecação	Máximo de 8% (m/m)	-
Cinzas	Máximo de 5% (m/m)	-
Cera	-	1% do extrato seco
Compostos fenólicos	Mínimo de 5% (m/m)	Mínimo de 0,50% (m/m)
Flavonoides	Mínimo de 0,50 (m/m)	Mínimo de 0,25% (m/m)
Atividade de Oxidação	Máximo de 22 segundos	Máximo de 22 segundos
Massa Mecânica	Máximo de 40% (m/m)	-
Solúveis em Etanol	Mínimo de 35% (m/m)	-
Extrato Seco	-	11% (m/v)
Teor alcoólico	-	Máximo de 70 ° GL (v/v)
Metanol	-	Máximo 0,40 mg/L

Entre os parâmetros preconizados pelo MAPA para os extratos alcoólicos está a concentração de flavonoides, cujo mínimo exigido é de 0,25% (m/m). Por estar diretamente ligada à atividade biológica da própolis, a determinação da concentração dos flavonoides é muito importante e agrega valor econômico ao produto.

1.3 Compostos fenólicos

1.3.1 Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos pertencem ao grupo dos compostos fenólicos e são caracterizados por possuírem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxilas e/ou metoxila na molécula. Eles são divididos formalmente em derivados do ácido benzoico (Tabela III), como ácido gálico, e derivados do ácido cinâmico (Tabela IV), como o ácido *p*-cumárico. Os ácidos fenólicos possuem atividade antioxidante que é geralmente determinada pelo número de hidroxilas presentes na molécula e também com a proximidade do grupo $-CO_2H$ com o grupo fenil. Quanto mais próximo este grupo estiver do grupo fenil, maior será a capacidade antioxidante do grupo hidroxila na posição meta. [31;32]

TABELA III: Principais ácidos fenólicos derivados do ácido benzoico

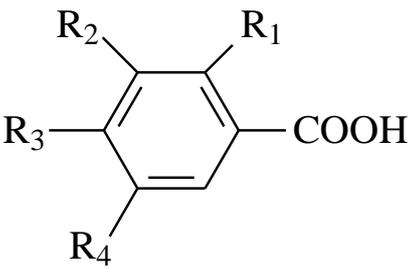
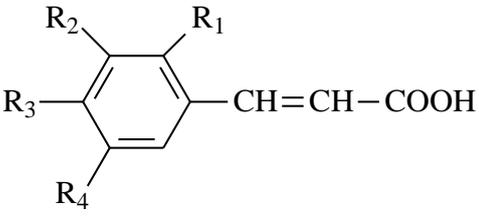
Derivados do Ácido Benzoico	Substituintes
	$R_1 = OH$ (Ácido Salicílico)
	$R_1 = R_4 = OH$ (Ácido Gentísico)
	$R_3 = OH$ (Ácido <i>p</i> - hidroxibenzoico)
	$R_2 = R_3 = OH$ (Ácido Protocatequínico)
	$R_2 = OCH_3$; $R_3 = OH$ (Ácido Vanílico)
	$R_2 = R_3 = R_4 = OH$ (Ácido Gálico)
	$R_2 = R_4 = OCH_3$; $R_3 = OH$ (Ácido Siríngico)

TABELA IV: Principais ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico

Derivados do Ácido Cinâmico	Substituintes
	$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$ (Ácido cinâmico)
	$R_1 = OH$ (Ácido o- cumárico)
	$R_2 = OH$ (Ácido m- cumárico)
	$R_3 = OH$ (Ácido p- cumárico)
	$R_2 = R_3 = OH$ (Ácido Caféico)
	$R_2 = OCH_3; R_3 = OH$ (Ácido Ferúlico)
	$R_2 = R_4 = OCH_3; R_3 = OH$ (Ácido Sinápico)

Os principais ácidos fenólicos presentes na própolis são ácido gálico, vanílico, ferúlico, p-cumárico, caféico e siríngico. [10, 31]

1.3.2 Flavonoides

O húngaro Albert Szent-Györgi, descobriu os flavonoides em 1936. Baseado em evidências de seus experimentos ele levantou a hipótese de ter descoberto uma nova vitamina. Apesar de sua suposição de que os flavonoides eram vitaminas estar errada, a pesquisa a respeito dessas substâncias, e seu potencial benéfico, continuou e cresceu intensamente nos anos que se passaram. [33]

A palavra flavonoide tem origem no latim *flavus*, que significa amarelo. No início o conceito de flavonoide somente incluía grupos de compostos que apresentavam a cor amarela. Hoje, este termo inclui também compostos menos coloridos e incolores, bem como as antocianinas que apresentam coloração vermelha ou azul. Esses compostos constituem uma grande classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana, mas são encontrados em vegetais, legumes, frutas, chás de ervas, mel, própolis, entre outros produtos de consumo cotidiano. [31, 33]

Os flavonoides absorvem radiação eletromagnética na faixa do ultravioleta (UV) e do visível e assim apresentam um papel de defesa das plantas perante a radiação UV da luz solar. Eles também representam uma barreira química de defesa contra microrganismos (bactérias,

fungos e vírus), insetos e outros animais herbívoros. Além disso, os flavonoides atuam também em relacionamentos harmônicos entre plantas e insetos, sendo que uma das funções dessas substâncias é conferir coloração às flores atraindo polinizadores. [31, 34;35]

Estruturalmente, os flavonoides são substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono (C_{15}), dispostos em uma configuração C6-C3-C6, como pode ser visto na Figura 6. [33, 36]

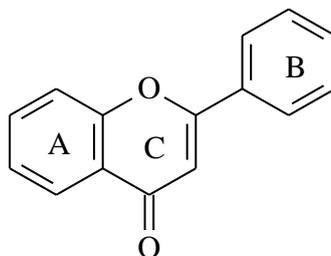


Figura 6: Estrutura básica dos flavonoides

Múltiplos grupos hidroxila, glicosil, oxigênios ou grupos metil podem estar ligados à estrutura básica do flavonoide. Dependendo do estado de oxidação do anel heterocíclico, os flavonoides podem ser separados em diversas classes, tais como: flavonas, flavonóis, flavanonóis e flavanonas, antocianidinas, isoflavonoides, auronas, neoflavonoides, biflavonoides, catequinas e seus precursores metabólicos conhecidos como chalconas, e podem ocorrer como agliconas, glicossilados e como derivados metilados. Já foram identificadas mais de 4000 substâncias pertencentes ao grupo dos flavonoides. [10, 33, 37]

A Figura 7 mostra estruturas de flavonoides comumente encontrados na própolis: a quercetina, miricetina e a galangina são flavonóis; a apigenina, a crisina e o canferol são exemplos de flavonas e a pinocembrina e a naringenina são flavanonas. [10, 33, 35;36, 38]

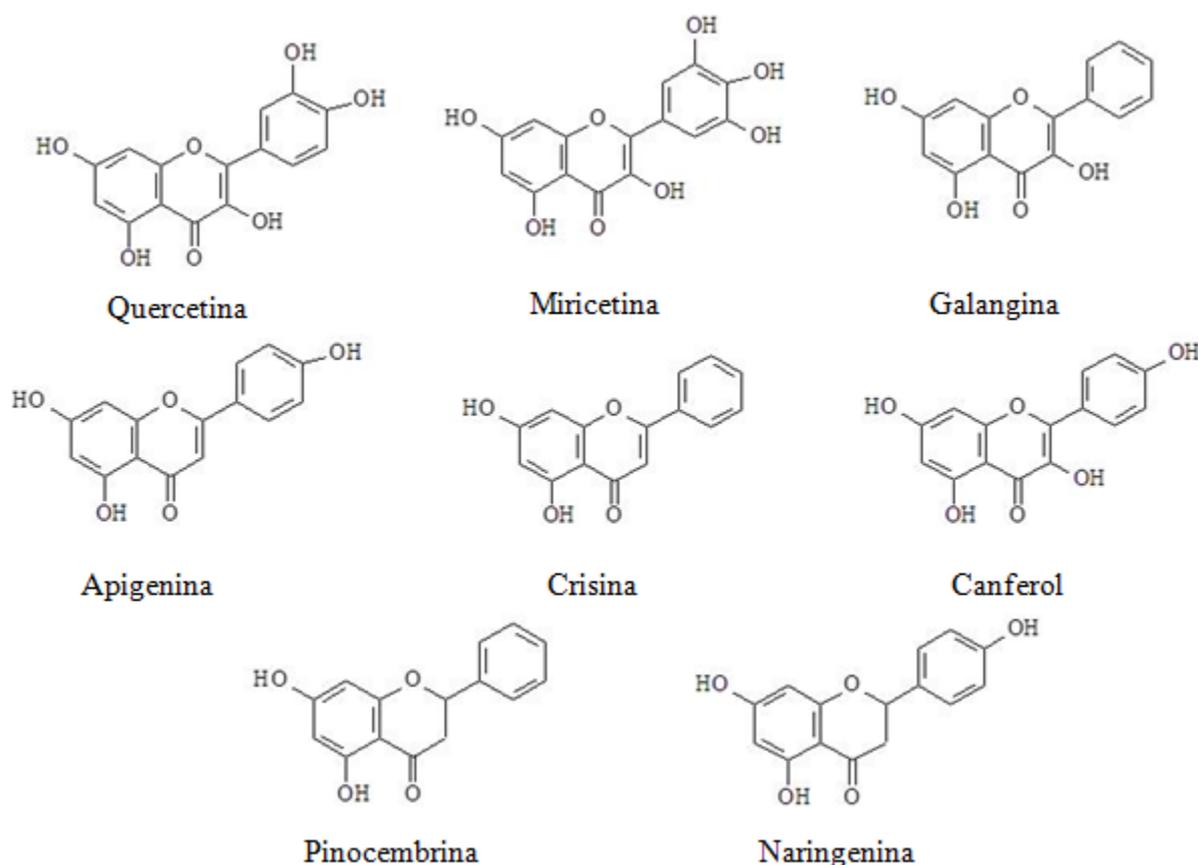


Figura 7: Flavonoides encontrados na própolis

Vários estudos conduzidos nos últimos anos relatam o importante papel dos flavonoides na saúde humana. Propriedades como atividade antioxidante, antifúngica, antiprotozoários, antivirais, anti-inflamatória, antimicrobiana, anticancerígena, entre outras, têm sido relatadas na literatura. [33;34]

1.3.3 Própolis e Espectroscopia Eletrônica

Os flavonoides e ácidos fenólicos presentes na própolis apresentam absorção na região do ultravioleta-visível devidos à presença do cromóforo do benzeno. As transições que resultam em absorção de radiação eletromagnética nessa região do espectro ocorrem entre níveis de energia eletrônicos, sendo o cromóforo do benzeno do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. [39;40]

O espectro eletrônico dos extratos de própolis também é um dos parâmetros regulamentados pelo MAPA, que estabelece que o espectro de absorção de radiações no UV-Vis deve apresentar bandas características das principais classes de flavonoides entre 200 e 400 nm (Figura 8). [30]

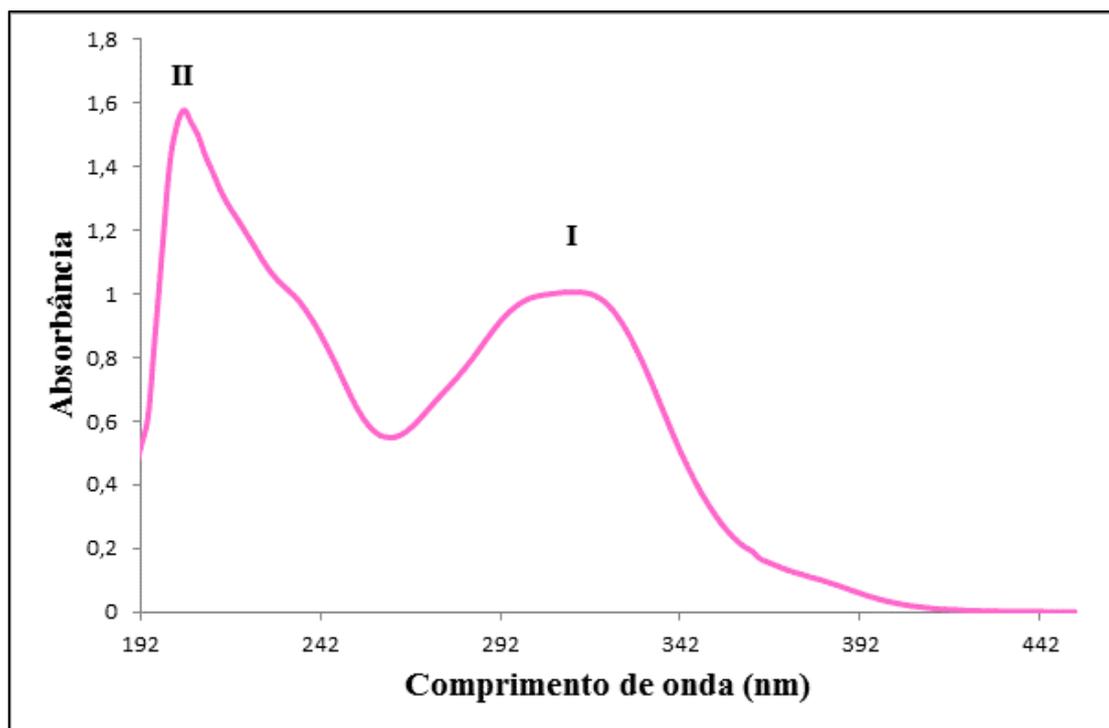


Figura 8: Espectro típico de um extrato alcoólico de própolis

O espectro ultravioleta do extrato alcoólico de própolis consiste em duas bandas de absorção nas faixas de 280-500 nm (banda I) e entre 190-240 nm (banda II). A posição precisa dessas bandas e as intensidades dos máximos fornecem informações sobre a natureza do composto fenólico e de seu padrão de substituição. Na Tabela V têm-se as bandas de absorção no UV-Vis para alguns compostos fenólicos. [40]

TABELA V: Alguns compostos fenólicos e suas bandas de absorção no ultravioleta

Nome do composto	λ_{II} (nm)	λ_{I} (nm)
Ácido 3,5-diprenil-p-cumárico	310	-
Ácido 4-hidroxi-benzoico	257	-
Ácido caféico	325	-
Ácido gálico	273	-
Ácido p-cumárico	309	-
Ácido salicílico	305	-
Ácido sinápico	325	-
Ácido siríngico	273	-
Ácido vanilínico	261	293
Apígenina	265	337
Canferol	265	365
Crisina	269	313
Flavanona	253	321
Flavona	253	295
Galangina	267	359
Pinocembrina	299	-
Quercetina	253	369
Vanilina	291	309

Fonte: Adaptado de CHANG, 2005. [41]

Os espectros em metanol das flavonas e flavonóis apresentam duas bandas de maior absorção na região de 240-400 nm. Esses dois picos são referidos comumente como banda I (normalmente de 300-380 nm) e banda II (normalmente em 240-280 nm). A banda I está associada com a absorção do anel B, e a banda II com a absorção do anel A (Figura 9). Flavonas e flavonóis oxigenados no anel A, mas não no B, tendem a ter a banda II mais pronunciada que a I. Em moléculas que também possuem o anel B oxigenado, o espectro apresenta a banda I mais pronunciada, a qual aparece em comprimentos de onda não muito distantes. A posição da banda I nos dá informação sobre o tipo de flavonoide e também sobre o grau de oxidação. A banda I das flavonas ocorre na faixa de 304-350 nm, enquanto que a dos flavonóis aparece em 352-385 nm. Entretanto os flavonóis com o grupo 3-hidroxil substituído (metilado ou glicosilado) possuem a banda I em 328-357 nm, e em geral os seus espectros são próximos aos das flavonas.[41]

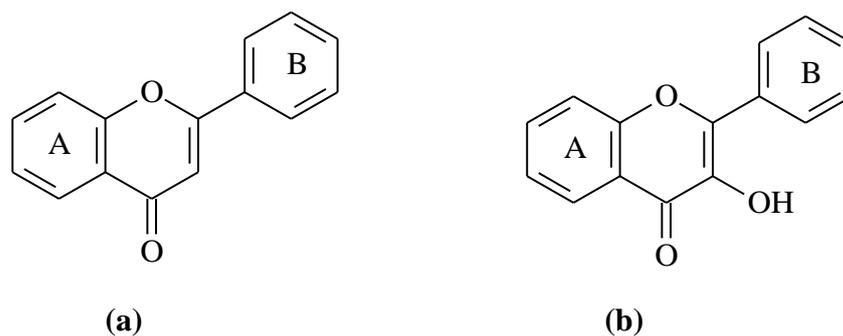


Figura 9 : Esqueleto de uma flavona (a) ; Esqueleto de um flavonol (b)

Já o espectro das flavanonas, isoflavonas e flavanonóis são parecidos por apresentarem pouca ou nenhuma conjugação entre os anéis A e B (Figura 10). Esses espectros apresentam uma banda II de grande intensidade de absorção com somente um ombro ou uma banda com baixa intensidade representando a banda I. A banda II das isoflavonas ocorre normalmente na região de 245-270 nm e não é muito afetada pela hidroxilação do anel B. O espectro das flavanonas e flavanonóis possui a banda II na faixa de 270-295 nm. A remoção do grupo 5-hidroxil de uma flavanona ou flavanonol provoca um deslocamento hipsocrômico de 10-15 nm na banda II. O aumento da oxigenação no anel B de flavanonas e flavanonóis não possui efeitos relatados no espectro UV. Na Figura 11 tem-se o espectro UV-Vis em metanol para as principais classes de flavonoides. [41]

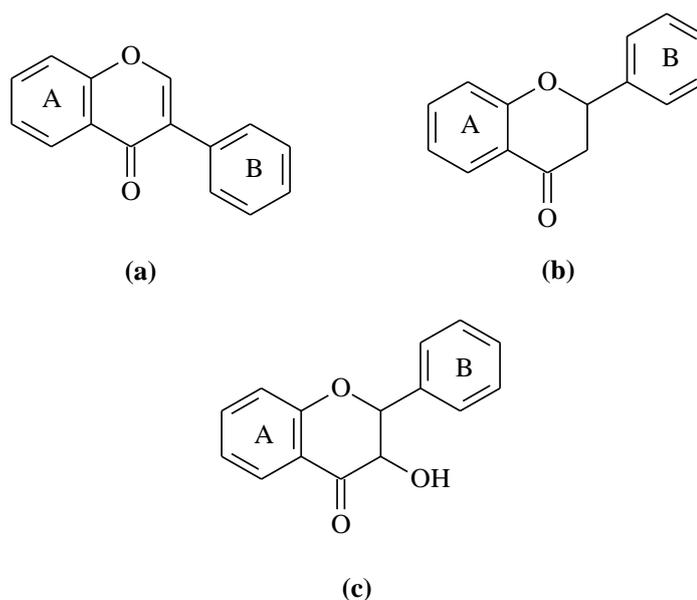


Figura 10 : Esqueleto de uma isoflavona (a); Esqueleto de uma flavanona (b); Esqueleto de uma flavanonol (c)

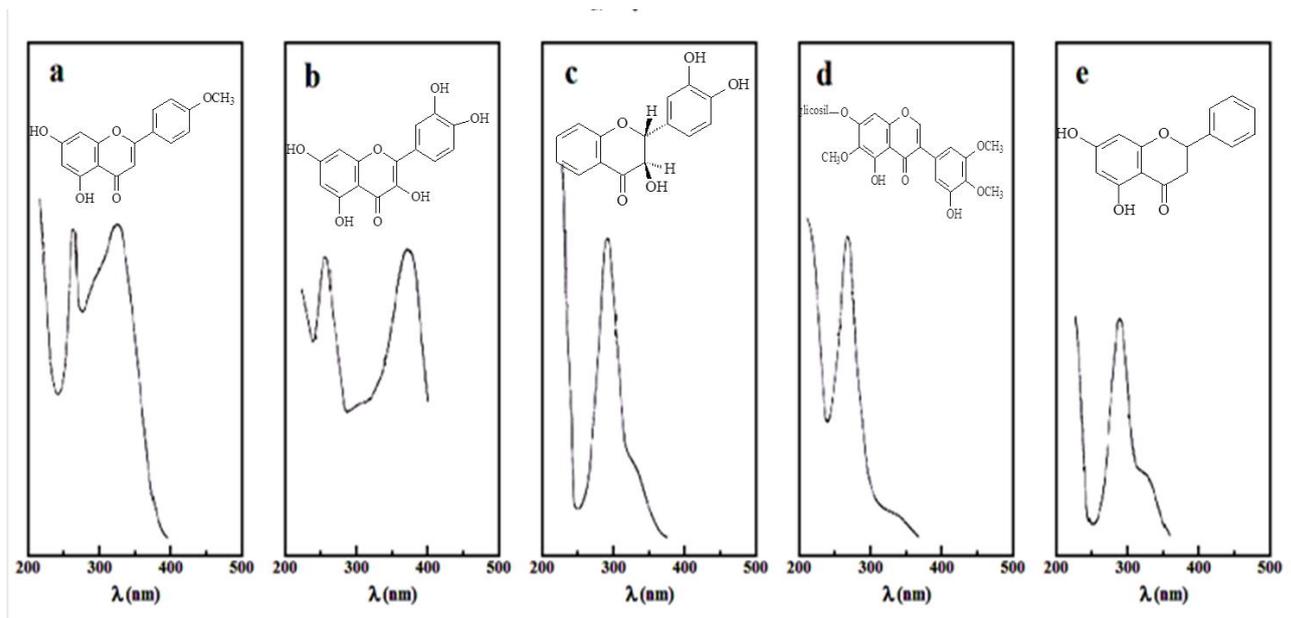


Figura 11: Espectros UV-Vis típico das classes de flavonoides. a) flavona (acacetina); b) flavonol (quercetina); c) flavanonol (taxifolina); d) isoflavona (iridina); e) flavanona (pinocembrina).

1.4 Quimiometria

A quimiometria tem como objetivo a análise de dados químicos de natureza multivariada e pode ser definida como uma disciplina química que emprega métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada e para fornecer o máximo de informação química com a análise dos dados obtidos. [42]

A utilização de ferramentas quimiométricas iniciou-se no Brasil na primeira metade da década de 70, mas só se firmou definitivamente com a instalação de computadores nos laboratórios químicos. [43]

Os trabalhos que usam Quimiometria podem ser agrupados em três áreas: planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões (métodos de análise exploratória e classificação) e calibração multivariada. [43]

A respeito de estudos feitos com a própolis, a quimiometria é empregada principalmente para a determinação da fonte botânica e origem geográfica de amostras através da análise de componentes principais (PCA- do inglês, *Principal Component Analysis*). [28, 44-47]

1.4.1 A Organização dos Dados

Os dados obtidos em um experimento devem ser organizados antes de serem submetidos à análise multivariada.

Quando uma determinada amostra (objeto) é analisada, os resultados obtidos são as variáveis para determinado objeto. Esses resultados podem ser expressos, por exemplo, em termos de concentração, altura do pico, absorvância, entre outros dados. Os dados são dispostos em forma de uma matriz \mathbf{X} ($n \times m$), em que cada linha representa uma amostra (n) e as colunas as variáveis (m), como pode ser visto na Figura 12. [42, 48]

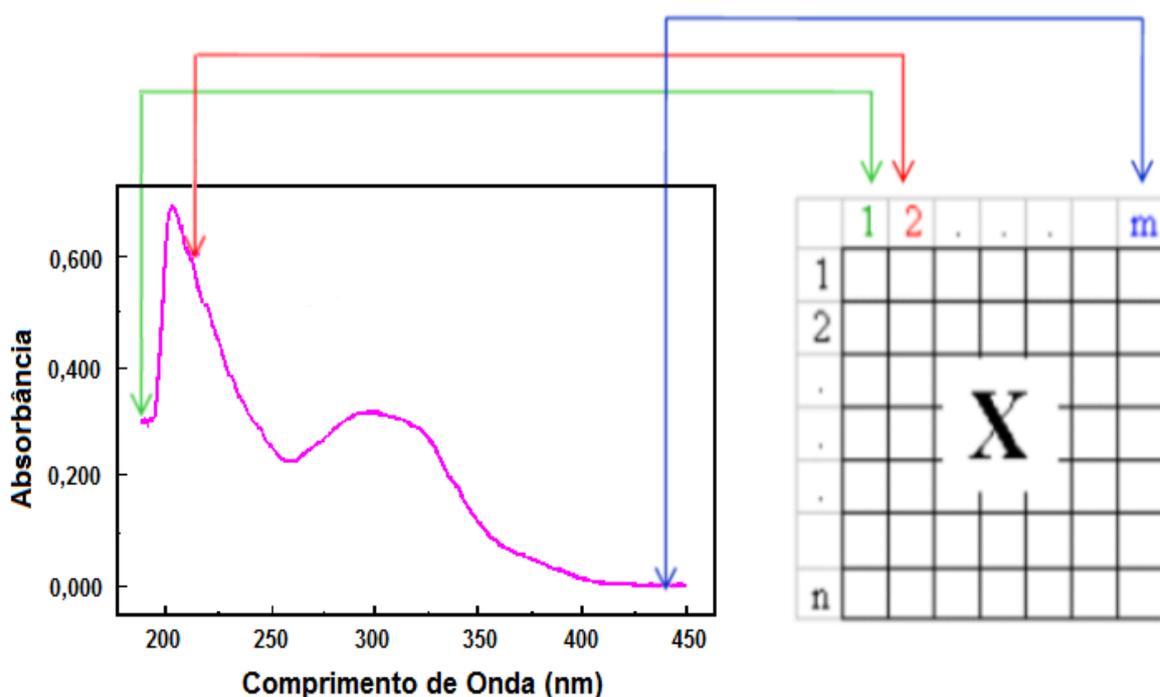


Figura 12: Dados organizados em uma matriz \mathbf{X}

É importante analisar se as variáveis são homogêneas (mesma unidade de medida), ou heterogêneas (unidades distintas), pois essa informação ajuda na decisão sobre a qual pré-processamento os dados devem ser submetidos. [48]

1.4.2 Pré-processamento dos Dados

A etapa de pré-processamento dos dados é necessária quando os dados experimentais não têm uma distribuição adequada para a análise como, por exemplo, são obtidas medidas em diferentes unidades e variáveis com diferentes variâncias. Ajustam-se então as grandezas de forma que elas tenham valores equivalentes para que todas tenham a mesma importância sobre o modelo. [42]

Os métodos de pré-processamento mais utilizados são:

- a) Centrar na média: calcula-se a média de cada coluna de variáveis e subtrai-se dos seus respectivos valores. Com este tratamento a origem dos eixos é deslocada de forma que os dados passam a ficar distribuídos em torno da origem (Figura 13). No caso de dados espectroscópicos, recomenda-se centrar os dados na média devido ao fato de as medidas apresentarem variáveis com unidades iguais. [42, 48]

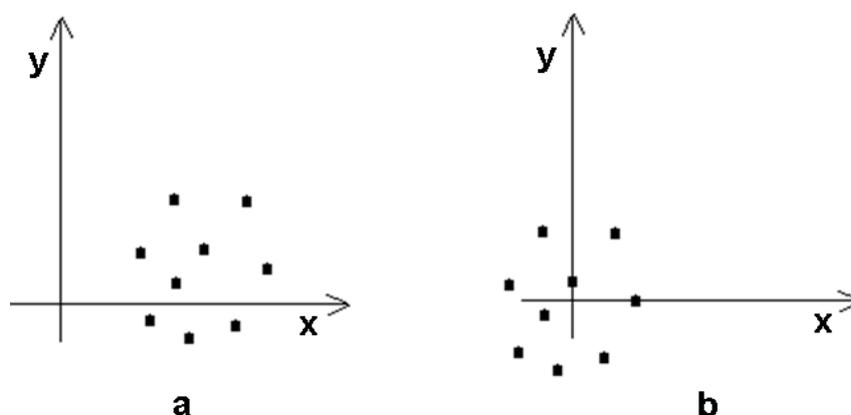


Figura 13: Distribuição de variáveis em torno do eixo cartesiano. a) dados originais b) dados centrado na média.

FONTE: BRERETON, 2003. [49]

- b) Autoescalar: consiste em centrar os dados na média e dividi-los pelo respectivo desvio padrão de cada coluna/variável. Com esse tratamento cada variável passa a ter média zero e desvio padrão igual a 1. O autoescalamento dos dados é recomendado quando os dados estão em escala muito diferentes e se quer atribuir a mesma significância a todos. [42, 48]

1.4.3 Reconhecimento de Padrões

Os métodos de reconhecimento de padrões podem ser aplicados com diferentes finalidades, entre elas a análise exploratória de dados. [43]

A análise exploratória é usada para tentar detectar padrões de associação no conjunto de dados, a partir dos quais se pode estabelecer relações entre objetos e variáveis. Os dois métodos de análise exploratória mais usados são a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise de Agrupamento Hierárquica (HCA- do inglês, *Hierarchical Cluster Analysis*).[42]

A PCA encontra-se entre as mais importantes ferramentas de análise multivariada, inclusive por constituir a base na qual se fundamentam a maioria dos outros métodos multivariados de análise de dados. O principal objetivo da PCA é reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados, preservando ao mesmo tempo o máximo de informação. Isto é feito calculando-se combinações lineares das variáveis originais. [42]

A primeira componente principal, PC1, é a combinação linear de máxima variância. A segunda componente principal, PC2, também descreve a máxima variância restante, porém ortogonal a PC1. A terceira PC é de máxima variância restante e é ortogonal às duas primeiras PCs, e assim por diante. Como esses eixos são calculados em ordem decrescente de importância, muitas vezes a informação relevante fica concentrada nas duas ou três primeiras PCs, que podem ser então examinadas à procura de padrões. A PCA é um método não supervisionado já, que não se conhece *a priori* a que classes pertencem os objetos ou pelo menos essa informação não é utilizada na construção do modelo. [43, 50-51]

Tão importante quanto a determinação do número de componentes principais que devem ser utilizadas para a construção do modelo é também a identificação dos *outliers*, que pode ser feita avaliando o *leverage* e os resíduos de *Student*. O *leverage* é uma medida da influência de uma amostra em comparação com o resto do conjunto de dados e os resíduos de *Student* é uma medida da informação da amostra que não foi modelada. As similaridades e diferenças entre objetos e variáveis podem ser vistos através de gráficos, em que os Escores ou pesos das PCs são plotados uns contra os outros. [51]

1.4.4 Calibração Multivariada

A análise de regressão é o método estatístico usado para prever valores de uma ou mais variáveis respostas (dependentes) a partir de uma coleção de valores de variáveis preditoras (independentes). Uma das técnicas mais utilizadas para se obter essa correlação é a calibração multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS- do inglês, *Partial Least Squares*). [52]

O modelo PLS é desenvolvido a partir de um conjunto de calibração de n amostras, com k variáveis \mathbf{x} , representadas por \mathbf{x}_k ($k=1, 2, \dots, n$) e m variáveis \mathbf{y} representadas por \mathbf{y}_m ($1, 2, \dots, m$). A partir deste conjunto de treinamento são formadas duas matrizes \mathbf{X} e \mathbf{Y} de dimensões $(n \times k)$ e $(n \times m)$. A matriz \mathbf{X} é formada pelas variáveis independentes, ou preditoras, e a matriz \mathbf{Y} é formada pelas variáveis dependentes. [48, 52]

Nessa técnica de calibração multivariada, as matrizes \mathbf{X} e \mathbf{Y} são decompostas em matrizes menores de acordo com as Equações 1.1 e 1.2. [51]

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}' + \mathbf{E} \quad (\text{Equação 1.1})$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}' + \mathbf{F} \quad (\text{Equação 1.2})$$

onde,

X e **Y** são as matrizes que serão decompostas

T e **U** são as matrizes de escores

P é a matriz de pesos **X**,

E contém os erros (resíduos) de **X**,

Q é a matriz de pesos **Y**,

F contém os erros (resíduos) de **Y**.

A Figura 14 mostra como ocorre a decomposição dos dados dos blocos **X** e **Y**, em que p = variáveis; h = variáveis latentes.

$$\begin{array}{c}
 \begin{array}{ccc}
 & p & \\
 & \boxed{\mathbf{X}} & \\
 n & &
 \end{array}
 =
 \begin{array}{ccc}
 & h & \\
 & \boxed{\mathbf{T}} & \\
 n & &
 \end{array}
 \begin{array}{ccc}
 & p & \\
 h & \boxed{\mathbf{P}} & \\
 & &
 \end{array}
 +
 \begin{array}{ccc}
 & p & \\
 & \boxed{\mathbf{E}} & \\
 n & &
 \end{array}
 \\
 \\
 \begin{array}{ccc}
 & m & \\
 & \boxed{\mathbf{Y}} & \\
 n & &
 \end{array}
 =
 \begin{array}{ccc}
 & h & \\
 & \boxed{\mathbf{U}} & \\
 n & &
 \end{array}
 \begin{array}{ccc}
 & m & \\
 h & \boxed{\mathbf{Q}} & \\
 & &
 \end{array}
 +
 \begin{array}{ccc}
 & m & \\
 & \boxed{\mathbf{F}} & \\
 n & &
 \end{array}
 \end{array}$$

Figura 14: Decomposição dos blocos de dados **X** e **y**.

Uma relação linear é estabelecida após a decomposição de **X** e **y**, entre os escores t e u , como pode ser visto na Equação 1.3. [48]

$$u = b_h t_h \quad (\text{Equação 1.3})$$

onde,

b é o vetor dos coeficientes de regressão

h é o número de variáveis latente usadas no modelo PLS

Os resíduos dos dados, parte da variância que não é explicada no modelo, trazem informação sobre o sistema. No caso em que se têm grandes valores de resíduos em \mathbf{y} o modelo não está bem ajustado, e os resíduos em \mathbf{X} podem informa quais são as amostras anômalas (*outliers*). [48]

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. [48, 51]

A validação cruzada também é utilizada para a escolha do número de variáveis latentes que irão descrever o modelo. O número de variáveis latentes utilizado deve ser aquele que minimiza a raiz quadrada dos erros médios quadrados da validação cruzada (RMSECV, do inglês, *Root Mean Square Error Cross Validation*), conforme Equação 1.4. [48, 51]

$$\text{RMSECV} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n-1} (\hat{y}_i - y_i)^2}{n}} \quad (\text{Equação 1.4})$$

onde \hat{y}_i e y_i são, respectivamente, os valores previstos e os de referência para a propriedade de interesse, e n o número de amostras. 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. Esses valores expressam a veracidade do modelo, ou seja, a proximidade entre o valor calculado pelo modelo (\mathbf{y}_{prev}) e o valor obtido pelo método de referência (\mathbf{y}_{real}).

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*).

$$\text{RMSEC} = \sqrt{\frac{\sum (\hat{y}_p - y_r)^2}{n-v}} \quad (\text{Equação 1.5})$$

Onde n é o número de amostras, v é o número de graus de liberdade perdidos, que é igual ao número de variáveis latentes +1, para dados centrados na média. [51]

Para avaliar a exatidão do conjunto de previsão, utiliza-se o erro médio quadrático de previsão (RMSEP- do inglês, *Root Mean Square Error of Prediction*). [51]

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum(\hat{y}_p - y_r)^2}{n}} \quad (\text{Equação 1.6})$$

1.4.5 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais – PLS-DA

O PLS não foi originalmente designado como uma ferramenta estatística para análise discriminante. Apesar disso, ele tem sido utilizado frequentemente com essa finalidade e tem mostrado um ótimo desempenho nesse papel. [53]

O método PLS-DA (do inglês- *Partial Least Squares Discriminant Analysis*) é um método multivariado, supervisionado (a informação sobre a que classes pertencem os objetos já está disponível e é usada na construção do modelo), utilizado para classificação de amostras, no qual é feita a redução de variáveis e não está claro se as diferenças entre grupos irão dominar a variabilidade total das amostras. O vetor \mathbf{y} em um modelo PLS-DA indica a classe ao qual a amostra pertence. Quando se tem duas classes a serem discriminadas utiliza-se o método PLS1. Neste caso, existe uma variável dependente, \mathbf{y} , que pode assumir valores 0 ou 1. [53]

Para o caso no qual três ou mais classes estão presentes utiliza-se o método PLS2. A variável dependente é uma matriz com o número de colunas igual ao número de classes assumindo valores iguais a 0 ou 1, que indicam se a amostra pertence ou não à classe. Por exemplo, no caso de existirem quatro classes e a amostra pertence à classe 2, o valor de \mathbf{y} para essa amostra será $\mathbf{y} = \{0 \ 1 \ 0 \ 0\}$. Os valores previstos são idealmente os valores zero e um, mas na prática os valores aproximam-se destes. [53]

É calculado um valor limite (*threshold*), para o qual os valores acima dele indicam que a amostra pertence à classe modelada e os abaixo que não pertencem à classe modelada. Todos os procedimentos que são usados para selecionar um melhor modelo PLS também são usados para selecionar um melhor modelo PLS-DA. [53]

2. OBJETIVOS

Devido à importância farmacológica e comercial da própolis nos mercados nacional e internacional, há a necessidade de constante evolução dos métodos analíticos de modo a garantir o cumprimento das normas preconizadas pelo MAPA e, conseqüentemente, a qualidade do produto.

Os flavonoides são as principais substâncias responsáveis pelas atividades biológicas da própolis. Os extratos alcoólicos de própolis que possuem uma maior quantidade dessas substâncias possuem um maior valor econômico e muitas vezes são destinados para o mercado exterior. Dessa forma, é de grande importância o desenvolvimento de metodologias para a quantificação dos flavonoides.

Um dos objetivos dessa dissertação é utilizar os resultados das análises que são feitas em laboratórios de rotina de controle de qualidade dos extratos alcoólicos de própolis para a construção de um modelo de calibração multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS), para determinar a concentração de flavonoides nas amostras. Esse modelo visa diminuir o tempo de análise, o custo e também a utilização de reagentes.

Outro objetivo desse trabalho é discriminar os extratos alcoólicos comerciais de própolis quanto ao tipo de flavonoide, utilizando os espectros dos complexos de Al(III) que são obtidos nas análises de rotina para a quantificação de flavonoides. A importância da determinação dos tipos de flavonoides presentes nas amostras está no fato de alguns deles apresentarem propriedades biológicas diferenciadas. Assim, o conhecimento do tipo e concentração do flavonoide presente no extrato faz com que ele possa ser destinado a fins terapêuticos específicos, agregando valor ao produto.

3. DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA PARA QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES NOS EXTRATOS COMERCIAIS DE PRÓPOLIS

Um dos parâmetros avaliados pelo MAPA para controle de qualidade do extrato comercial de própolis é a concentração de flavonoides, cujo mínimo exigido é de 0,25% (m/m). O método espectrofotométrico é o mais utilizado para a determinação da concentração de flavonoides nos laboratórios de controle de qualidade por ser mais simples, rápido e de baixo custo.

A quantificação dos flavonoides presentes na própolis é muito importante, pois a essas substâncias são atribuídas as diversas propriedades biológicas presentes na própolis. Assim, amostras que possuem uma maior concentração de flavonoides, possuem maior valor econômico.

Ultimamente, os espectros na região do UV-Vis têm sido muito utilizados na construção de modelos de calibração multivariada, tanto para a determinação da concentração de analitos como de propriedades físico-químicas. A utilização desses modelos de calibração multivariada surge como uma alternativa para métodos que, em geral, são muito laboriosos, apresentam interferentes, não possuem uma única variável seletiva que permita a calibração univariada ou que não apresentam boa resolução do sinal analítico. [51]

Nesse trabalho foram utilizados os espectros de absorção desses extratos em conjunto com a análise multivariada para a construção do modelo PLS. A calibração multivariada é capaz de prever uma determinada propriedade, como a concentração de flavonoides, a partir da obtenção do espectro na região do UV-Vis, que no caso da própolis estão diretamente relacionados com a presença dessas substâncias nas amostras.

3.1 Métodos Analíticos para a Determinação de Flavonoides na Própolis

O aumento do uso da própolis e da sua importância econômica fez com que surgisse a necessidade do desenvolvimento de técnicas adequadas para a determinação quantitativa dos flavonoides. Vários métodos têm sido empregados para essa quantificação, mas as mais utilizadas são as reações colorimétricas, a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC- do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*).

A HPLC foi utilizada pela primeira vez para a determinação de flavonoides em 1976 por Fisher e Wheaton. Como os extratos de própolis são solúveis em soluções etanólicas e hidroalcoólicas, a HPLC com fase reversa se tornou a técnica cromatográfica mais utilizada para a determinação qualitativa e quantitativa dos flavonoides presentes na própolis. [27, 54]

Como os flavonoides absorvem radiação UV-Vis, o detector de arranjo de diodos (DAD- do inglês, *Diode Array Detector*) é a forma de detecção mais utilizada. A técnica HPLC-DAD tem sido aplicada para a tipificação da própolis brasileira e também para a identificação dos seus componentes principais. [27, 36]

Além do DAD, estudos avaliam o emprego de outros tipos de detectores. Segundo Aaby et. al. [55], detectores eletroquímicos possuem maior sensibilidade, seletividade e fornecem mais informações sobre a estrutura dos compostos fenólicos quando comparados com os espectros obtidos por detectores de arranjo de diodos. Isso ocorre devido ao fato de que diferentes substituintes ativos eletroquimicamente, em estruturas análogas, fornecem características diferentes no comportamento voltamétrico.

Outro detector utilizado para a quantificação dos flavonoides na própolis é o ESI-MS. A ionização por *eletrospray* (ESI- do inglês, *Electrospray Ionization*) permite a ionização direta e a transferência das moléculas para o espectrômetro de massas (MS-do inglês, *Mass Spectrometry*) e tem estendido a aplicabilidade da espectrometria de massas para um maior número de classes de moléculas que possuem instabilidade térmica, alta polaridade e alta massa molecular. Entretanto, a espectrometria de massas é mais cara e, normalmente, não é encontrada em laboratório de análise de rotina. [29]

Além de diferentes detectores, é relatada na literatura a utilização de diferentes condições cromatográficas para a quantificação de flavonoides, como a utilização de diferentes colunas e diferentes fases móveis (Tabela VI), com o objetivo de se obter uma melhor separação, em um tempo adequado.

TABELA VI: Condições Cromatográficas de estudos que utilizaram HPLC para a quantificação dos flavonoides

Técnica	Coluna	Fase Móvel	Tipo de Eluição	Deteção	Compostos fenólicos analisados	Faixa Linear	Referência
HPLC-RP	C18 CLC-ODS (4,6 mm x 250 mm)	A:(ácido acético/acetato de amônio/metanol/água 0.8:0.3:5.0:93.9 m/v/v/v) e 25% do solvente B (acetonitrila), finalizando com 100% de acetonitrila.	Gradiente	DAD - 280 nm	Ácido caféico, ácido cinâmico, ácido ferúlico, ácido cumárico, isosakuranetina, bacarina, drupanina, artepillin C.	28,83 – 533,33 µg/mL	56
HPLC-RP	Thermo C18(4,6mm x 250 mm) partículas de 5µm.	Metanol e água 80:20	Isocrática	DAD - 280 nm	Propolins	-	57
HPLC-RP	Intersil 5 ODS-2 (4,6 mm x 250 mm)	A: água e ácido acético 95:5, v/v B: metanol	Gradiente	UV -290 nm	Ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, kaempferol, pinocembrina, crisina, galangina, pinostrobrina, cafeato de feniletila, cafeato de benzila e cafeato de isopentila	-	58
HPLC-RP	Capcell Pak ACR 120 C18 (2 mm x 250 mm) partículas de 5µm.	A: 0,1% ácido fórmico e água e B: 0,08% ácido fórmico: acetonitrila	Gradiente	PAD 195-650 nm ; ESI-MS	Ácido caféico, ácido p-cumárico, quercetina, apigenina, kaempferol, pinobanksina, crisina, pinocembrina, galangina, tectocrisina, artepillin C, ácido, 3,4-dimetoxicinâmico.	-	59
HPLC-RP	C18 (4,6 mm x 220 mm)	A: 30 mM NaH ₂ PO ₄ pH 3 e acetonitrila	Gradiente	DAD- 265, 290, 360 nm e MS	Ácido caféico, p- e m-cumárico, quercetina, kaempferol, naringenina, crisina, galangina e pinocembrina	3-80 µg/ml	25
HPLC-RP	YMC Pack ODS-A	Ácido acético: metanol: água (5:75:60 v/v)	Isocrática	DAD- 254 nm	Quercetina, kaempferol, apigenina, isorhamnetina, rhamnetina, pinocembrina, sakuranetina, crisina, acetina, galangina, kaempferide, e tectocrisina	-	60

Apesar dos métodos de quantificação dos flavonoides na própolis por HPLC mostrarem bons resultados, eles não são os mais utilizados para controle de qualidade por requererem instrumentos avançados, padrões autenticados e demandarem mais tempo de análise.

O desenvolvimento da cromatografia gasosa (GC- do inglês, *Gas Chromatography*) precedeu o primeiro uso do moderno HPLC. A análise de derivados de flavonoides por CG foi reportada na década de 60. Isso permitiu estudos para a determinação de flavonoides em bebidas em 1973, usando colunas de vidro recheadas com VYDAC[®]. [38]

A análise dos flavonoides por GC, normalmente envolve três etapas distintas: extração da amostra, derivatização e análise GC. [29,38]

Devido ao fato da cromatografia gasosa se limitar a compostos voláteis que possuem estabilidade térmica na temperatura de operação, há uma preferência pelos pesquisadores na utilização do HPLC, o que tem refletido em um crescente número de publicações relatando a investigação de flavonoides por essa técnica. Apesar da tendência da utilização do HPLC para esse fim, estudos mostram que em termos gerais há uma melhor separação dos componentes por GC. [29,38]

Além disso, a quantificação de flavonoides por HPLC pode ser problemática devido a alguns fatores como sinal de ruídos muito alto devido a impurezas na amostra, alargamento dos picos (que reduz a eficiência) tanto com a utilização dos modos isocrático e gradiente. Também pode ser observada adsorção competitiva entre componentes, o que é negligenciável por GC. [38]

Para a determinação dos flavonoides na própolis é muito utilizada a cromatografia gasosa acoplada com o espectrômetro de massas. A espectrometria de massas (MS) permite a aquisição da massa molecular e também de informações estruturais, sendo usada tanto pra fins qualitativos, quanto quantitativos. Entretanto, a própolis contém alguns componentes que não são suficientemente voláteis para análise direta por GC-MS, e necessita da utilização da derivatização ou de outras técnicas como a cromatografia gasosa de alta resolução (HT-HRGC- do inglês, *High-Temperature High-Resolution Gas Chromatography*). A Tabela VII apresenta alguns trabalhos que utilizaram a GC para a determinação dos flavonoides na própolis, alguns tipos de colunas e os flavonoides analisados. [29]

Tabela VII: Resumo de alguns trabalhos que utilizaram CG para a quantificação dos flavonoides

Coluna	Flavonoides analisados	Referência
0,25 mm x 9 m I.D. de sílica fundida com fase estacionária SE-54	Pinocembrina e Galangina	61
0,25 mm x 25 m HP-1 capilar de metil-silicone	Ácido cinâmico, pinobanksina, pinocembrina, pinobanksina 3-acetato, ácido 1,1-dimetil caféico, crisina, galangina, pinocembrina 7-metil éter, crisina 7-metil éter, e galangina 7-metil éter	62
0,25 mm x 23 m HP5-MS coluna capilar	Pinostrobina, pinocembrina, benzilferulato, galangina, crisina, feniletilcafeatoekaempferol	63
0,20 mm x 17 m HP5-MS coluna capilar 5% fenilmetilpolisiloxano	Isoflavonoides	64

No geral, a cromatografia gasosa não é utilizada para a determinação quantitativa dos flavonoides presentes na amostra de própolis, mas mostra-se muito eficiente na identificação dos compostos nessa substância tão complexa.

As técnicas espectrofotométricas são muito utilizadas para controle de qualidade devido à sua rapidez e baixo custo. [29, 58]

Apesar dos métodos cromatográficos serem mais exatos e precisos na identificação e quantificação dos flavonoides, esses métodos exigem pessoas altamente qualificadas para a operação, materiais e equipamentos caros. Além disso, os métodos cromatográficos limitam-se à quantificação dos compostos majoritários e estudos mostram que a quantificação dos componentes ativos em grupos com a mesma estrutura química ou similar correlaciona-se melhor com a atividade biológica, o que torna os métodos espectrofotométricos ainda mais vantajosos. [29, 57;58]

O método espectrofotométrico para a quantificação de flavonoides na própolis é baseado na formação de um complexo entre o Al(III) e os grupos carbonila e hidroxila dos flavonoides. (Figura 15). Na presença do Al(III) é observado um deslocamento batocrômico nas bandas I e II do espectro do flavonoide, e também um aumento da absorção. Dessa forma, é possível quantificar os flavonoides, evitando-se a interferência de outras substâncias

fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos. Esse comportamento é observado para todos os flavonoides que possuem grupos 5-hidroxi-4-ceto, 3-hidroxi-4-ceto e/ou *o*-dihidroxi, sugerindo que esses grupos são importantes para a formação do complexo. O deslocamento batocrômico é causado pelo aumento do efeito conjugativo quando os complexos são formados, surgindo um novo anel. A amostra, metanol e o Al(III) são misturados e reagem por 30 minutos. As leituras de absorvância são feitas em torno de 425 nm. Para a construção da curva analítica o flavonoide mais utilizado é a quercetina. [29, 33, 41]

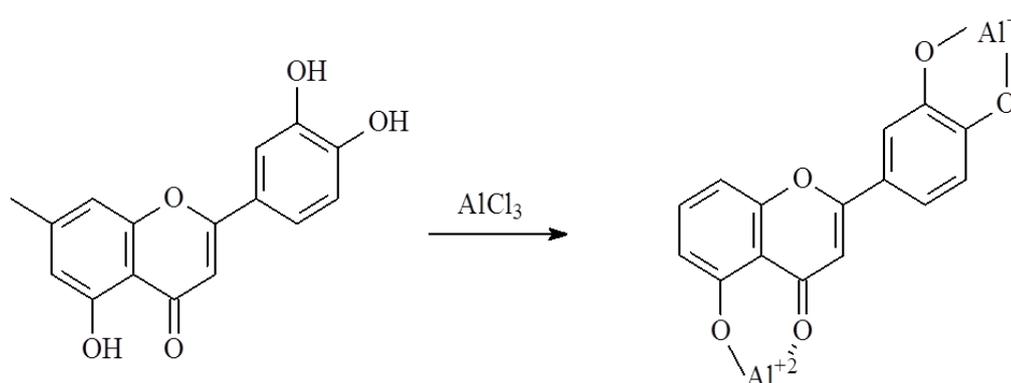


Figura 15: Reação de formação do complexo entre os flavonoides e Al(III)

Segundo Marcucci et. al. [35], o uso do cloreto de alumínio foi primeiramente empregado para a identificação de antocianinas. Ainda segundo Marcucci, em 1954 Harbone sugeriu o uso do cloreto de alumínio para a determinação espectrofotométrica de certos subgrupos dos flavonoides, o qual também passou a ser usado como um reagente de desvios (“shift reagent”) em espectroscopia UV-Vis para a determinação estrutural de flavonoides.

Apesar de ser uma técnica barata, rápida, de fácil execução e precisa, ela é pouco exata. Normalmente os valores são subestimados. De acordo com Marghitas et. al. [65], isso se deve ao fato de o cloreto de alumínio reagir melhor com os flavonoides do grupo das flavonas e flavonóis. Dessa forma, o valor medido e o valor “real” são tanto mais próximos quanto maior a proporção de flavonas e flavonóis nas amostras analisada. [35, 65]

Chang et. al. [66] propuseram que em conjunto com a técnica da utilização do cloreto de alumínio, também seja empregado o método espectrofotométrico baseado na complexação dos flavonoides com a 2-4-dinitrofenilhidrazina (DNP). As flavanonas e flavanonóis interagem com o DNP em meio ácido para formar fenilhidrazonas coloridas. A absorvância é

medida em 486 nm. As curvas analíticas são obtidas utilizando principalmente a pinocembrina como padrão. Vários estudos mostram que a soma dos flavonoides determinados pelo método do cloreto de alumínio e o DNP representam melhor o real conteúdo de flavonoides na própolis. A Tabela VIII sumariza vários estudos que utilizaram o método espectrofotométrico para a determinação de flavonoides na própolis. [57,65-67]

TABELA VIII: Resumos de alguns trabalhos que utilizaram a espectrofotometria para a quantificação dos flavonoides.

Substância de referência	Complexante	λ	Faixa de trabalho	Solvente	Tampão	Referência
Propolina C e Propolina D 4:1.	DNP	486 nm	0.484–2.017 mg/mL	Metanol	-	57
Galangina e Pinocebrina	AlCl ₃ (galangina) ; DNP (pinocebrina)	Galangina (425 nm); Pinocebrina (486 nm)	4-40 µg/ml (galangina); 0,14-1mg/ml (pinocebrina)	Metanol	-	65
Quercetina	AlCl ₃	425 nm	04-12 µg/ml	Etanol	-	11
Quercetina	Al(NO ₃) ₃	415 nm	-	Etanol 80 % (m/v)	Acetato de potássio	68
Quercetina e Naringenina	AlCl ₃ (quercetina) ; DNP (naringenina)	Quercetina (415 nm); Naringenina (495 nm)	0-100 µg/ml (quercetina); 500-2000 µg/ml (naringenina)	Etanol 95% (m/v)	Acetato de potássio	66
Quercetina e Naringenina	AlCl ₃ (quercetina) ; DNP (naringenina)	Quercetina (415 nm); Naringenina (495 nm)	25-100 µg/ml (quercetina); 500-2000 µg/ml (naringenina)	Etanol 95% (m/v)	Acetato de potássio	67
Galangina e Pinocebrina	AlCl ₃ (galangina) ; DNP (pinocebrina)	Galangina (425 nm); Pinocebrina (486 nm)	4–32 µg/mL (galangina); 0.18–1.8 mg/mL (pinocebrina) ; 37–326 µg/mL (galangina e pinocebrina 2:1)	Metanol	-	58
Quercetina	AlCl ₃	425 nm	2-10 µg/ml	Etanol	-	69
Quercetina	AlCl ₃	425 nm	5-40 µg/ml	Metanol	-	70
Quercetina	AlCl ₃	425 nm	04-12 µg/ml	Etanol	-	71
Quercetina	AlCl ₃	425 nm	-	Metanol	-	72

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Amostras

Foram estudadas 97 amostras de extratos alcoólicos de própolis de diferentes origens, adquiridas no comércio ou doadas pelos produtores. As amostras foram nomeadas como comum (C) e verde (V), de acordo com as informações no rótulo. Aquelas que não tinham informação sobre o tipo na embalagem foram classificadas como comum. Antes de serem submetidas à análise, uma alíquota das amostras foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos. Algumas amostras apresentaram formação de corpo de fundo. Somente o sobrenadante dessas amostras foi utilizado para a quantificação.

3.2.2 Reagentes

Para o preparo das soluções da metodologia colorimétrica para a quantificação dos flavonoides, utilizou-se metanol PA da marca Synth, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ da Sigma-Aldrich e CH_3COOLi da marca VETEC.

Para a construção da curva de calibração foi utilizada quercetina da marca Sigma-Aldrich.

Para o preparo das soluções para obtenção dos espectros eletrônicos das amostras, foi utilizado etanol 95%(v/v) da marca Synth.

Nos estudos cromatográficos os seguintes padrões de flavonoides e ácidos fenólicos foram investigados: ácido p-cumárico, quercetina, pinocembrina, crisina, ácido cinâmico, ácido ferúlico, kaempferol, acacetina, naringenina e galangina, todos da Sigma-Aldrich e de grau cromatográfico. Para o preparo a diluição das amostras e preparo das soluções dos padrões foi utilizado metanol de grau cromatográfico da marca J. T. Baker. Para o preparo das fases móveis, além do metanol, foi utilizado 2-propanol da J. T. Baker, acetonitrila da marca CRQ e ácido acético da marca VETEC. Para diluição dos extratos de própolis utilizou-se etanol VETEC de grau HPLC.

3.2.3 Metodologia: método espectrofotométrico

No ensaio de quantificação de flavonoides pelo método espectrofotométrico uma alíquota de 25 μL da amostra foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL. Em

seguida, adicionou-se 500 μL de uma solução de acetato de lítio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Por último, adicionou-se 100 μL de uma solução de nitrato de alumínio 10% m/v. O volume do balão foi completado com metanol. Na Figura 16 podem-se observar o aspecto das soluções preparadas.

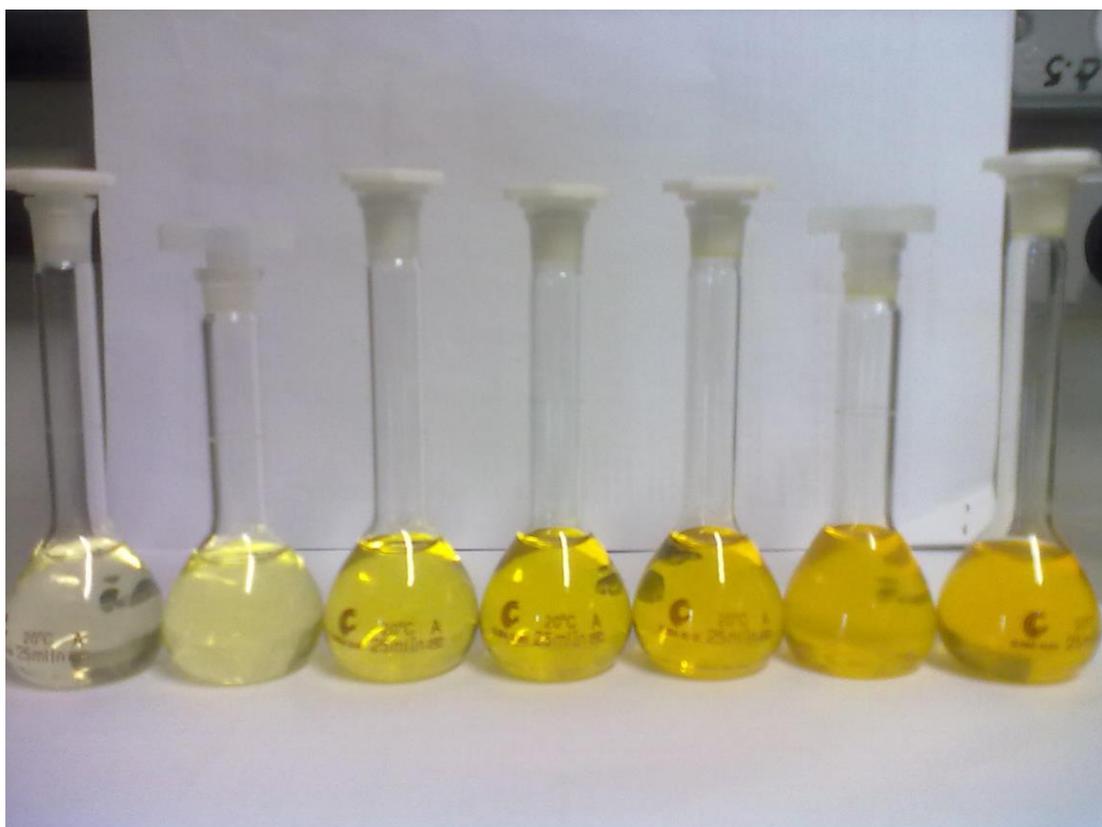


Figura 16: Soluções obtidas da complexação do Al(III) com os flavonoides presentes nas amostras de própolis

Após uma hora, realizou-se a leitura da absorvância das soluções. Os espectros UV-Vis foram obtidos no espectrofotômetro Hewlett-Packard, modelo 8451A, em cubetas de quartzo de 0,5 cm de caminho ótico, com varredura de 190 a 500 nm, com incrementos de 2 nm.

Os ensaios foram realizados em quintuplicata para cada amostra, e as leituras das absorvâncias foram feitas em triplicata para cada solução.

A curva analítica foi construída utilizando solução estoque de quercetina $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol.

Para a obtenção dos espectros eletrônicos das amostras foram preparadas soluções contendo 20 μL de amostra, completando-se o volume do balão volumétrico (25,00 mL) com

etanol 95% (v/v). Os espectros foram obtidos em cubeta de quartzo de 2 mm de caminho ótico, com varredura de 190 a 500 nm e incrementos de 2 nm. Os ensaios também foram realizados em quintuplicata para cada amostra (replicatas independentes), e as leituras das absorvâncias de cada solução foram também feitas em triplicata.

3.2.4 Metodologia: método cromatográfico

Para a análise cromatográfica foram separadas 40 amostras. As amostras foram diluídas 80 vezes em etanol 75% (m/v) e filtradas em filtro de seringa Milipore de 0,21 µm de poro antes da injeção no HPLC.

Para a construção das curvas analítica preparou-se soluções estoque de 1000 µg/mL. Em seguida, uma mistura contendo os 11 padrões foi preparada, diluindo-se adequadamente os padrões de forma a obter uma curva com 16 níveis de concentração na faixa de 0,19 a 50,40 µg mL⁻¹. A curva foi obtida plotando-se a área integrada do pico do composto em função da sua concentração na solução.

As soluções das amostras e dos padrões foram injetadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu com detector de arranjo de diodos (SPD-M20A) e coluna cromatográfica Kinetex Phenomenex[®] C18, com partículas de 2,6 µm, 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro. Foram empregadas quatro fases móveis, a Fase A consistiu de uma solução aquosa 5% de ácido acético, a Fase B consistiu em uma solução 30:5:70:1 de água, 2-propanol, metanol e ácido acético, na Fase C utilizou-se como eluente o metanol e na Fase D empregou-se uma solução 20:20:30:30:2 de água, 2-propanol, acetonitrila, metanol e ácido acético.

3.2.5 Tratamento Estatístico dos Resultados

Determinou-se o intervalo de confiança dos resultados obtidos pela metodologia colorimétrica para um nível de confiança de 95%, utilizando a Equação 3.1.

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{n}} \quad (\text{Equação 3.1})$$

em que :

\bar{x} = média dos valores obtidos pra amostra

s = desvio padrão

t = valor do teste t de *Student*

Para a identificação de amostras anômalas foi utilizado o teste de *Grubbs* para confiança de 95%, utilizando a Equação 3.2.

$$G_{\text{calculado}} = \frac{|\text{valor questionável} - \bar{x}|}{s} \quad (\text{Equação 3.2})$$

onde,

\bar{x} = média dos valores obtidos pra amostra

s = desvio padrão

Para comparar os resultados obtidos pelo método espectrofotométrico e pelo método cromatográfico utilizou-se o teste t pareado para 95% de confiança.

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\bar{d}}{s_d} \sqrt{n} \quad (\text{Equação 3.3})$$

Onde,

$$s_d = \sqrt{\frac{\sum(d_i - \bar{d})^2}{n-1}} \quad (\text{Equação 3.4})$$

em que,

\bar{d} = diferença média entre os métodos A e B

n = número de amostras

d_i = diferença entre os resultados obtidos com os métodos A e B

3.2.6 Análise Quimiométrica

O programa Matlab R2009b e o pacote PLS_Toolbox-522 foram usados para o tratamento quimiométrico dos dados obtidos.

O modelo PLS foi construído utilizando as concentrações de flavonoides nas amostras e os espectros eletrônicos das amostras diluídas em etanol 95% (v/v).

Os espectros eletrônicos tiveram a linha base corrigida utilizando a função *baseline*. As amostras foram separadas em um conjunto de calibração e outro de validação. Para realizar essa separação utilizou-se o algoritmo de Kennard-Stone [73], sendo que 2/3 das amostras foram utilizadas para a calibração (60 amostras) e 1/3 para a validação (30 amostras) do modelo PLS. Sete amostras não foram utilizadas na construção do modelo, três foram separadas para os ensaios de avaliação da precisão e as outras quatro amostras apresentaram distorções em seu espectro eletrônico, o que foi verificado visualmente.

O pré-processamento utilizado foi centrar os dados na média, pois as variáveis para a construção do modelo quimiométrico correspondem aos comprimentos de onda obtidos no espectro UV-Vis e possuem, portanto, unidades equivalentes. O método de validação cruzada utilizado foi o dos blocos contínuos (do inglês, *Contiguous Blocks*) que é o mais utilizado quando se tem um conjunto de dados com mais de 20 amostras.

Para a verificação de possíveis *outliers* foi utilizada uma rotina proposta por Braga em que as amostras consideradas anômalas não foram utilizadas na construção do modelo. [74]

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Método espectrofotométrico – ajuste das condições experimentais

Na literatura não há condições uniformes, sendo utilizados diferentes métodos para a determinação dos flavonoides totais. Um grande número de métodos é descrito (Tabela VIII) em que são utilizados diferentes solventes, concentração de amostra e reagentes. Além disso, a maior parte dos estudos avalia a concentração de flavonoides na própolis bruta, em que os extratos são preparados e tem-se conhecimento da concentração da solução da amostra utilizada [75]. Dessa forma, primeiramente realizou-se um ajuste das condições experimentais do método espectrofotométrico para adequar sua aplicação para amostras de extratos alcoólicos de própolis comerciais.

Para avaliar qual o volume de amostra deveria ser utilizado nas análises selecionaram-se 19 amostras de extrato alcoólico de própolis com teores de extrato seco variados (Tabela IX). O teor de extrato seco é o resíduo obtido após a secagem de um volume conhecido de extrato de própolis. Alguns estudos mostram que o teor de extrato seco pode

estar ligado à presença de seus compostos bioativos, por isso utilizou-se esse parâmetro físico-químico para realizar a triagem das amostras que seriam utilizadas. [4;5, 24]

Prepararam-se soluções adicionando 25 e 50 μL de amostra e 100 μL de nitrato de alumínio 10% (m/v) em balões volumétricos de 25,00 mL, completando-se o volume com etanol 95% e metanol. Após uma hora obtiveram-se os espectros das soluções. Na Figura 17 é apresentado um esquema para melhor entendimento dos procedimentos realizados.

TABELA IX: Amostras selecionadas para avaliação do volume a ser utilizado nos ensaios

Teor de Extrato Seco % m/v	Amostras Selecionadas
0-5	C10; C14; C48; C73
5-10	C27; C59; C64; C83
10-15	C85; C89; V20; V33
15-20	C75; V5; V6; V13
>40	V17; V24; V31

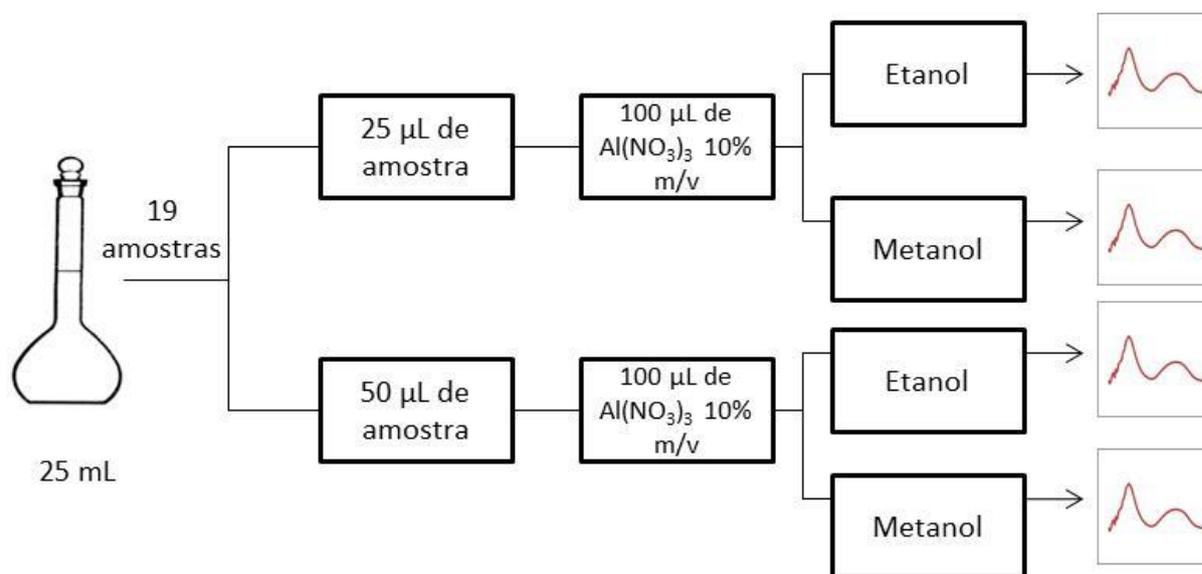


Figura 17: Esquema da metodologia utilizada para avaliar qual volume de amostra deveria ser usado

Algumas amostras apresentaram absorvância maior que 1,0 quando se adicionou o volume de 50 μL . Para absorvâncias maiores que 1,0 o espectro começa a apresentar distorções nas bandas, portanto optou-se pela utilização do volume de 25 μL nos ensaios.

Uma controvérsia observada na literatura é sobre o uso ou não do acetato de potássio. Segundo Malesev [33], os flavonoides são ácidos fracos que tendem a estar protonados. Assim, o pH tem impacto considerável na formação dos complexos. Segundo Dowd [76], os complexos entre os flavonoides e o alumínio se formam mais eficientemente em pH 4,0, como pode ser observado na Figura 18.

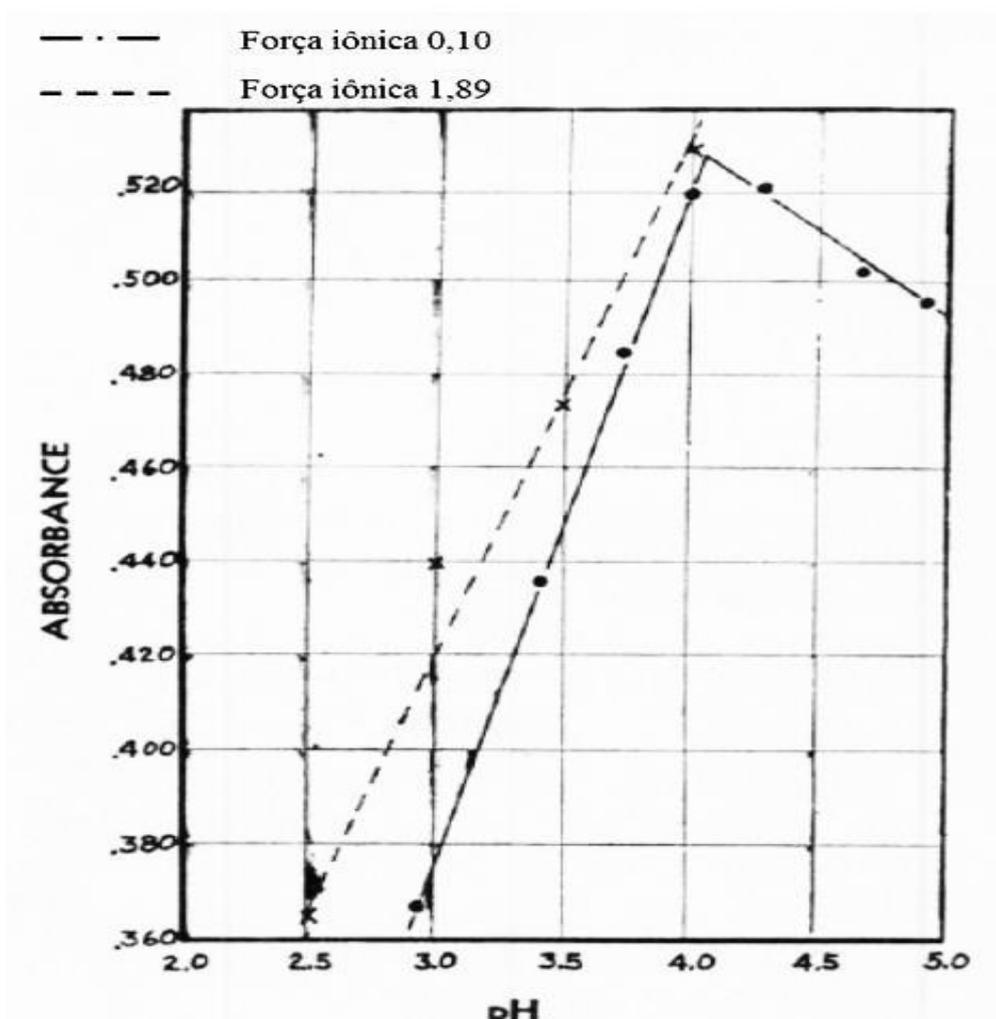


Figura 18: Dependência da absorbância do complexo alumínio-quercetina em diferentes pH e em diferentes níveis de força iônica.

FONTE: L.E. Dowd, 1959 [76]

Na maioria dos trabalhos que utilizam o tampão, o reagente é o acetato de potássio, mas observou-se que sua solubilização é muito difícil tanto em etanol quanto em metanol. Assim, foi testado o uso do acetato de lítio, que se mostrou mais solúvel nos dois solventes. Em seguida, avaliou-se a influência da presença ou não do acetato de lítio e sua concentração

mais adequada. Para isso, fixou-se o volume de nitrato de alumínio adicionado no balão volumétrico de 25,00 mL em 100 μL e variou-se a concentração de acetato de lítio no balão, sendo as concentrações utilizadas 0, 2, 4, 6, 8 e 10 mmol L^{-1} . Esse teste foi realizado com três amostras de extrato alcoólico de própolis (C15, C63 e C99), e com o padrão quercetina. A Figura 19 apresenta um esquema para melhor entendimento dos ensaios realizados e a Figura 20 apresenta os espectros de uma amostra de extrato alcoólico de própolis em diferentes concentrações de acetato de lítio.

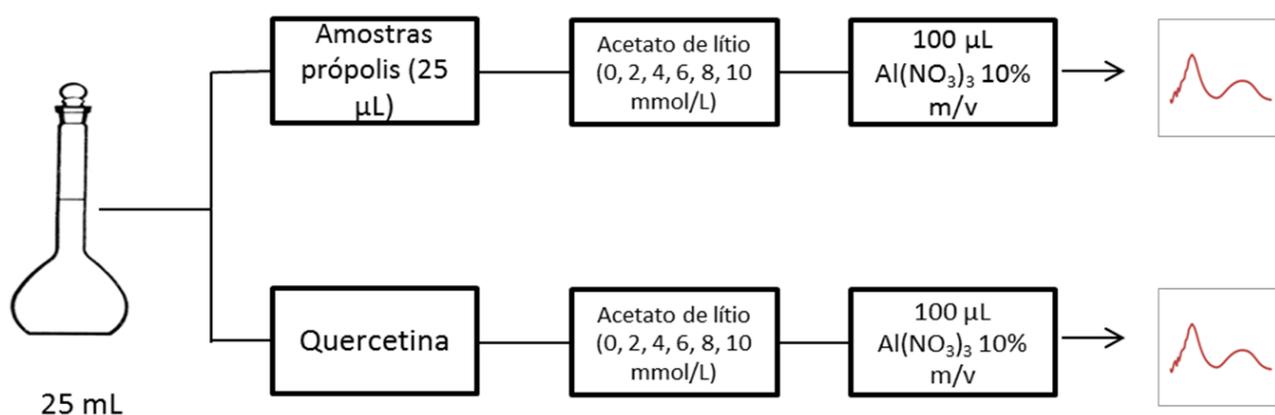


Figura 19: Esquema da metodologia utilizada para avaliar qual a melhor concentração de acetato de lítio

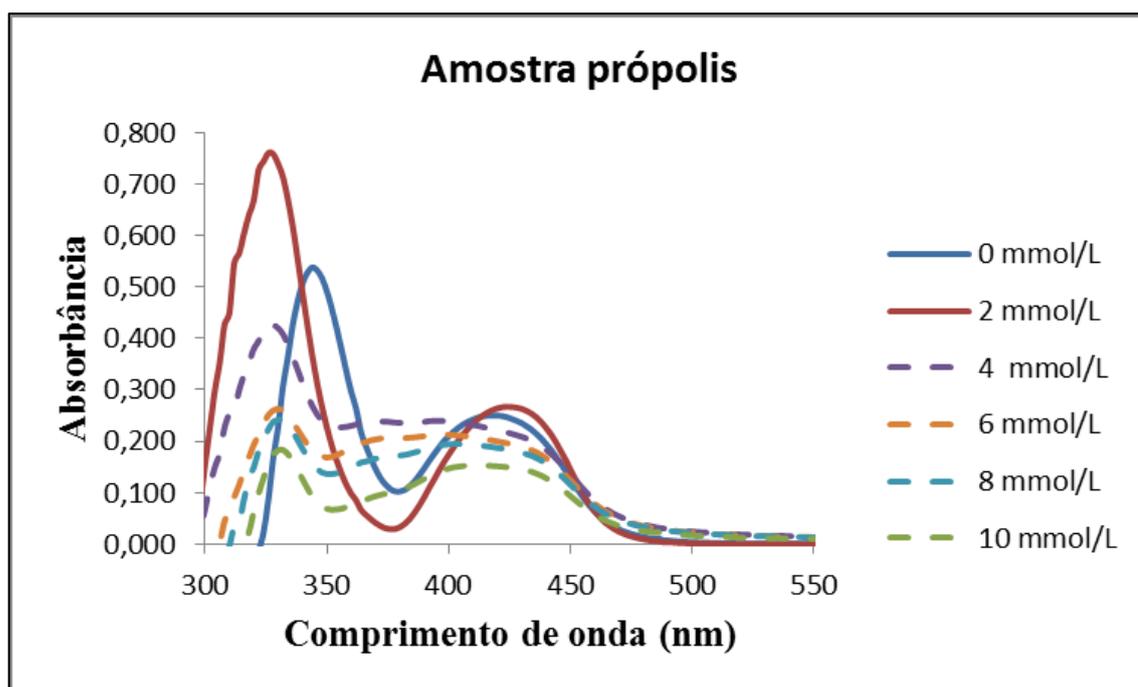


Figura 20: Espectro obtidos para a avaliação da concentração de acetato de lítio para uma amostra de própolis

Na literatura a concentração de acetato utilizada é de 20 mmol L⁻¹, mas é possível observar na Figura 20 que à medida que a concentração do acetato de lítio aumenta, os espectros começam a perder definição e intensidade. Foi possível verificar pela análise dos gráficos que a concentração de 2 mmol L⁻¹ já era suficiente para que a complexação do alumínio com os flavonoides presentes nas amostras ocorresse de forma eficiente, sendo assim essa concentração foi escolhida para ser utilizada nas análises. O ensaio também foi realizado com o padrão quercetina. O espectro em que não foi adicionado tampão e o que foi adicionado 2 mmol L⁻¹ de acetato lítio se mostraram idênticos e foram os que apresentaram maior absorbância. Os espectros em que foram adicionados 4 e 8 mmol L⁻¹ de acetato de lítio também são idênticos (Figura 21).

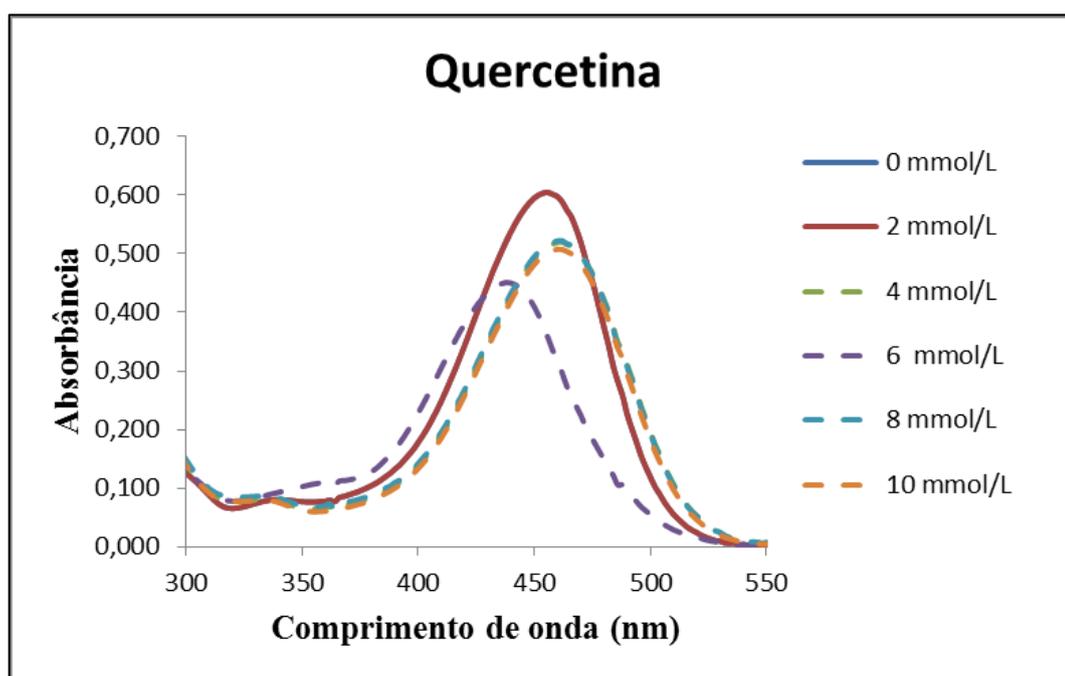


Figura 21: Espectros obtidos para a avaliação da concentração de acetato de lítio para o padrão quercetina

Foi possível notar que as soluções das amostras preparadas em etanol apresentavam turvação. Além disso, segundo Markham [77], quando o etanol é usado, em vez do metanol, os deslocamentos obtidos nos espectros dos complexos com alumínio ficam muito sensíveis a traços de água. Assim, como relatado anteriormente, as soluções em metanol apresentam um espectro com bandas mais definidas e absorbância maior, indicando uma maior eficiência na complexação das substâncias com o alumínio. Além disso, o metanol permitiu uma melhor

solubilização das substâncias presentes na solução. Assim, esse foi o solvente escolhido para a realização das análises, apesar de vários trabalhos da literatura terem sido realizados com o etanol.

Para avaliar a concentração de nitrato de alumínio variou-se a o volume adicionado no balão, que foram 50, 100, 300 e 500 μL de nitrato de alumínio 10% m/v. Os testes foram feitos tanto com as amostras de extrato alcoólico de própolis (C15, C63 e C99), quanto com o padrão. A Figura 22 apresenta um esquema para melhor entendimento dos procedimentos e a Figura 23 os espectros obtidos em diferentes concentrações de nitrato de alumínio.

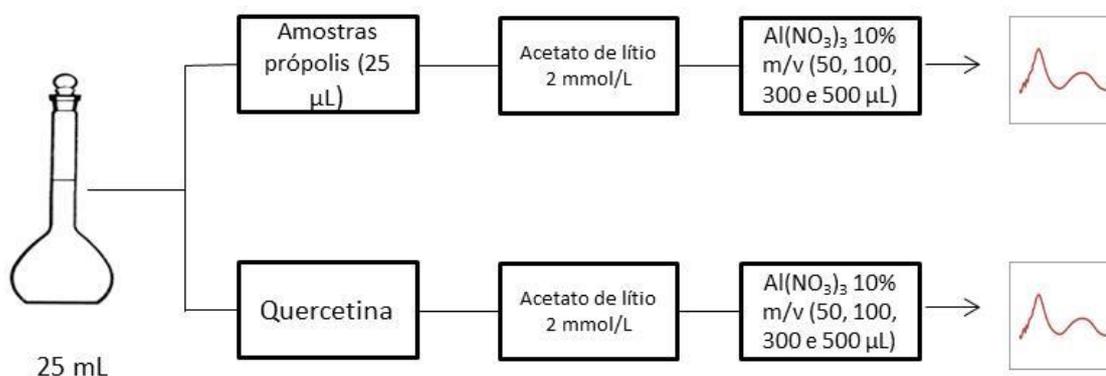


Figura 22: Esquema da metodologia utilizada para avaliar qual a melhor concentração de nitrato de alumínio

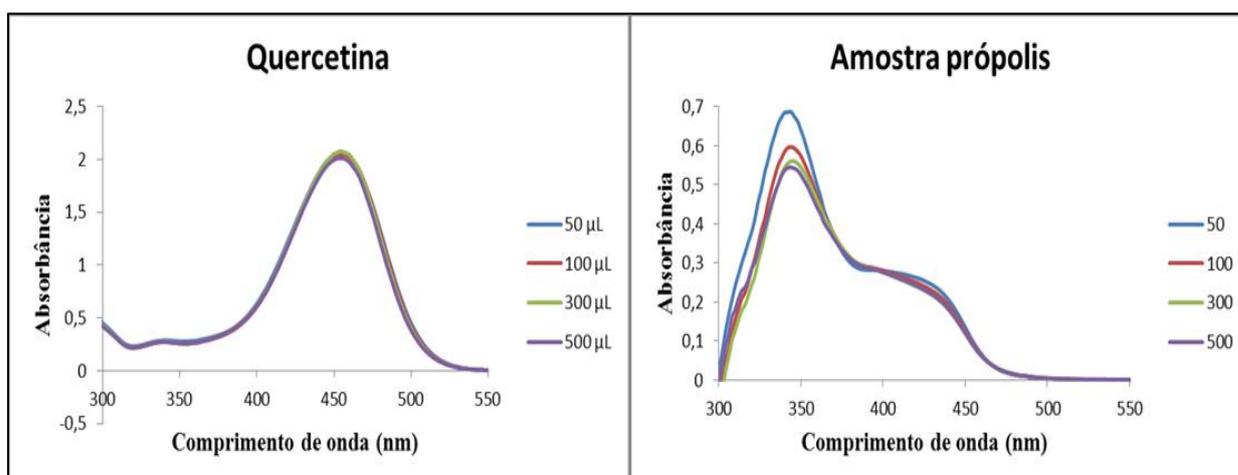


Figura 23: Espectro obtidos para a avaliação da concentração de nitrato de alumínio para uma amostra de própolis e o padrão (quercetina)

Foi possível observar pela análise da Figura 20 que tanto para o padrão quanto para as amostras não há variação considerável da absorbância com a modificação da concentração do nitrato de alumínio. Como a variação da concentração do nitrato de alumínio não influenciou no aspecto do espectro, optou-se por utilizar nas análises o volume de 100 μL de nitrato de alumínio 10% m/v, sendo considerado suficiente para complexar os flavonoides presentes nas amostras.

3.3.2 Metodologia cromatográfica – ajuste das condições experimentais

Como foi visto na Tabela VI, diversas condições são utilizadas para a quantificação dos flavonoides na própolis. Assim, inicialmente, foram testadas diferentes condições cromatográficas como, fase móvel, gradiente, taxa de fluxo e tempo de análise, com o objetivo de obter uma melhor separação dos compostos majoritários, resolução dos picos em extratos alcoólicos comerciais de própolis.

A melhor separação e resolução dos picos foi obtida no tempo de 109 minutos com taxa de fluxo de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. O tempo pode parecer alto, mas no extrato alcoólico de própolis há uma grande quantidade de substâncias e uma separação eficaz de todos os componentes só é possível com tempos elevados de análise.

Em relação à escolha da fase móvel e do gradiente, como as diferenças estruturais entre as substâncias presentes na própolis são muito pequenas empregou-se um gradiente de eluição e eluentes preparados a partir de uma combinação de solventes que visou o aumento da seletividade do processo de separação.

Os ácidos caféico, p-cumárico e ferúlico possuem estruturas muito semelhantes e são diferenciados por meio dos grupos funcionais específicos. Esses compostos possuem massa molar baixa e estabelecem ligações de hidrogênio com solventes próticos. Por isso, o gradiente de eluição foi iniciado com 95 % de uma solução aquosa de ácido acético 5% (v/v) - linha A - e com 5% de uma solução 30:5:70:1(v/v) de água, 2-propanol, metanol e ácido acético -linha B. O aumento gradativo da solução contida na linha B propiciou a separação desses ácidos de forma satisfatória. Na Tabela X pode-se visualizar o programa de gradiente que propiciou a separação dessas substâncias.

O segundo grupo de similaridade é constituído pelo ácido trans-cinâmico, e pelos flavonoides quercetina, naringenina, kaempferol e a pinocembrina, que possuem massas

molares mais elevadas e podem interagir com a fase estacionária mais eficientemente em comparação ao primeiro grupo. Por isso, a partir de 17 minutos combinou-se a fase da linha A com uma solução 20:20:30:30:2 (v/v) de água, 2-propanol, acetonitrila, metanol e ácido acético – linha D. A quercetina e a naringenina são muito similares e somente uma variação abrupta da concentração da solução da linha D promoveu uma separação satisfatória dessas substâncias. A Tabela XI mostra a programação usada para essa finalidade.

TABELA X: Programação do gradiente para a separação do ácido caféico, ácido p-cumárico e ácido ferúlico

Tempo (min)	Linha	Porcentagem (%)
0,01	B	22
0,01	A	78
6,00	B	22
6,00	A	78
10,00	B	37
10,00	A	63
13,00	B	37
13,00	A	63
15,00	B	45
15,00	A	55
17,00	B	45

TABELA XI: Programa de gradiente para a separação do ácido trans-cinâmico, quercetina, naringenina, kaempferol e pinocembrina

Tempo (min)	Linha	Porcentagem (%)
17,01	B	0
17,01	D	25
17,01	A	75
25,50	D	25
25,50	A	75
26,00	D	65
26,00	A	35
30,00	D	65
30,00	A	35

O terceiro grupo de compostos é constituído pelas substâncias crisina, acacetina e galangina. A análise de suas estruturas químicas permite classificá-los como compostos capazes de estabelecer ligações de hidrogênio com solventes próticos. Além disso, essas substâncias estabelecem interações mais fortes com a fase estacionária. Devido a este fato, estabeleceu-se um gradiente linear com a solução da linha B para favorecer o estabelecimento das ligações de hidrogênio entre a fase móvel e as substâncias, de forma a conseguir a eluição seletiva dos componentes. Na Tabela XII encontra-se o gradiente de eluição utilizado nessa etapa.

Por fim, empregou-se a linha C e programou-se o sistema para retornar a condição inicial. Na Tabela XIII tem-se a programação utilizada até o final da eluição.

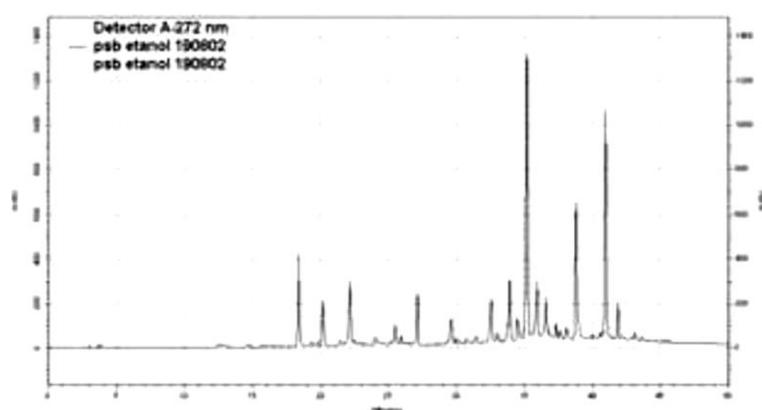
TABELA XII: Gradiente de eluição utilizado para a separação dos flavonoides, crisina, acacetina e galangina

Tempo (min)	Linha	Porcentagem (%)
30,01	B	30
30,01	A	70
35,00	B	30
35,00	A	70
44,99	B	55
44,99	A	45
47,00	B	55
47,00	A	45
52,00	B	60
52,00	A	40
62,00	B	60
62,00	A	40

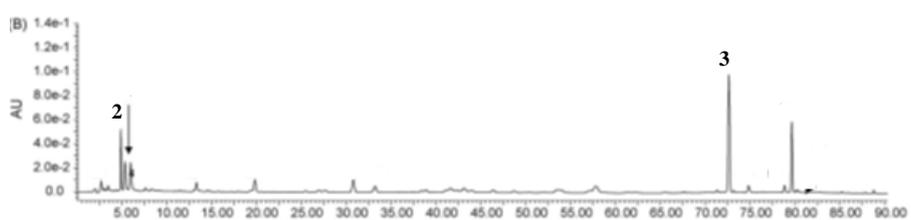
TABELA XIII: Programação do gradiente final

Tempo (min)	Linha	Porcentagem (%)
68,00	C	50
68,00	A	50
75,00	C	80
75,00	A	20
85,00	C	80
85,00	A	20
85,01	C	50
85,01	A	50
86,01	C	0
86,01	B	22
86,01	A	78
109,00	A	78
109,00	B	22

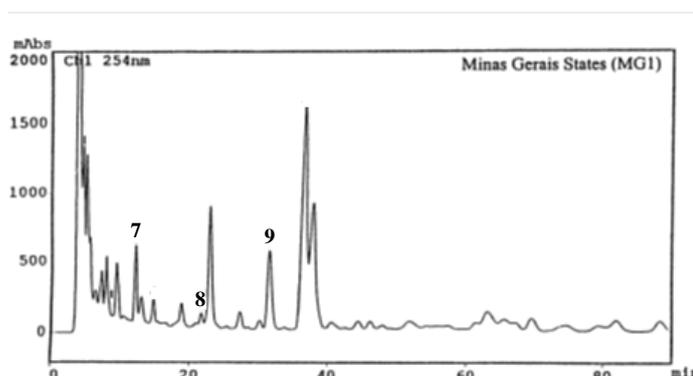
Na Figura 24 é possível observar cromatogramas obtidos em outros estudos e o cromatograma obtido nesse estudo utilizando as condições cromatográficas otimizadas [59;60,78;79]. Como é possível observar pela análise da figura, o cromatograma obtido pelas condições desenvolvidas nesse estudo permite a visualização de um número maior de substâncias com boa resolução dos picos identificados. É possível observar também que há uma grande variabilidade na composição das amostras.



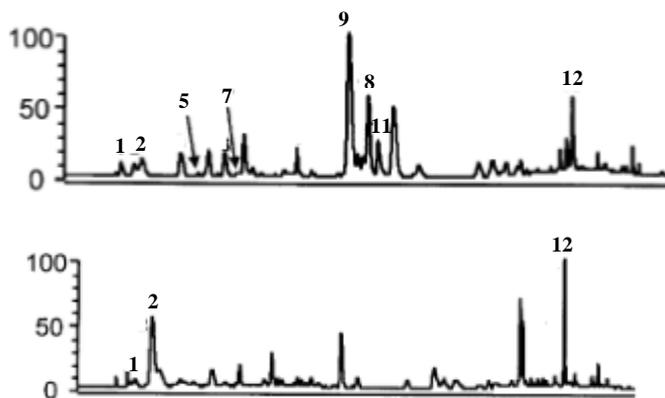
(a)



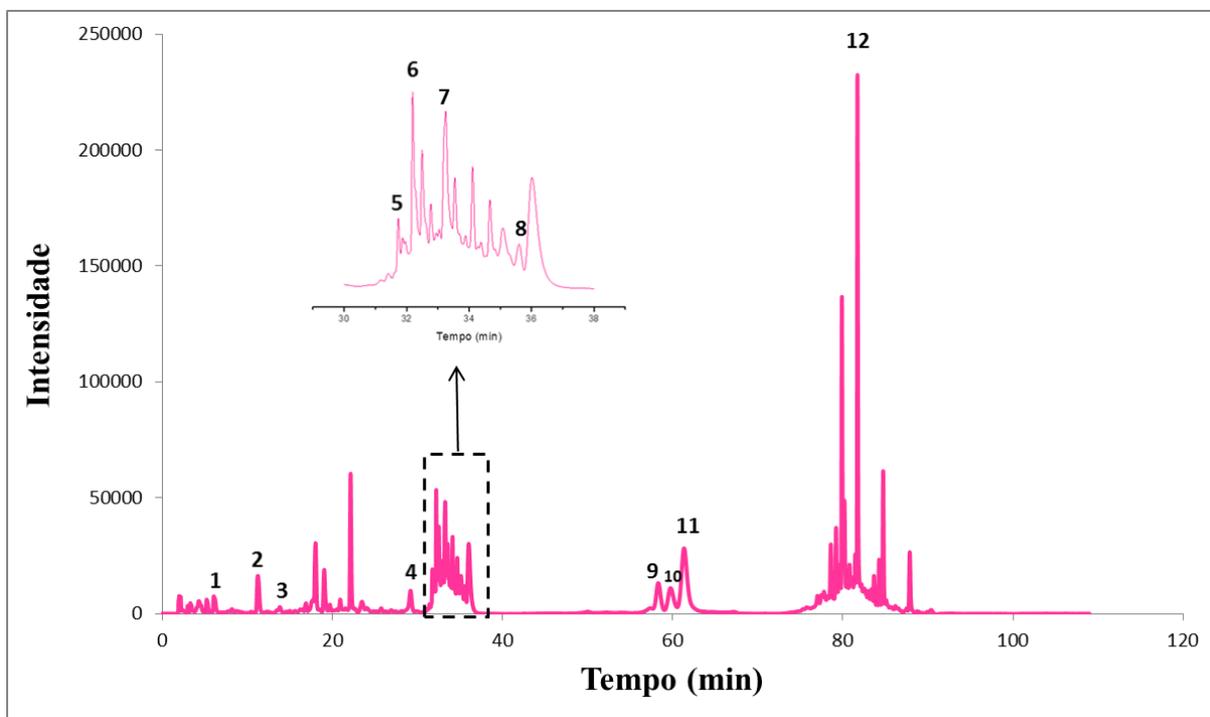
(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 24: Cromatograma de uma amostra extrato alcoólico de própolis obtido por outros autores: (a) –[78] (b) – [79] (c) – [60] (d) – [59] ; cromatograma obtido nesse trabalho: (e) . 1) ácido caféico 2) ácido p-cumárico 3) ácido ferúlico 4) ácido cinâmico 5) quercetina 6) naringenina 7) kaempferol 8) pinocembrina 9) crisina 10) acetina 11) galangina 12) artemillin C.

3.3.3 Determinação da concentração de flavonóides nos extratos comerciais de própolis pelo método espectrofotométrico

A fim de determinar a concentração de flavonoides nas amostras de extratos alcoólicos de própolis construiu-se em triplicata curvas analíticas usando como padrão a quercetina. As curvas foram obtidas em três meses diferentes, no início da realização dos ensaios, no meio e no fim da realização dos ensaios. Assim, tem-se uma curva válida para todo o período de medição. Além disso, uma amostra controle foi medida em todas as análises, apresentando uma variação ao redor de 3%, mostrando boa reprodutibilidade das medições. Como é possível observar na Figura 25, os níveis de concentração da curva apresentaram baixos desvios, mostrando que o método possui boa reprodutibilidade. A faixa de trabalho utilizada é a que possui os pontos em azul.

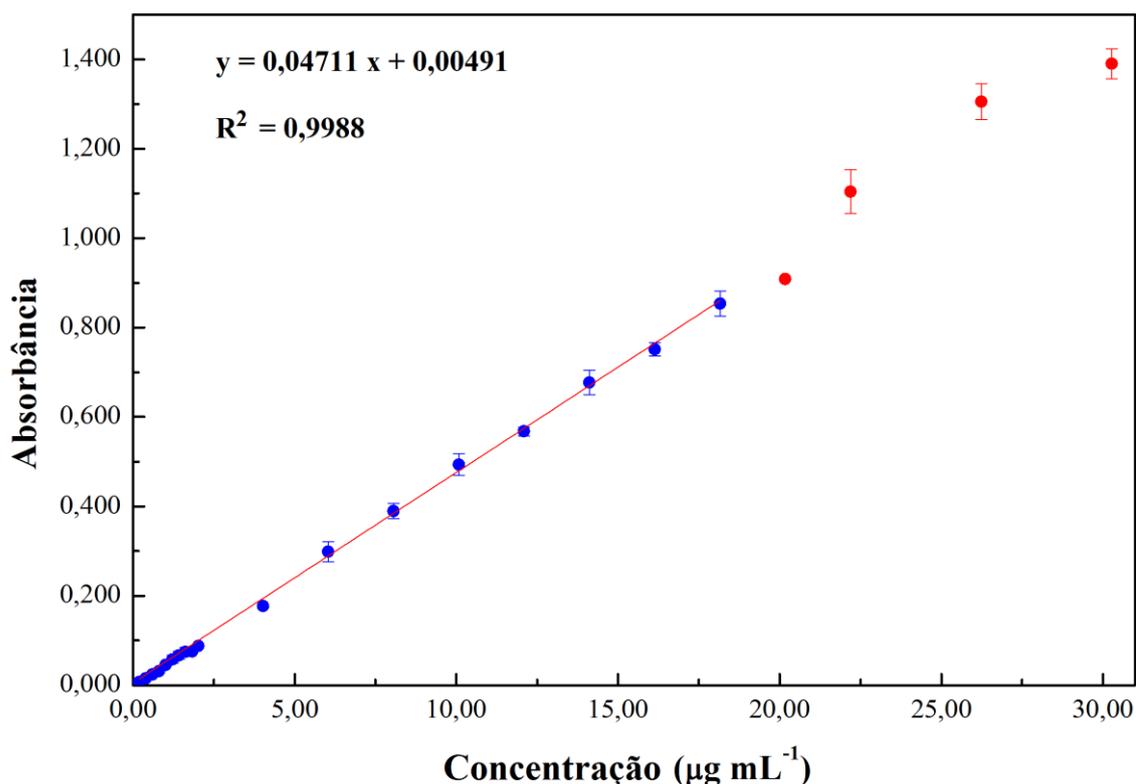


Figura 25: Curva analítica obtida utilizando como padrão a quercetina

A composição química de cada amostra influencia no deslocamento das bandas observadas nos espectros dos complexos formados entre os flavonoides presentes na própolis e o Al(III). Segundo Denni e colaboradores [75], os diferentes substituintes presentes,

principalmente no anel B do núcleo dos flavonoides, provocam diferentes desvios batocrômicos, como pode ser visto na Tabela XIV.

Em muitos trabalhos é relatado que o método baseado na complexação com o Al (III) é pouco exato e que muitas vezes a concentração de flavonoides fica subestimada. Isso se deve ao fato de o comprimento de onda selecionado para as análises ser em torno de 425 nm. Como pode ser observado na Tabela XIV, somente três flavonoides (kaempferol, luteolina e orientina) apresentam máximo de absorbância próximo a 425 nm, o que acaba fazendo com que os valores da concentração de flavonoides obtidos fiquem subestimadas. Na Figura 26 tem-se os espectros dos complexos formados entre os flavonoides presentes nas amostras de própolis e o alumínio. Como é possível perceber algumas amostras apresentam desvios na banda I. [35;66]

TABELA XIV Deslocamentos batocrômicos observados e absorção máxima das soluções dos flavonoides na adição de Al(III)

Composto	Absorção máxima em etanol (nm)	Absorção máxima com adição de AlCl₃ (nm)
Flavonóis		
Kaempferol	265, 368	269, 424
Quercetina	255, 371	271, 445
Miricetina	255, 375	270, 444
Gossipetina	260, 380	268, 443
Flavonas		
Apigenina	266, 335	283, 346
Luteolina	255, 348	269, 425
Orientina	255, 347	267, 426
Acacetina	270, 326	277, 336
Tricina	245, 350	278, 392

FONTE: Adaptado de Denni, Mammen; 2012. [75]

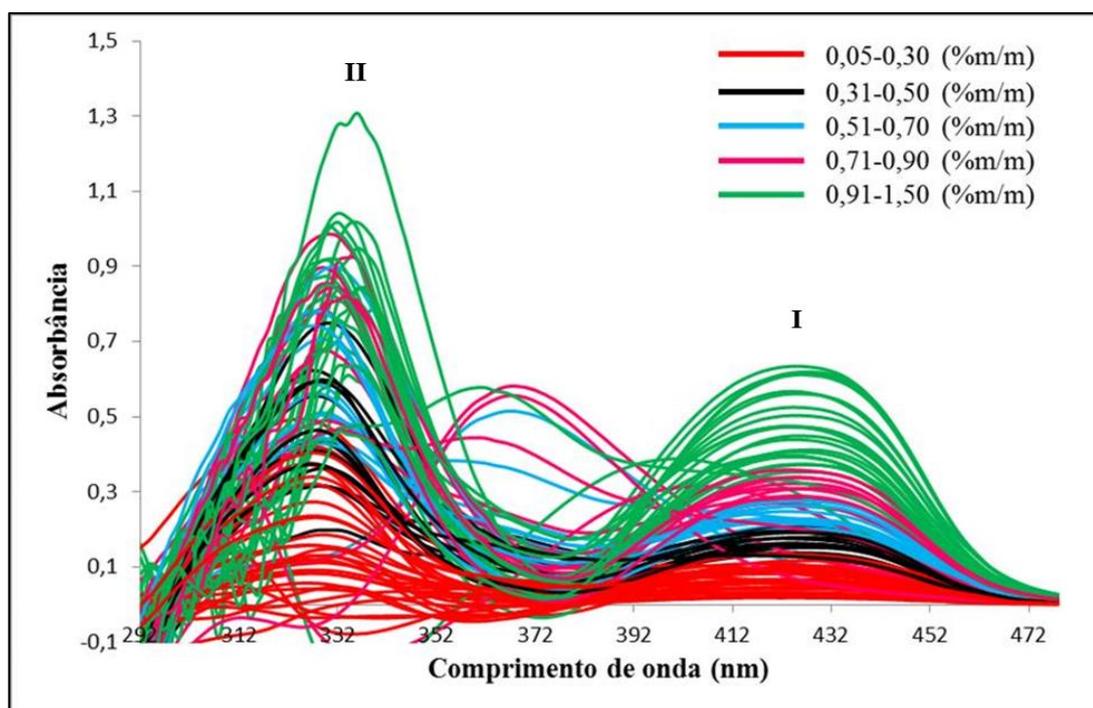


Figura 26: Espectro dos complexos formados entre os flavonoides presentes nas amostras de própolis e o alumínio, de acordo com a concentração de flavonoides.

Para evitar erros na determinação da absorvância optou-se por obter os espectros das soluções das amostras varrendo de 190 a 500 nm. Em seguida, determinou-se o máximo de absorção da banda I dos espectros obtidos para 97 amostras de extrato alcoólico de própolis, ao invés de obter-se a absorvância em 425 nm. Esse valor foi interpolado na curva analítica, obtendo-se assim a concentração de flavonoides em equivalentes de quercetina. Na Figura 27 é apresentado um histograma com a distribuição da concentração de flavonoides nas amostras analisadas.

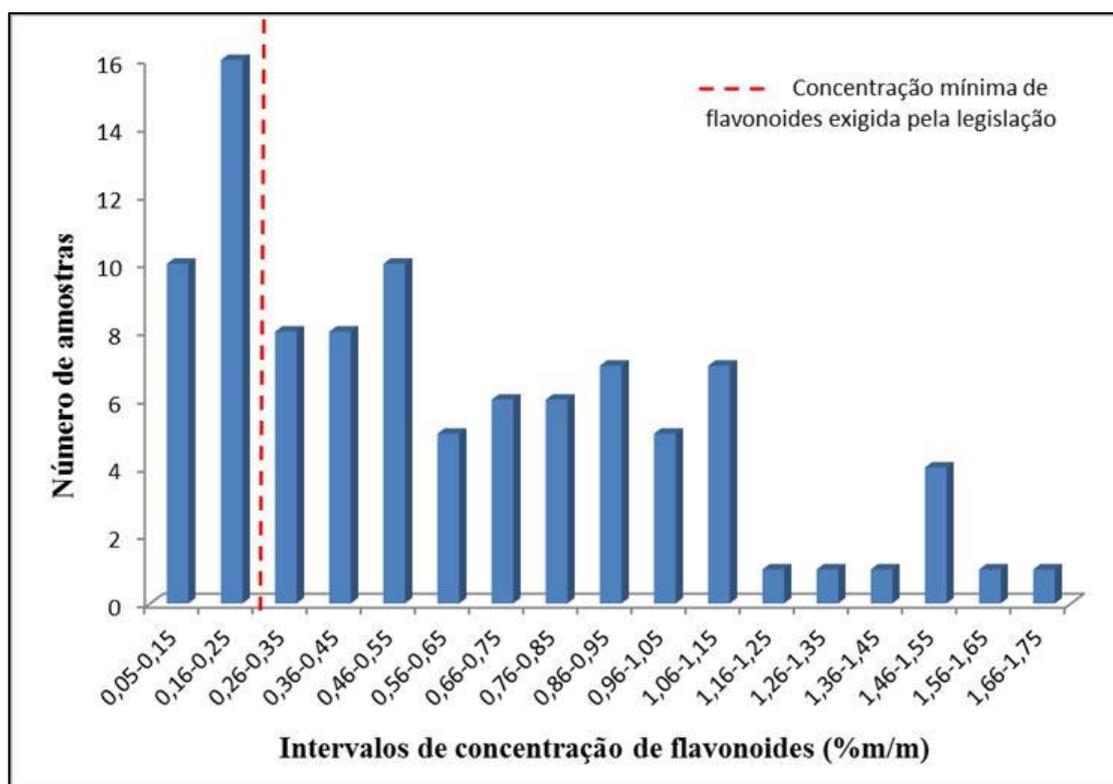


Figura 27: Histograma com as concentrações de flavonoides para as amostras de extrato de própolis

Avaliando os resultados obtidos nesse estudo tem-se que a concentração de flavonoide máxima obtida foi de 1,74% (m/m) e a mínima foi de 0,06% (m/m). O DPR médio do método espectrofotométrico foi de 3,4%.

Chang e colaboradores [66] determinaram a concentração de flavonoides de 12 amostras comerciais de própolis, sendo nove do Brasil, uma da Inglaterra e uma da Nova Zelândia. As concentrações de flavonoides encontradas variaram de 0,55 a 1,82% (m/m), valores semelhantes aos encontrados nesse estudo.

O total de amostras irregulares, ou seja, que possuem concentração de flavonoides menor que 0,25% (m/m), recomendado pelo MAPA, foi de 27%. Para um parâmetro que está ligado diretamente às propriedades biológicas da própolis esse valor é muito alto, o que mostra a necessidade de um monitoramento mais eficiente dos extratos alcoólicos de própolis. Esse produto é utilizado para fins farmacológicos pela população e a garantia de que o valor da concentração de flavonoides está de acordo com o preconizado pelo MAPA assegura que a própolis será eficiente na sua atividade biológica, agregando assim valor ao produto brasileiro.

Como já foi citado anteriormente, alguns estudos mostram que o teor de extrato seco pode estar ligado à presença de seus compostos bioativos e, devido a isso, deveria haver uma correlação entre o teor de extrato seco e a concentração de flavonoides nas amostras. Para verificar se há correlação entre esses parâmetros físico-químicos, construiu-se o gráfico que pode ser observado na Figura 28.

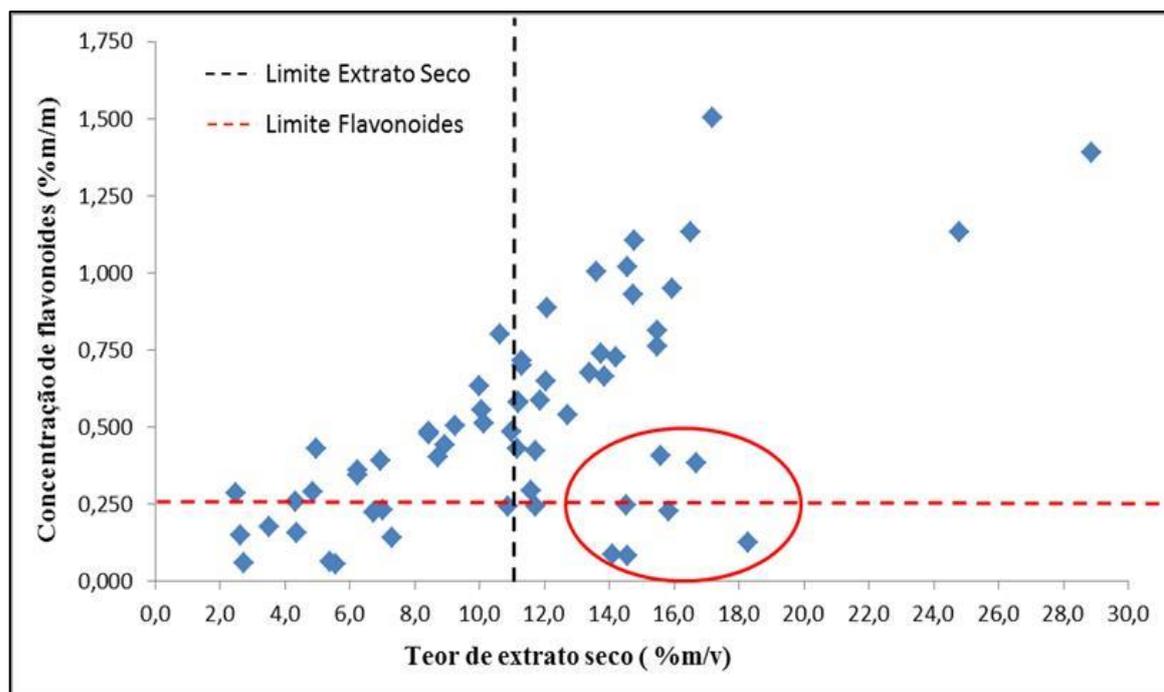


Figura 28: Relação entre os parâmetros teor de extrato seco e concentração de flavonoides. (Os valores mínimos estipulados pelo MAPA encontram-se marcados com linha tracejada).

Em geral, quanto maior o teor de extrato seco, maior é a concentração de flavonoides, mas para algumas amostras esse comportamento não é seguido. Essas amostras foram circuladas no gráfico. Elas possuem alto teor de extrato seco, mas concentração de flavonoides baixa. O teor de extrato seco dessas amostras com comportamento anômalo pode estar levando em consideração substâncias que não possuem propriedades biológicas e assim elas devem ser consideradas irregulares, ou outros compostos bioativos, que não se complexam eficientemente com o alumínio, estão presentes nessas amostras e elas realmente possuem atividades biológicas. Isso mostra que nem sempre um teor de extrato seco alto significa que a amostra apresenta propriedades terapêuticas.

3.3.4 Determinação da concentração de flavonoides nos extratos comerciais de própolis pelo método cromatográfico

Os cromatogramas das amostras e dos padrões foram processados utilizando um *software* específico. A identificação dos compostos foi realizada pela comparação dos tempos de retenção e dos espectros de absorção UV-Vis das amostras e dos padrões. Na Figura 29 é apresentado o cromatograma de uma amostra analisada nesse estudo. Na Tabela XI tem-se os comprimentos de onda (UV-Vis) utilizados na integração dos cromatogramas de cada padrão, assim como os tempos de retenção e a estrutura química de cada composto.

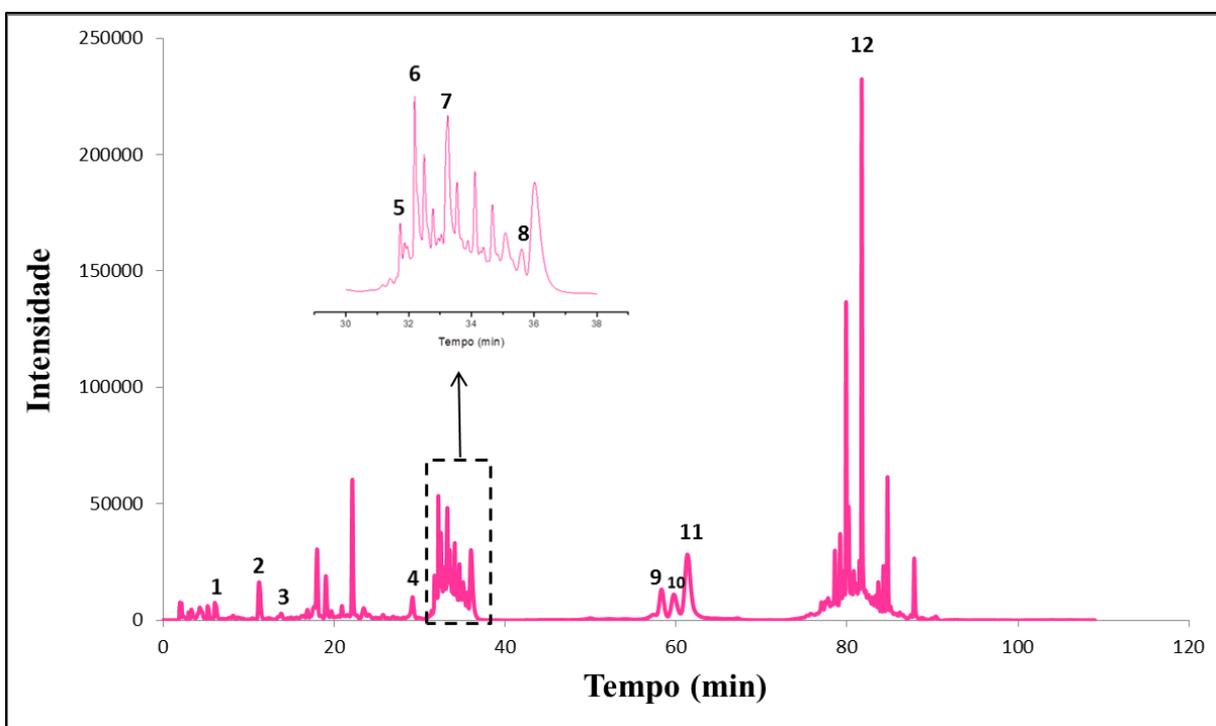
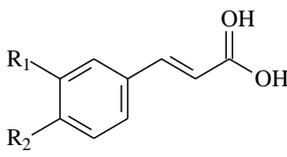
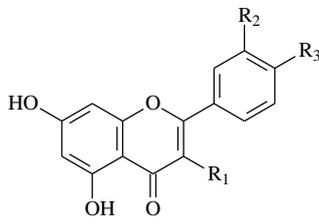
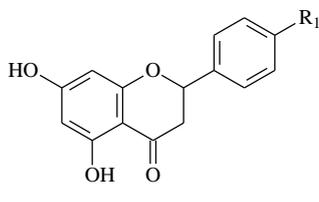
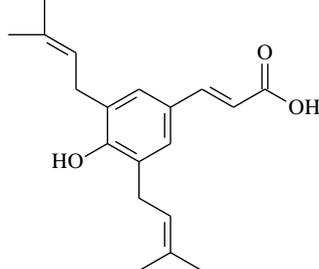


Figura 29: Cromatograma de uma amostra extrato alcoólico de própolis. 1) ácido caféico 2) ácido p-cumárico 3) ácido ferúlico 4) ácido cinâmico 5) quercetina 6) naringenina 7) kaempferol 8) pinocembrina 9) crisina 10) acetina 11) galangina 12) artepillin C.

TABELA XV: Estrutura e tempo de retenção (t_r) dos compostos avaliados na cromatografia

Composto	Estrutura	Grupos substituintes			λ (cm)	t_r (min)
		R ₁	R ₂	R ₃		
Ácido caféico		OH	OH	-	321	6,11
Ácido p-cumárico		H	OH	-	305	11,21
Ácido ferúlico		OCH ₃	OH	-	320	13,44
Ácido cinâmico		H	H	-	278	28,88
Quercetina		OH	OH	OH	370	31,89
Galangina		OH	H	H	265	62,03
Kaempferol		OH	H	OH	368	33,27
Crisina		H	H	H	267	58,78
Acacetina		H	H	OCH ₃	337	60,48
Naringenina		OH	-	-	287	32,19
Pinocembrina		H	-	-	290	35,65
Artepillin C		-	-	-	316	81,72

Como é possível observar na Tabela XV, os ácidos fenólicos (com exceção da artepillin C que possui grupos prenil) tiveram tempo de retenção menor que os flavonoides. Isso deve ao fato dos flavonoides possuírem maior cadeia carbônica do que os ácidos fenólicos, e assim ficaram mais tempo retidos na coluna C18 (apolar). Também é possível observar na tabela que, dependendo do grau de hidroxilação e metilação, há modificação no tempo de retenção. O aumento da hidroxilação reduz o tempo de retenção na coluna, enquanto

o aumento da metilação aumenta a retenção dos compostos na coluna cromatográfica. Além disso, flavanonas (ex. pinocembrina) e flavonas (ex. crisina) eluem mais cedo do que os flavonóis (ex. galangina). [79]

Após a identificação dos compostos presentes na própolis, realizou-se a quantificação dessas substâncias. As curvas foram construídas utilizando 16 níveis de concentração de 0,22-50,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de forma a abranger as faixas de concentração da maioria dos compostos presentes nos extratos alcoólicos de própolis. Na Tabela XVI tem-se alguns parâmetros das curvas analíticas dos padrões. Como pode ser observado, para todos os analitos estudados obteve-se um bom ajuste, com todos os coeficiente de correlação acima de 0,9975.

TABELA XVI: Parâmetros obtidos das curvas de calibração por HPLC

Composto	Coefficiente de correlação	Faixa de trabalho ($\mu\text{g/mL}$)
Ácido caféico	0,9987	0,24 - 44,10
Ácido p-cumárico	0,9998	0,26 - 40,80
Ácido ferúlico	0,9992	0,25 - 10,00
Ácido trans-cinâmico	0,9997	0,28 - 50,40
Quercetina	0,9992	0,24 - 38,40
Naringenina	0,9975	0,22 - 26,40
Kaempferol	0,9983	0,25 - 29,40
Pinoembrina	0,9980	0,25 - 30,00
Crisina	0,9994	0,25 - 44,10
Acacetina	0,9997	0,19 - 33,30
Galangina	0,9989	0,28 - 49,50

Os resultados obtidos pelo método cromatográfico e pelo método espectrofotométrico foram comparados utilizando teste t pareado. Os resultados obtidos pelos dois métodos encontram-se na Tabela XVII.

TABELA XVII: Concentração de flavonoides nas amostras pelo método cromatográfico e espectrofotométrico

Amostra	Concentração de flavonoides pelo método cromatográfico (mg/mL)	Concentração de flavonoides pelo método espectrofotométrico (mg/mL)
C3	2,56	3,29 ± 0,14
C5	0,88	6,26 ± 0,15
C10	5,25	3,25 ± 0,10
C15	0,82	1,36 ± 0,13
C16	4,33	3,76 ± 0,05
C17	0,70	0,38 ± 0,02
C21	3,01	4,69 ± 0,17
C28	7,33	7,35 ± 0,27
C30	2,39	2,90 ± 0,15
C31	1,95	0,92 ± 0,03
C32	2,22	2,76 ± 0,23
C34	11,55	13,42 ± 0,51
C35	4,91	2,47 ± 0,20
C38	2,52	3,47 ± 0,13
C47	9,13	13,72 ± 0,46
C49	1,90	1,74 ± 0,05
C52	1,14	8,41 ± 0,66
C53	12,23	12,7 ± 1,5
C57	2,79	2,34 ± 0,21
C60	6,25	5,31 ± 0,56
C63	3,83	4,39 ± 0,62
C68	7,04	6,77 ± 0,27
C76	1,83	1,82 ± 0,09
C77	0,25	0,29 ± 0,09
C81	1,60	1,87 ± 0,09
C86	7,84	7,30 ± 0,47
C90	4,78	5,44 ± 0,71
C91	0,77	0,65 ± 0,08
C93	1,27	1,20 ± 0,26
C97	6,86	7,95 ± 0,58
V2	7,82	7,35 ± 0,73
V6	4,89	14,3 ± 2,7
V10	3,41	4,87 ± 0,29
V25	8,38	8,61 ± 0,16
V26	7,78	3,95 ± 0,16
V29	9,62	10,75 ± 0,91
V33	2,44	2,81 ± 0,10
V37	3,12	3,28 ± 0,05
V39	9,20	10,3 ± 1,3
V42	1,72	1,81 ± 0,14

O valor de t encontrado foi 1,923. O valor de t tabelado para 39 graus de liberdade é 2,022 para 95% de confiança. Sendo assim, os valores encontrados pelos dois métodos são estatisticamente iguais para a maioria das amostras. Nos estudos de Popova e colaboradores [58], os resultados obtidos pelo método espectrofotométrico e por HPLC-DAD também foram comparados chegando-se também à conclusão de que os resultados são estatisticamente iguais.

Cerca de 20% das amostras analisadas (amostras destacadas em vermelho na Tabela XVII) apresentaram concentração de flavonoides diferentes pelos dois métodos. Alguns desses resultados são menores no método cromatográfico. Isso pode ser devido ao fato de alguns compostos que aparecem no cromatograma de várias amostras não terem sido quantificados, apesar de terem sido selecionados para essa quantificação os compostos descritos pela literatura como majoritários. Por exemplo, há uma grande quantidade de compostos na região próxima do tempo de retenção do artemillin C. Esses compostos são derivados prenilados do ácido p-cumárico. [80;82]

Já os resultados do método espectrofotométrico que foram muito menores que os obtidos pelo HPLC podem ser devido ao fato das diferentes classes de flavonoides interagirem de forma diferente com o Al(III), e assim, alguns compostos podem não terem sido quantificados por não terem formado o complexo com o alumínio. Um exemplo disso são os flavonoides do grupo flavanonas e flavanonóis que não complexam eficientemente com o Al(III). [58]

Como somente uma replicata foi obtida, um possível erro no método cromatográfico será avaliado em estudos futuros em que serão obtidos um maior número de replicatas da concentração de flavonoides para se ter maior confiabilidade dos resultados.

3.3.5 Construção do modelo de calibração multivariada

A concentração de flavonoides obtida pelo método espectrofotométrico para 90 amostras, na faixa de 0,06 a 1,74% (m/m) (vetor y), juntamente com os espectros de absorção na região UV-Vis das amostras diluídas em etanol 95% (v/v) (matriz X) foram usados para a construção de um modelo de calibração multivariada. Na Figura 30 podem-se visualizar os espectros de absorção dos extratos de própolis analisados.

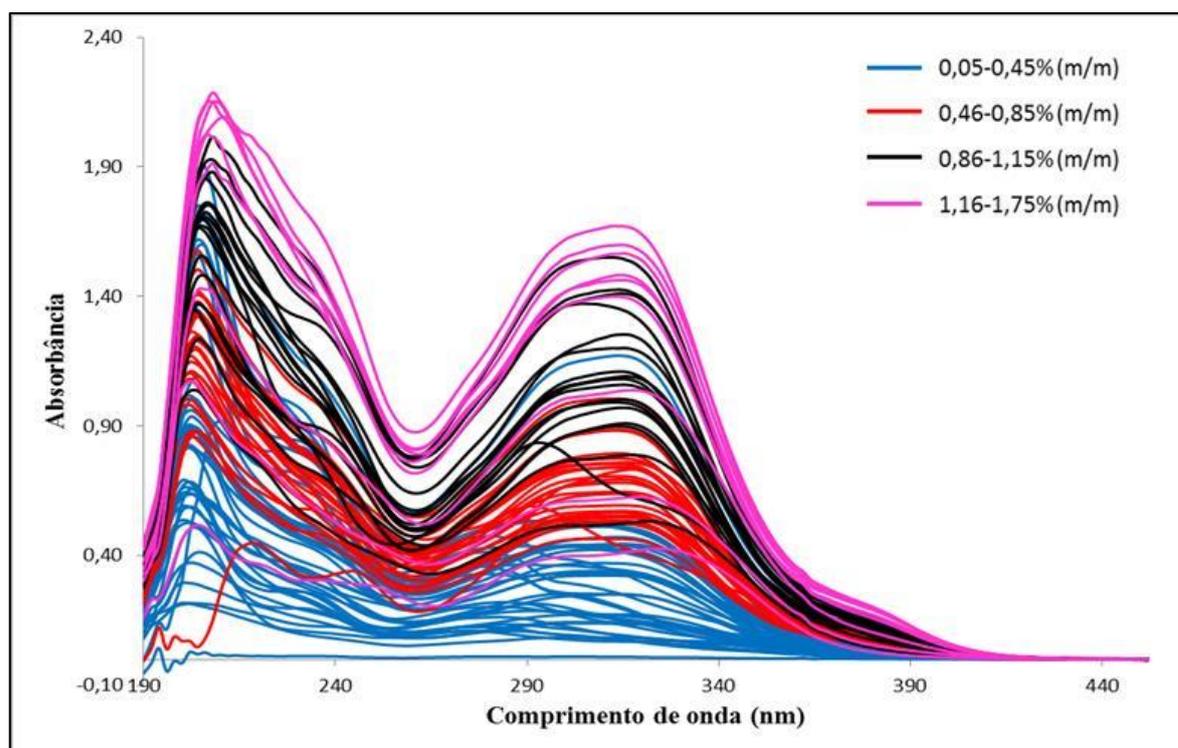


Figura 30: Espectros de absorção na região UV-Vis das amostras diluídas em etanol 95% utilizadas na construção do modelo

Segundo Pavia, pesquisadores notaram que as bandas primárias e secundárias nos espectros de compostos aromáticos polinucleares sofrem deslocamento batocrômico. Dessa forma, a banda primária que ocorre em 184 nm, e não é observada em condições experimentais normais, é deslocada para um comprimento de onda dentro do alcance da maior parte dos espectrofotômetros UV-Vis. [39]

Substituintes com elétrons não ligantes também podem causar deslocamentos nas bandas, devido ao fato desses elétrons aumentarem o comprimento de sistema π . Assim, quanto mais disponíveis esses elétrons estiverem para interagir com o sistema π , maiores serão os deslocamentos.

Devido ao fato dos compostos fenólicos serem hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, com substituintes que possuem elétrons não ligantes, ocorre deslocamento batocrômico das bandas primárias e secundárias.

Observando os espectros da Figura 30 percebe-se que a segunda banda primária que deveria ocorrer em 184 nm é deslocada para comprimentos da ordem de 206 nm. A banda que deveria ocorrer em 202 nm sofre um deslocamento batocrômico e é observada em torno de 240 nm. Outro comprimento de onda em que a banda é observada em todas amostras é o que

ocorre por volta de 310 nm, que corresponde ao deslocamento batocrômico da banda secundária de compostos aromáticos, que deveria ser visualizada em 255 nm.

Segundo o MAPA, os extratos alcoólicos de própolis devem apresentar bandas características entre 200 e 400 nm devido à presença dos compostos fenólicos. Todas as amostras analisadas estão de acordo com a legislação.

Na construção do modelo PLS quatro variáveis latentes foram escolhidas por apresentarem menor RMSECV. Essas quatro variáveis latentes explicaram 99,77% da variância em \mathbf{X} e 97,28% da variância em \mathbf{y} . Para a verificação dos *outliers* foi utilizada uma rotina proposta por Braga [74] e um total de 12 amostras foram consideradas *outliers*. Essa rotina considera como *outlier* amostras com alto *leverage*, que é uma medida da influência de uma amostra no modelo em comparação com o resto do conjunto de dados, e alto resíduo, que é uma medida da parte da informação da amostra que não foi modelada. Dessas 12 amostras uma foi retirada por apresentar alto *leverage*, duas por resíduo espectral e 9 por alto resíduo em \mathbf{y} , todas do conjunto de calibração. Segundo Botelho et. al. [83], o fato da maioria dos *outliers* ter sido detectada com base nos altos resíduos em \mathbf{y} é um indicativo de problemas nos valores obtidos pelo método de referência. Uma possível causa desse problema é o pequeno volume de extrato (20 μL) que é utilizado nas análises. As amostras apresentam diferentes viscosidades e a transferência da alíquota das amostras mais viscosas é dificultada. Entretanto, verificou-se que volumes maiores que esse fazem com que a absorvância dos espectros seja muito maior que 1, provocando distorções. Outra possibilidade é a diferente composição das amostras. Como já foi falado anteriormente, o método do Al(III) é mais eficiente na complexação dos flavonoides do grupo das flavonas e flavonóis. Assim, podem estar presentes em algumas amostras flavonoides que não complexam tão eficientemente com o alumínio e para essas amostras os valores podem estar subestimados.

Os *outliers* que possuem alto *leverage* indicam amostras com composição muito diferentes, um problema que está relacionado com as diversas origens das amostras obtidas [83]. Como pode ser observado na Figura 26, algumas amostras apresentaram espectro bem diferentes das demais, o que indica que essas amostras realmente apresentam uma composição diferenciada. A diversidade botânica a que a abelha está exposta para a produção da própolis influencia na sua composição. Amostras com composição muito diferente das demais, acabam então sendo consideradas como *outliers*.

Na Figura 31 é possível analisar a contribuição de cada variável (comprimento de onda) na construção do modelo PLS através dos coeficientes de regressão. Os coeficientes de

regressão calculadas a partir de todos os pesos em todas as variáveis latentes utilizadas no modelo. É possível observar que os comprimentos de onda que mais contribuíram para o modelo foram 210, 240 e 330 nm que correspondem aos comprimentos de onda que são observados nas bandas dos espectros das amostras de própolis.

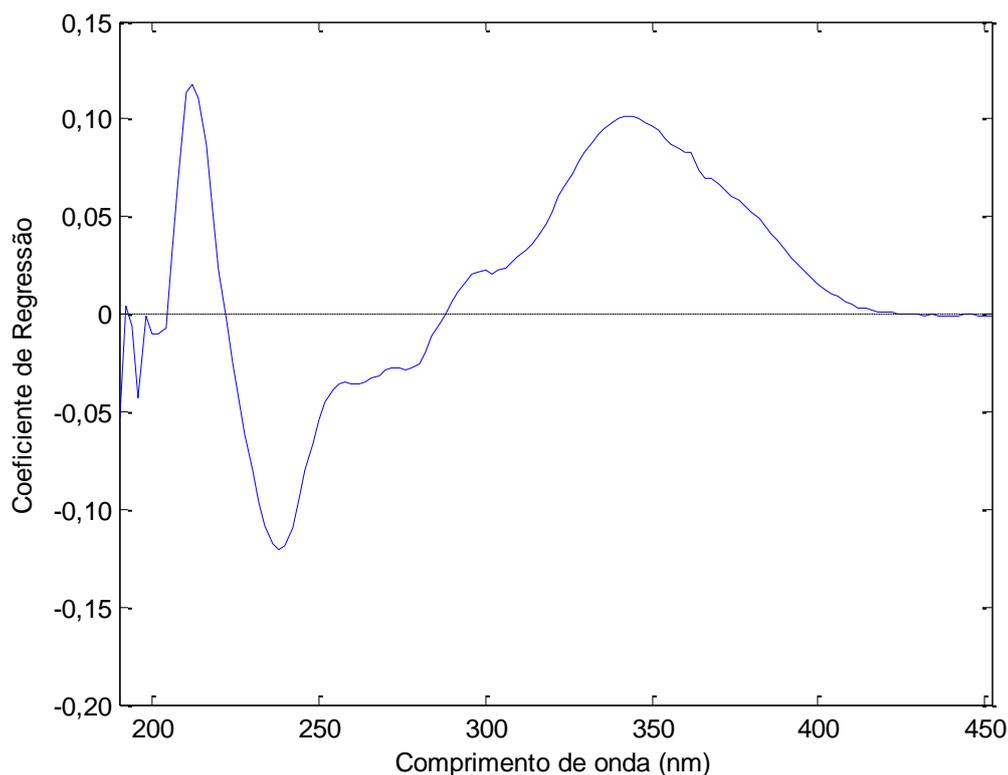


Figura 31: Coeficientes de regressão do modelo PLS

Para avaliar a linearidade do modelo plotou-se os resíduos em função da concentração de flavonoides prevista pelo modelo (Figura 32). Como pode ser observado, a distribuição dos resíduos das amostras de calibração e validação apresentam comportamento aleatório, demonstrando que o modelo é linear.

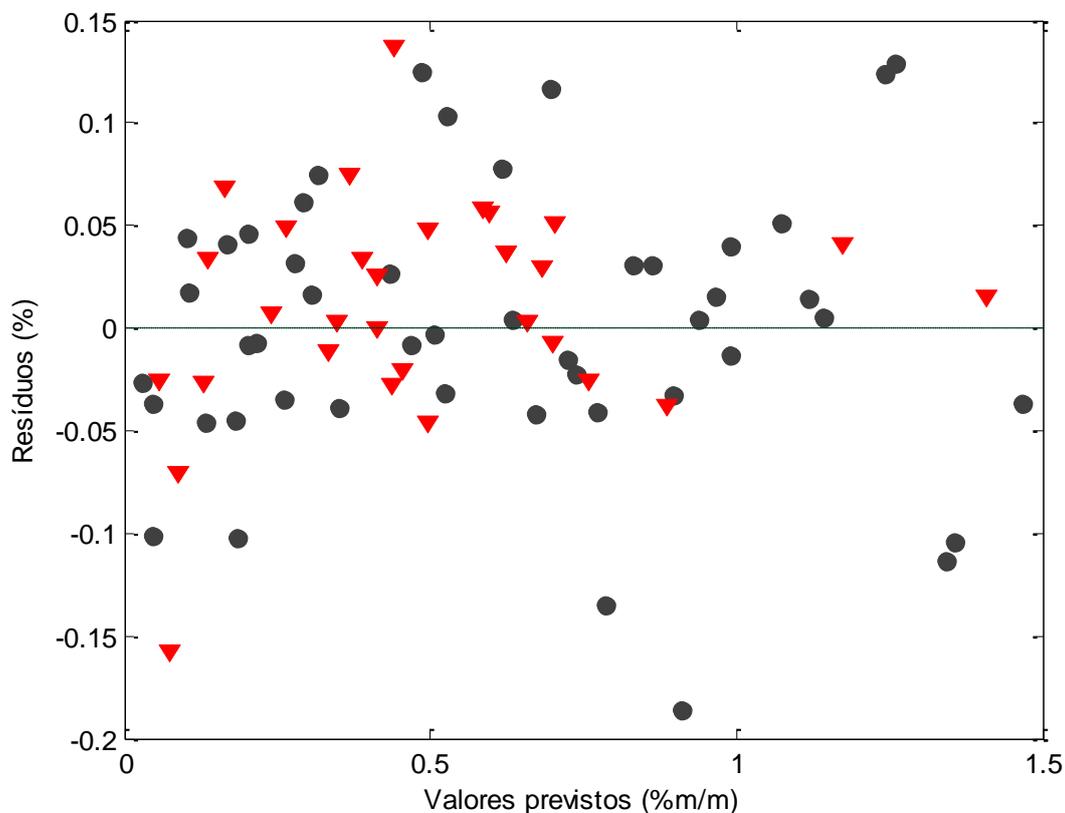


Figura 32: Gráfico de resíduos versus concentração de flavonoides determinado pelo método de referência.

(●) Amostras de calibração; (▼) Amostras de validação.

Construiu-se então o gráfico da concentração de flavonoides prevista pelo modelo PLS *versus* concentração de flavonoides determinada pelo método espectrofotométrico (Figura 33). Obteve-se para o modelo construído erro quadrático médio para o conjunto de calibração (RMSEC) igual a 0,067% (m/m) e para o conjunto de validação (RMSEP) um erro igual a 0,054% (m/m). Para avaliar o modelo também foi determinado o valor do coeficiente de determinação da curva que é igual a $R^2 = 0,9703$, demonstrando um bom ajuste.

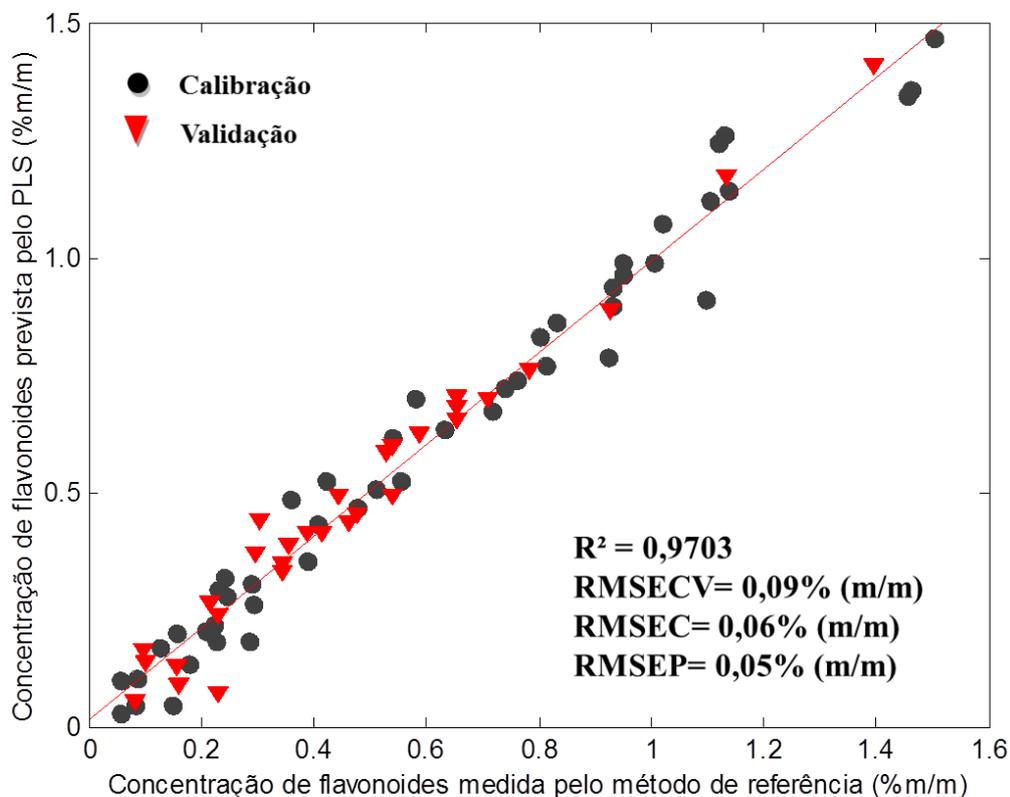


Figura 33: Valores da concentração de flavonoides prevista em função da concentração de flavonoides medida.

(●) Amostras de calibração; (▼) Amostras de validação.

O erro relativo médio do modelo em relação às amostras de validação foi de 11,0% e das amostras de calibração foi de 10,0%. A precisão do modelo foi avaliada em termos da repetitividade com Desvio Padrão Relativo (DPR) entre 1,38 e 2,25% e entre 2,40 e 3,72% para a precisão intermediária. Os valores estão de acordo com a legislação que estabelece limites máximos de 2,5% para a repetitividade e 3,7% para a precisão intermediária, considerando o nível de concentração do analito utilizado ($1 \text{ g/kg} \leq c < 10 \text{ g/kg}$). [84]

Através dos resultados obtidos na avaliação da linearidade, da precisão e exatidão do modelo, estabeleceu-se a faixa de trabalho de 0,03 a 1,47% (m/m). Na Tabela XVIII encontram-se as principais figuras de mérito calculadas para o modelo PLS construído nesse trabalho.

TABELA XVIII: Principais figuras de mérito para o modelo PLS

Figuras de mérito	Parâmetro	Valor
Exatidão	RMSECV	0,086% (m/m)
	RMSEC	0,067% (m/m)
	RMSEP	0,054% (m/m)
Precisão	DPR Repetitividade	2,25%
		1,38%
		1,44%
	DPR precisão intermediária	-
		3,72%
		2,40%
Regressão	Coefficiente de Determinação	0,9703
Faixa de Trabalho	-	0,03-1,47% (m/m)

Em estudo recente, Cai et. al. utilizaram espectroscopia no infravermelho próximo para obter o espectro de 180 amostras de própolis bruta originárias da China, e a concentração de flavonoides nas amostras obtida por HPLC, para a construção de um modelo PLS. Para o modelo construído usando a quercetina como padrão o autor obteve um erro médio de 11,4% para o conjunto de validação. Os erros neste trabalho e no de Cai, foram bem próximos, entretanto o método espectrofotométrico é muito mais rápido e simples que o método cromatográfico utilizado pelo autor. [85]

3.4 Conclusão

As condições cromatográficas utilizadas para a obtenção dos cromatogramas dos extratos alcoólicos de própolis se mostraram muito eficazes, sendo possível obter uma maior separação e resolução dos picos.

O modelo PLS proposto para a determinação da concentração de flavonoides nas amostras de extratos comerciais de própolis mostrou ser uma alternativa eficaz em relação ao

método espectrofotométrico. Além de o método espectrofotométrico ser trabalhoso e utilizar uma grande quantidade de reagentes, somente após uma hora pode ser feita a leitura da absorvância das soluções. No modelo quimiométrico, somente é necessário a obtenção do espectro da amostra diluída em etanol, sendo um método muito mais rápido, além de não ser necessário o uso de diversos reagentes e solventes, principalmente o metanol que é tóxico. Assim, o modelo construído nesse trabalho pode ser utilizado em laboratórios de análise de rotina como um método simples para a quantificação da concentração de flavonoides nas amostras de própolis.

4. UTILIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE ALUMÍNIO E PLS-DA PARA A DISCRIMINAÇÃO DE EXTRATOS COMERCIAIS DE PRÓPOLIS

Devido à diversidade da flora regional, a própolis brasileira possui uma composição química bem complexa, o que reflete em suas propriedades biológicas diferenciadas. A alta concentração de compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonoides) faz com que ela seja de grande interesse para o mercado internacional, principalmente o asiático.

Amostras de própolis com diferentes origens geográficas possuem diferentes tipos de compostos fenólicos e em diferentes concentrações. Muitos dessas substâncias possuem propriedades farmacológicas diferenciadas, como o artemillin C, e a presença dessas substâncias na própolis agrega valor econômico ao produto. [22, 86;87]

Além disso, a variabilidade química da própolis torna-se um problema para sua padronização. Trabalhar com materiais padronizados é importante, pois permite que os pesquisadores consigam conectar uma determinada composição química da própolis com um tipo específico de propriedade biológica e assim formular recomendações do uso do produto, o que iria ajudar o público em geral a fazer um uso mais eficiente das propriedades benéficas da própolis. [88]

Dessa forma, a discriminação da própolis quanto ao conteúdo em compostos fenólicos e, conseqüentemente, quanto à origem geográfica, é de grande importância para a previsão de suas propriedades biológicas. Neste trabalho aproveitam-se os espectros UV-Vis dos complexos formados entre os flavonoides e o Al(III), que são obtidos na análise de rotina de determinação da concentração de flavonoides nas amostras comerciais de própolis, para a construção de um modelo de classificação supervisionada para discriminar as amostras de acordo com os tipos de flavonoides, utilizando o PLS-DA.

4.1 Materiais e Métodos

4.1.1 Amostras

Foram estudadas 78 amostras de extratos alcoólicos de própolis de diferentes estados do país, adquiridas no comércio ou doadas pelos produtores. As amostras foram nomeadas como comum (C) e verde (V) de acordo com as informações no rótulo. Aquelas que não tinham informação sobre o tipo na embalagem foram classificadas como comum. Antes de

serem submetidas a análise, uma alíquota das amostras foi centrifugada a 3000 rpm por cinco minutos. Algumas amostras apresentaram formação de corpo de fundo. Somente o sobrenadante dessas amostras foi utilizado para a quantificação.

4.1.2 Reagentes

Para o preparo das soluções da metodologia colorimétrica para a quantificação dos flavonoides, utilizou-se metanol PA da marca Synth, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ da Sigma-Aldrich e CH_3COOLi da marca VETEC.

Nos estudos cromatográficos os seguintes padrões de flavonoides e ácidos fenólicos foram investigados: ácido p-cumárico, quercetina, pinocembrina, crisina, ácido cinâmico, ácido ferúlico, kaempferol, acacetina, naringenina e galangina, todos da Sigma-Aldrich e de grau cromatográfico. Para o preparo a diluição das amostras e preparo das soluções dos padrões foi utilizado metanol de grau cromatográfico da marca J. T. Baker. Para o preparo das fases móveis, além do metanol, foi utilizado 2-propanol da J. T. Baker, acetonitrila da marca CRQ e ácido acético da marca VETEC. Para diluição dos extratos de própolis utilizou-se etanol VETEC de grau HPLC.

4.1.3 Metodologia espectrofotométrica

Nesse trabalho foram utilizados os espectros eletrônicos dos complexos de $\text{Al}(\text{III})$ obtidos para a determinação da concentração de flavonoides nas amostras pelo método espectrofotométrico, conforme descrito no item 3.1.3.

4.1.4 Metodologia cromatográfica

Para a análise cromatográfica foram separadas 40 amostras representativas dos grupos observados no PLS-DA. As amostras foram diluídas 80 vezes em etanol 75% (m/v) e filtradas em filtro de seringa Milipore de 0,21 μm de poro antes da injeção no HPLC.

Para o preparo das soluções dos padrões, obteve-se inicialmente soluções estoque dos padrões de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para isso, foram pesados 1 mg de cada padrão que foi transferido para um balão volumétrico de 5 mL. O volume dos balões foi completado com metanol. A

partir das soluções estoque foram preparadas soluções de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para o preparo dessas soluções transferiu-se $250 \mu\text{L}$ da solução estoque para um balão de 5 mL e completou-se o volume com metanol. Também foi preparado um *pool* adicionando-se $250 \mu\text{L}$ de todos os padrões em uma balão volumétrico de 5 mL e completando-se o volume do balão com metanol.

4.1.5 Análise Quimiométrica

O programa Matlab R2009b e o pacote PLS_Toolbox-522 foram usados para o tratamento quimiométrico dos dados obtidos.

Com os espectros construiu-se a matriz de dados e realizou-se, primeiramente, uma Análise de Componentes Principais (PCA). Os espectros tiveram a linha base corrigida utilizando o algoritmo *baseline* do PLS_Toolbox. Os dados foram centrados na média e utilizou-se o alisamento para reduzir o ruído nos espectros. A partir análise do PCA as amostras foram separadas em quatro grupos e essa informação foi utilizada para a construção do vetor \mathbf{y} do PLS-DA.

Para a construção do PLS-DA as amostras foram separadas em um conjunto de calibração e outro de validação, utilizando o algoritmo de Kennard-Stone [73], sendo que $2/3$ das amostras (52 amostras) foram utilizadas para a calibração e $1/3$ (26 amostras) para a validação do modelo.

O pré-processamento utilizado foi centrar os dados na média e alisamento (Savitsky-Golay) [89]. O método de validação cruzada foi o dos blocos contínuos (do inglês, *Contiguous Blocks*).

Para a verificação de possíveis *outliers* utilizou-se o gráfico de QxT^2 de *Hotelling*, sendo que as amostras consideradas anômalas foram retiradas do modelo.

4.2 Resultados e Discussão

4.2.1 Construção do modelo PLS-DA

Os espectros de absorção na região UV-Vis obtidos para as amostras pelo método espectrofotométrico podem ser visualizados na Figura 34.

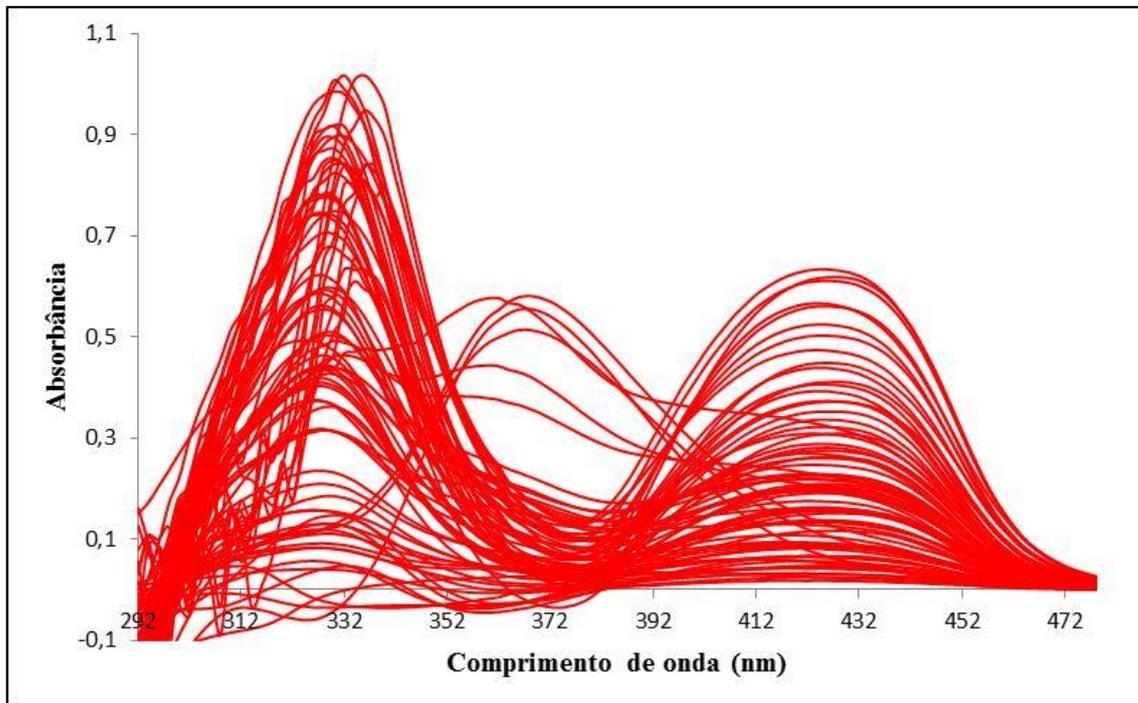
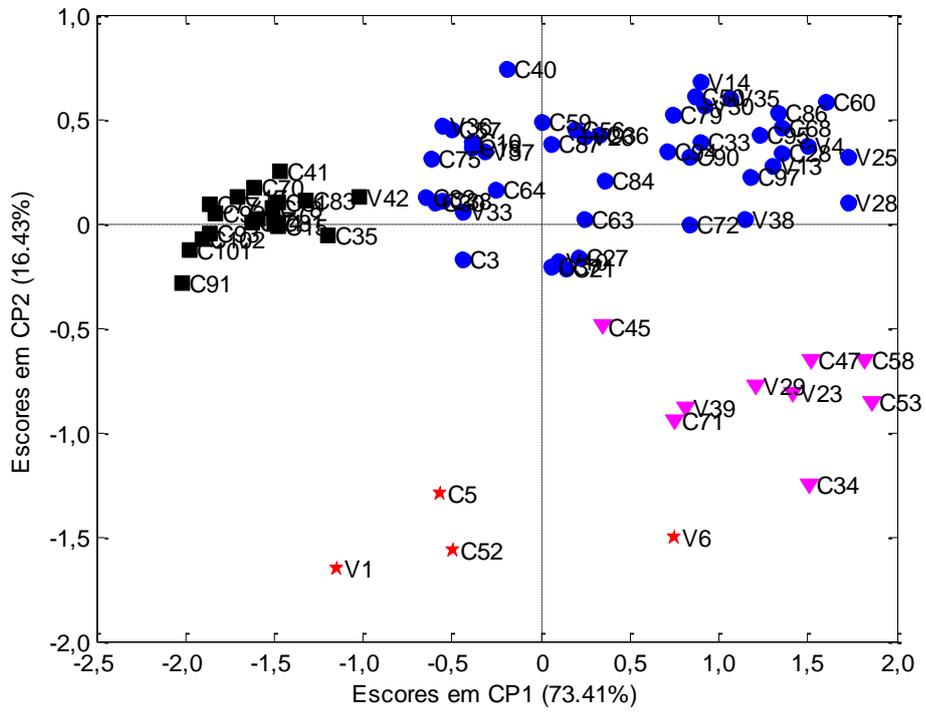


Figura 34: Espectros das amostras de extrato de própolis na presença de Al(III)

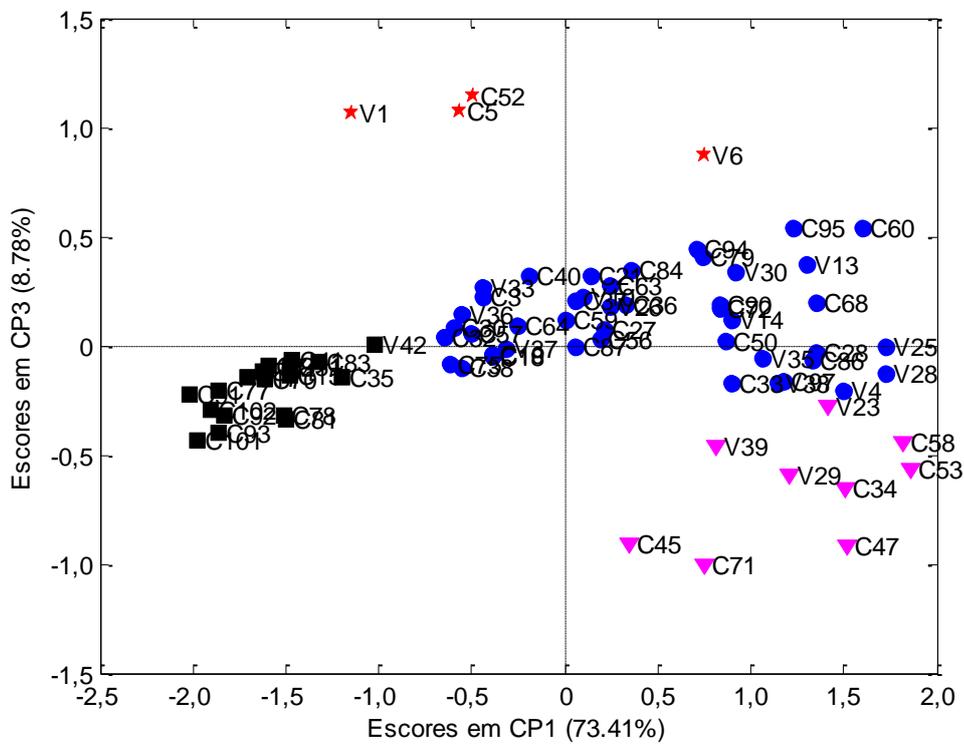
O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonoides em metanol, ocorrendo desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção em relação ao espectro do flavonoide sem a presença do alumínio. Dessa forma, é possível determinar a concentração de flavonoides, evitando-se a interferência de outros compostos fenólicos, como os ácidos fenólicos. Os ácidos fenólicos que formam complexos absorvem em comprimentos de onda muito inferiores.

Inicialmente, foi realizada com esses espectros uma análise por componentes principais com o objetivo de visualizar uma possível separação entre as amostras. Essa PCA foi construída com 78 amostras. Foi possível observar que havia a separação das amostras em quatro grupos. Através da análise do gráfico de $Q \times T^2$ de *Hotelling* para 95% de confiança, amostras com alto resíduo e altos valores de T^2 (alta influência no modelo) foram consideradas *outliers*. Assim, foram removidas três amostras e construiu-se uma nova PCA.

Na nova PCA foram utilizadas três componentes principais que explicaram 98,62% da variância. Na Figura 35 é possível visualizar os quatro grupos em que as amostras se separaram.



(a)



(b)

Figura 35: Escores do modelo PCA. (a) CP1 vs CP2 (b) CP1 vs CP3

Na Figura 36 pode-se observar os espectros das amostras separadas de acordo com os grupos observados na PCA e a Figura 37 mostra o gráfico dos pesos das componentes principais que foram utilizadas no modelo, demonstrando a influência de cada variável (comprimento de onda) na separação das amostras.

É possível perceber que os pesos na primeira componente principal se assemelham aos espectros das classes 1, 3 e 4. Os comprimentos de onda importantes na separação foram os por volta de 330 e 430 nm. Os pesos em CP2 se assemelham aos espectros da classe 2, e o comprimento de onda que mais influencia nessa separação é o por volta de 370 nm. Também é possível perceber pela análise da Figura 36 que os espectros das amostras pertencentes a classe 4 apresentam um desvio hipsocrômico da banda II. O comprimento de onda máximo dessa banda, em torno de 310 nm, contribui negativamente para a separação em CP2. Observando os pesos em CP3 pode-se perceber a contribuição dos comprimentos de onda em 310 e 370 nm que influenciam positivamente, enquanto que em 430 nm influencia negativamente.

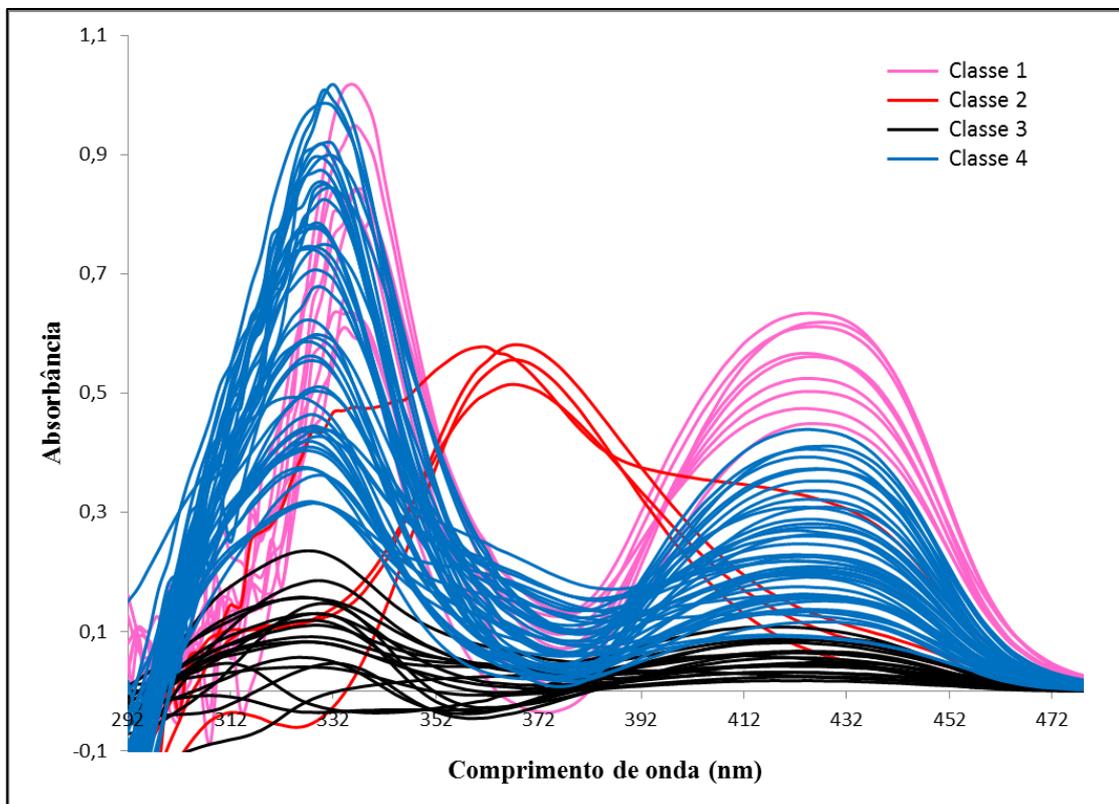


Figura 36: Espectros das amostras separados de acordo com as classes observadas no PCA

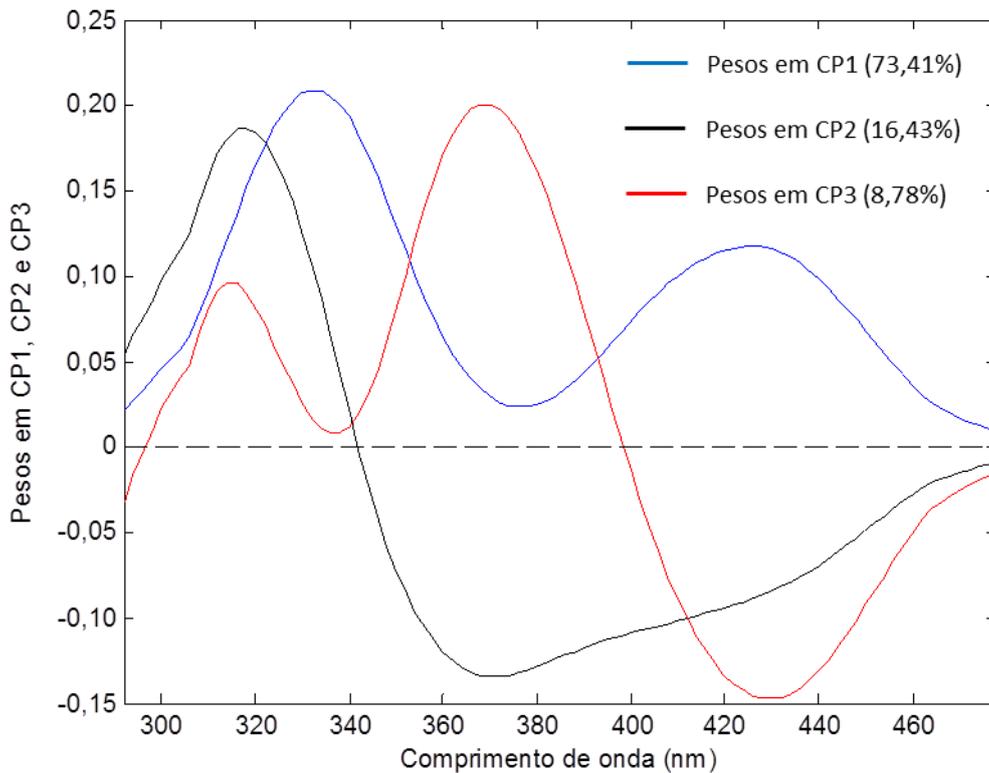


Figura 37: Gráfico dos pesos em CP1, CP2 e CP3 para o modelo PCA.

As informações obtidas dessa PCA foram utilizadas para a construção do vetor y do PLS-DA. As amostras do conjunto de calibração (52) e validação (26) foram escolhidas utilizando o algoritmo de Kennard-Stone [73]. O melhor modelo foi construído com 3 variáveis latentes, que explicaram 98,47% em X e 79,39% em Y . O número de variáveis latentes foi escolhido baseado no menor valor para o RMSECV. A Tabela XIX apresenta a variância acumulada para as 3 variáveis latentes.

TABELA XIX: Porcentagens de variância explicada pelo modelo PLS-DA

Variável Latente (VL)	Bloco X		Bloco Y	
	VL (%)	Variância Acumulada (%)	VL (%)	Variância Acumulada (%)
1	72,87	72,87	27,50	27,50
2	16,03	88,91	28,61	56,11
3	9,57	98,47	23,27	79,39

Foram calculadas então a sensibilidade e a especificidade do modelo. A sensibilidade corresponde ao número de amostras previstas como sendo da classe, dividido pelo número de amostras presentes de fato na classe. Já a especificidade é calculada dividindo o número de amostras corretamente previstas como não pertencentes à classe pelo número de amostras que realmente não pertencem. Na Tabela XX podem ser vistos os parâmetros de qualidade para o modelo, sendo que houve 100% de acerto na previsão das amostras das classes 1, 2 e 3. Para a classe 4 houve um acerto de 96%.

TABELA XX: Sensibilidade e Especificidade do modelo PLS-DA

Parâmetro	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Sensibilidade (calibração)	1,000	1,000	1,000	0,966
Especificidade (calibração)	1,000	1,000	1,000	1,000
Sensibilidade (previsão)	1,000	1,000	1,000	0,956
Especificidade (previsão)	1,000	1,000	1,000	1,000

Na Figura 38 tem-se as amostras previstas para as quatro classes. As amostras com símbolos cheios correspondem as amostras de validação, enquanto que as amostras com símbolo vazio são as amostras de validação.

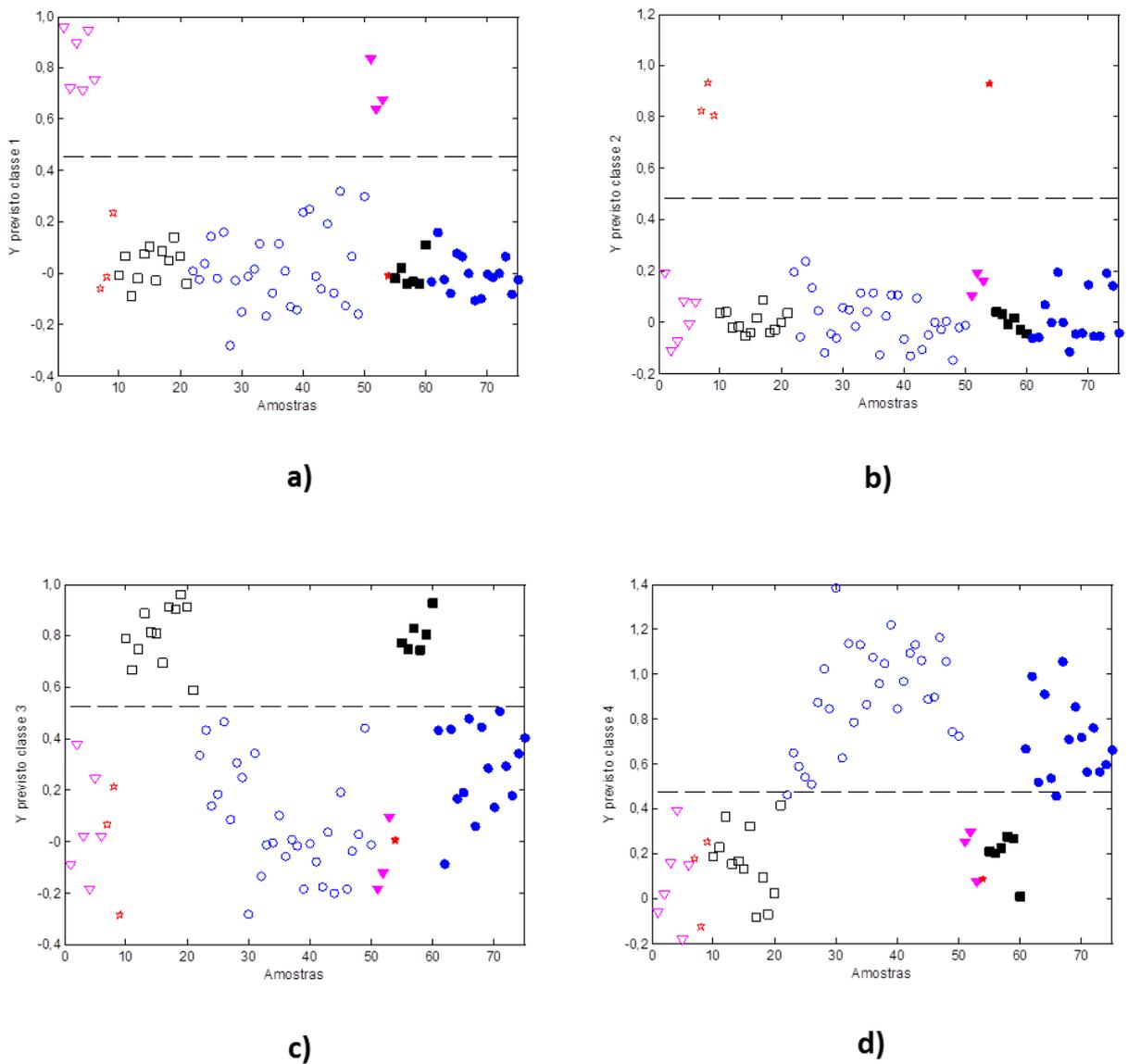


Figura 38: Amostras classificadas pelo modelo PLS-DA. Os símbolos cheios correspondem às amostras de validação, os símbolos vazios às de calibração. (a) Classe 1 (b) Classe 2 (c) Classe 3 (d) Classe 4

A Figura 39 mostra os gráficos dos coeficientes de regressão para cada classe do modelo. Pela análise deste gráfico é possível verificar que os comprimentos de onda responsáveis pelas separações foram os mesmos verificados no PCA, que são 310, 330, 370 e 430 nm.

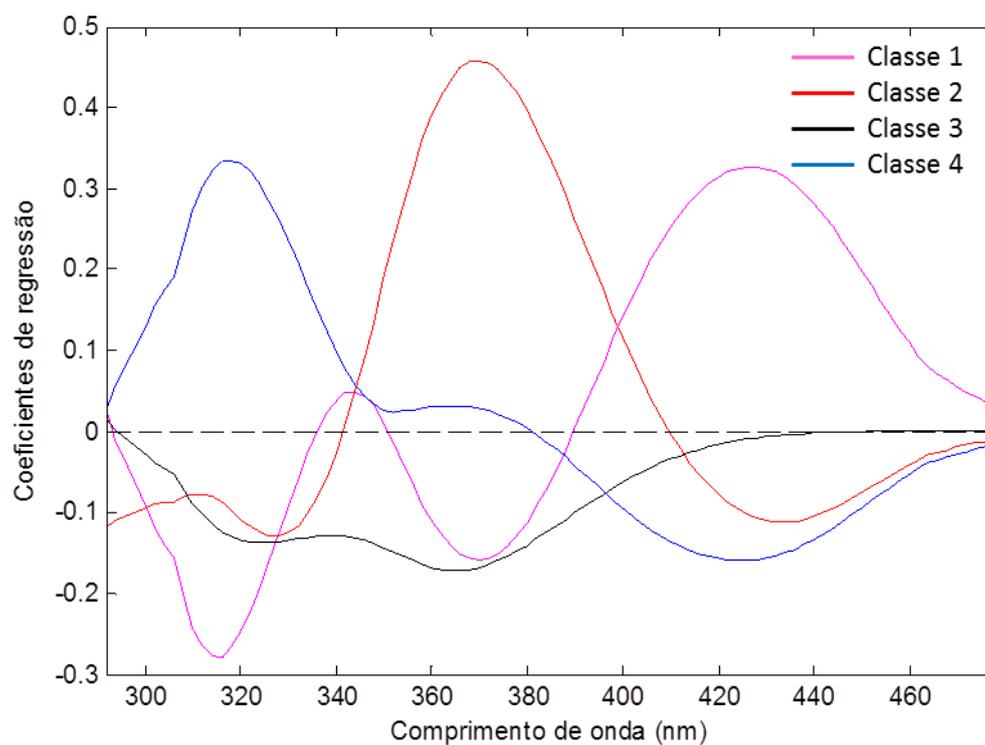


Figura 39: Coeficientes de regressão para o modelo PLS-DA.

Para explicar melhor a separação das amostras nessas classes, amostras representativas de cada classe foram analisadas por HPLC. Na Figura 40 pode-se observar o cromatograma de quatro amostras que foram selecionadas de cada classe.

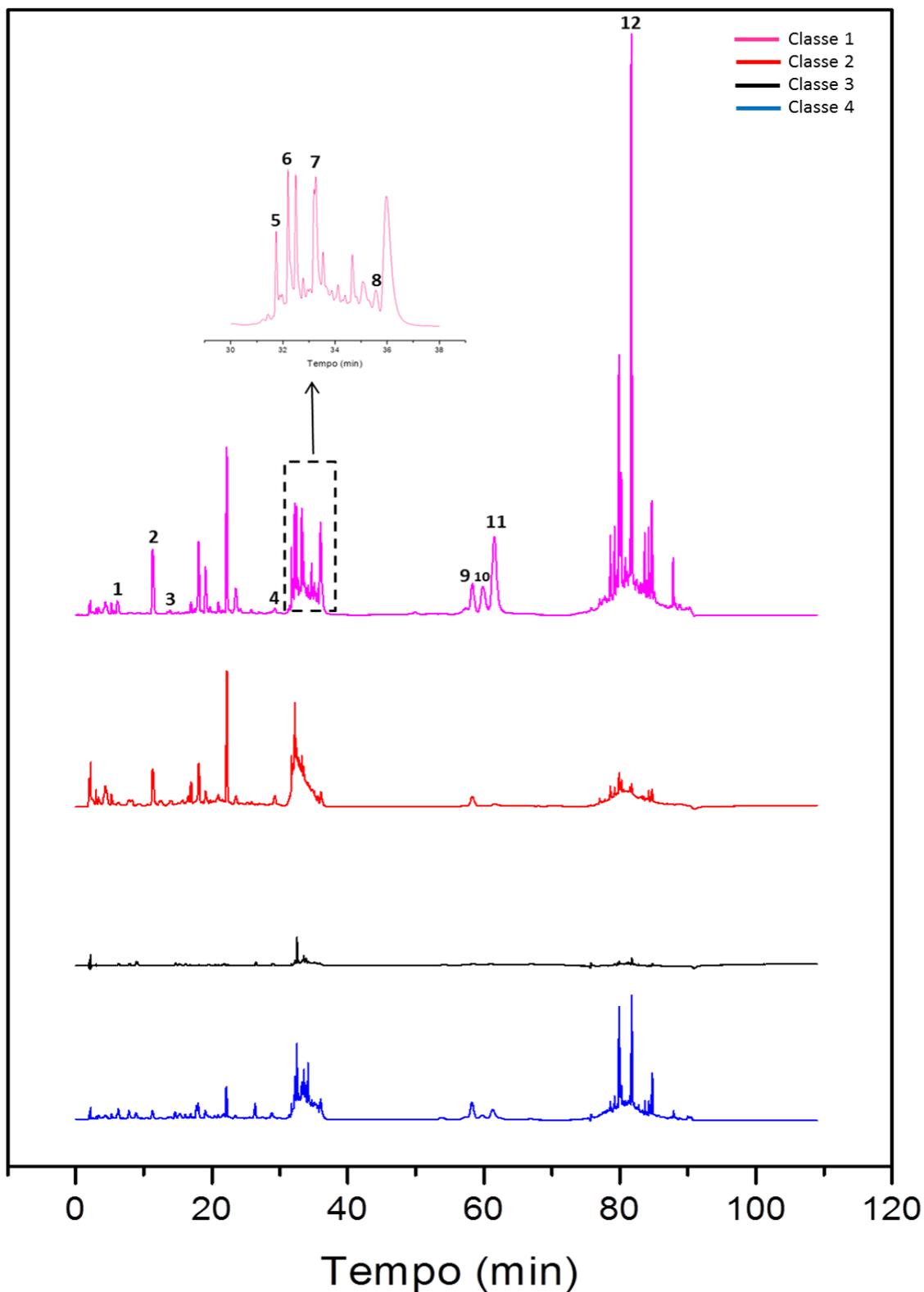


Figura 40: Cromatograma de amostras representativas das classes observadas no PLS-DA. 1) ácido caféico 2) ácido p-cumárico 3) ácido ferúlico 4) ácido cinâmico 5) quercetina 6) naringenina 7) kaempferol 8) pinocembrina 9) crisina 10) acetina 11) galangina 12) artepillin C.

Como pode ser observado na Figura 37, as amostras que pertencem à classe 1 são as que apresentam uma maior quantidade e concentração dos compostos fenólicos. Essas amostras possuem uma concentração bem alta de artepillin C, que é relatado na literatura como o composto fenólico majoritário da própolis verde. Na literatura existem vários estudos sobre o artepillin C, mostrando que ele possui diversas propriedades biológicas como ação antitumoral, antioxidante, antiinflamatória, antibacteriana, prevenindo assim várias doenças. [22, 80, 86;87, 90]

As amostras pertencentes à classe 2, além de possuírem um espectro bem diferenciado dos demais, com uma única banda em torno de 370 nm, possuem uma concentração de ácidos fenólicos maior do que as amostras pertencentes às demais classes. As amostras pertencentes a essa classe praticamente não possuem derivados prenilados do ácido p-cumárico e o artepillin C. Além disso, elas não possuem em sua composição a acacetina e galangina.

Já as amostras pertencentes à classe 3 mostraram não possuírem concentrações consideráveis de compostos fenólicos. Ao analisar as amostras pertencentes a esse grupo notou-se que 61% dessas amostras pertencem à região sul. Diante desse resultado, verificou-se os resultados obtidos na determinação da concentração de flavonoides das amostras de própolis e foi possível perceber que das 16 amostras do sul que foram utilizadas nesses trabalhos, 11 foram consideradas irregulares quanto à concentração de flavonoides, cujo mínimo exigido por lei é 0,25% (m/m). Além disso, foi possível notar que somente uma amostra pertencente à classe 3 não é irregular, mesmo assim sendo essa amostra da região sul e possuindo uma concentração de flavonoides baixa (0,29% m/m).

A composição química da própolis é dependente da localização geográfica, estando assim a atividade biológica intimamente relacionada com a a ecologia vegetal da região visitada pelas abelhas. A própolis brasileira se destaca por possuir diversas propriedades biológicas, e essa característica é atribuída à diversidade botânica do país . Entretanto, no sul do país as abelhas utilizam principalmente as plantas da espécie *Populus alba* para a produção da própolis, o que faz com que sua composição se assemelhe mais às própolis da Europa, América do Norte e Ásia Ocidental. Devido a isso, essas amostras apresentaram baixa composição de compostos fenólicos e o emprego dessas amostras com propósitos farmacológicos deve ser melhor avaliado. [1;2,17]

As amostras pertencentes à classe 4 possuem todos os compostos fenólicos que estão presentes nas amostras da classe 1, mas em concentrações muito mais baixas, principalmente dos ácidos fenólicos, que são praticamente ausentes.

4.2.2 Conclusão

O modelo proposto foi capaz de classificar as amostras de acordo com o tipo e concentração de compostos fenólicos com um acerto de 100% para as classes 1, 2 e 3, e com um acerto de 96% para a classe 4.

Os comprimentos de onda responsáveis pelas separações nas classes foram 310, 330 e 430 nm, comprimentos de onda típicos dos espectros dos complexos formados entre os flavonoides e o Al(III), e 370 nm, que é o comprimento de onda dos complexos formados entre os ácidos fenólicos e o Al(III).

A determinação de quais são os compostos fenólicos presentes nas amostras de extrato alcoólico de própolis e quais dessas amostras possuem maior concentração dessas substâncias é de grande importância, pois a presença e concentração delas estão ligadas às propriedades biológicas conferidas à própolis. Dessa forma, o modelo PLS-DA pode ser utilizado como uma ferramenta rápida para a identificação de amostras com maior valor agregado. Além disso, o modelo foi capaz de prever quais amostras eram irregulares quanto a concentração de flavonoides e pode ser utilizado na rotina como uma ferramenta de *screening* para identificar quais são essas amostras.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A importância econômica da própolis no Brasil tem crescido significativamente, devido a isso surge a necessidade de um controle mais rígido que garanta a qualidade do produto e do desenvolvimento de metodologias mais adequadas para o controle de qualidade.

Neste trabalho, metodologias quimiométricas juntamente com metodologias espectrofotométricas foram desenvolvidas para a avaliação de parâmetros de qualidade dos extratos comerciais de própolis.

A concentração de flavonoides nas amostras de extrato alcoólico de própolis foi determinada através do método espectrofotométrico, que é baseado na formação de complexos entre os flavonoides e o alumínio, e por cromatografia. O grande diferencial desse trabalho é que as condições foram ajustadas para a quantificação dos flavonoides nos extratos comerciais, enquanto que na maioria dos outros estudos são analisados extratos preparados a partir da própolis bruta e, portanto, de concentração conhecida.

As condições cromatográficas desenvolvidas nesse trabalho se mostraram muito eficazes, obtendo-se uma boa separação e resolução dos compostos. As concentrações de flavonoides obtidas pelo método espectrofotométrico e por HPLC foram comparadas utilizando o teste t pareado e chegou-se a conclusão de que os resultados obtidos pelas duas metodologias, para a maioria das amostras, são estatisticamente iguais. Cerca de 20% das amostras apresentaram resultados diferentes pelos dois métodos. Um maior número de replicatas será obtido futuramente para ter-se maior confiabilidade nos resultados.

Das 97 amostras analisadas pelo método espectrofotométrico, 27% foram consideradas irregulares por terem menos que 0,25% (m/m) de flavonoides, que é o mínimo recomendado pelo MAPA. Como a concentração de flavonoides está diretamente ligada às propriedades biológicas da própolis, esse é um valor muito alto, mostrando assim a necessidade de um controle de qualidade mais rigoroso em relação aos extratos alcoólicos comerciais de própolis. A garantia de que a concentração de flavonoides está de acordo com o estabelecido pelo MAPA é muito importante, pois o produto é utilizado para fins terapêuticos pela população, assim é possível assegurar que a própolis será eficiente para combater diversas doenças, agregando valor ao produto brasileiro.

A composição química da própolis está diretamente ligada à diversidade da flora regional. A própolis brasileira é reconhecida internacionalmente, principalmente a própolis proveniente da região sudeste, por possuir alta concentração de compostos fenólicos.

Entretanto, a própolis proveniente da região sul mostrou possuir características diferentes das demais. Das 16 amostras de própolis proveniente da região sul, 11 foram consideradas irregulares por possuírem concentração de flavonoides abaixo do limite estipulado pela legislação, mostrando assim que há a necessidade de um melhor controle dos extratos comerciais de própolis provenientes dessa região.

O método de calibração multivariada PLS que foi desenvolvido para a determinação da concentração de flavonoides nas amostras comerciais de extrato alcoólico de própolis se mostrou muito eficaz. O modelo PLS apresentou bom valor de coeficiente de correlação. A metodologia proposta nesse estudo tem a vantagem de ser mais rápida do que a metodologia colorimétrica, menos laboriosa e envolver menos reagentes. Sendo assim, ela pode ser executada em análises de rotina para o controle de qualidade desses produtos.

O modelo PLS-DA proposto conseguiu classificar as amostras de acordo com a composição fenólica com um acerto de 100% para as classes 1, 2 e 3, e 96% para a classe 4. A determinação da composição fenólica dessas amostras é importante tanto do ponto de vista econômico quanto biológico. Aquelas que possuem maior concentração e quantidade dessas substâncias são mais valorizadas no mercado nacional, e principalmente internacional, pois possuem propriedades biológicas diferenciadas. Um exemplo são as amostras que foram classificadas na classe 1, que além de possuir no geral uma alta quantidade e concentração de compostos fenólicos, se destacam pela concentração elevada de artepillin C que mostrou em vários estudos possuir diversas atividades biológicas. Além de classificar as amostras quanto à composição e concentração dos compostos fenólicos, uma das classes observadas no modelo é constituída de amostras consideradas irregulares quanto à concentração de flavonoides. Assim, esse modelo é útil não somente para determinar quais são os principais compostos fenólicos presentes nas amostras (o que é normalmente feito através de métodos cromatográficos, que são caros e demandam muito tempo), mas também para identificar quais amostras são irregulares.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] PARK, Yong K.; ALENCAR, Severino M. ; AGUIAR, Claudio L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, p. 2502-2506, 2002.
- [2] TORETI, Viviane Cristina et. al. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- [3] SALANTINO, Antonio et. al. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2, p. 33-38, 2005.
- [4] RIGHI, Adne Abbud. Perfil químico de amostras de própolis Brasileiras. 2008. 102f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências. Departamento de Botânica, São Paulo.
- [5] DUTRA, Richard Pereira. Características físico-químicas do geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (Tiúba) produzido no estado do Maranhão. 2006. 69f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís.
- [6] CASTALDO, Stefano; CAPASSO, Francesco. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, vol. 73, p. 171-178, 2006.
- [7] LUSTOSA, Sarah R et. al. Própolis: atualizações sobre a química e farmacologia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 18, p. 447-454, 2008.
- [8] SILVA, Caroline Cristina Fernandes da. Análise química e atividades antioxidante e citotóxica de amostras de própolis de alecrim. 2008. 110f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, São Paulo.
- [9] PEREIRA, Alberto dos Santos; SEIXAS, Fernando Rodrigues Mathias Silva; NETO, Francisco Radler de Aquino. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova*, vol. 25,p.321-326, 2002.

-
- [10] CABRAL, Ingridy Simone Ribeiro. Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira. 2008. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.
- [11] FUNARI, Cristiano S.; FERRO, Vicente O. Análise de própolis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, vol. 26, n.1, p. 171-178, 2006.
- [12] BANSKOTA, Arjun H.; TEZUKA, Yasuhiro; KADOTA, Shigetoshi. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*, vol. 15, p. 561-571, 2001.
- [13] SANTOS, F. A et. al. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 80, p. 1-7, 2002.
- [14] PAULINO, Niraldo et. al. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. *European Journal of Pharmacology*, vol. 587, p. 296-301, 2008.
- [15] PIERCE, Clemente H. Composition for treating piano pins and strings. Patente dos EUA 767499, 16 de Agosto de 1904.
- [16] SEBRAE. Boletim : O Mercado da própolis. <http://www.sebrae2014.com.br> – acessado em 11/12/13.
- [17] CASTRO, Myrella Léssio; CURY, Jaime Aparecido; ROSALEN, Pedro Luiz. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Química Nova*, vol. 30, n.37, p. 1512-1516, 2007.
- [18] MACHADO, Joleen Lopes et. al. Brazilian green propolis: anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- [19] CONAP –Cooperativa Nacional de Apicultura. Conap estimulará a produção de própolis em 2013. <http://conapis.com.br/conap-estimulara-a-producao-de-propolis-em-2013/> - acessado em 11/12/13.

-
- [20] SIMÕES-AMBROSIO, L. M. C. et. al. The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. *Fitoterapia*, vol. 81, p. 1102-1108, 2010.
- [21] FERNANDES-SILVA, Caroline C. et. al. Chemical profiling of six samples of Brazilian propolis. *Química Nova*, vol. 36, p. 237-240, 2013.
- [22] TRUSHEVA, Boryana et. al. Bioactive constituents of Brazilian red-propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 3, p. 249-254, 2006.
- [23] CABRAL, Ingridy Simone Ribeiro et. al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Química Nova*, vol.32, p. 1523-1527, 2009.
- [24] LONGHINI, Renata et. al. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 17, p. 388-395, 2007.
- [25] PIETTA, P. G.; GARDANA, C.; PIETTA, A. M. Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia*, vol. 73, p. s7-s20, 2002.
- [26] PEÑA, Raúl. Propolis standardization: a chemical and biological review. *Ciencia e Investigación Agraria.*, vol. 35, p. 11-20, 2008.
- [27] SAWAYA, Alexandra Christine Frankland; CUNHA, Ildenize Barbosa da Silva; MARCUCCI, Maria Cristina. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chemistry Central Journal*, vol.5, p. 1-10, 2011.
- [28] SAWAYA, Alexandra C. H. F. et. al. Fingerprinting of propolis by easy ambiente sonic-spray ionization mass spectrometry. *Talanta*, vol. 81, p. 100-108, 2010.
- [29] GÓMEZ-CARAVACA, A. M. et. al. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 41, p. 1220-1234, 2006.
- [30] BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução normativa nº3, de 19 de Janeiro de 2001. Anexo VII, Regulamento da identidade e qualidade de extrato de própolis.

- [31] OLDONI, Tatiane L. Cadorin. Isolamento e identificação de compostos com atividade de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera*. 2007. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”.
- [32] BURIOL, Lilian. Extratos etanólicos e oleosos: quantificação e atividade biológica. 2008. 84f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava.
- [33] MALESEV, Dusan; KUNTIC, Vesna. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids *via* metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society*, vol. 72, p. 921-939, 2007.
- [34] HARBONE, Jeffrey B.; WILLIAMS, Christine A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, vol. 55, p. 481-504, 2000.
- [35] MARCUCCI, Maria Cristina; WOISKY, Ricardo Gomide; SALANTINO, Antonio. Uso do cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/46/artigo.htm> – acessado em 11/12/13.
- [36] STALIKAS, Constantine D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.*, vol. 30, p. 3268-3295, 2007.
- [37] LOPES, Renato Matos et. al. Flavonoides: Farmacologia de flavonoides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, p. 18-22. http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio17/17_f.pdf – acessado em 11/12/13.
- [38] NOLVACHAI, Yada; MARRIOTT, Philip J. GC for flavonoids analysis: past, current, and prospective trends. *J. Sep. Sci.*, vol. 36, p. 20-36, 2012.
- [39] PAVIA, Dona L. et. al. Introdução à espectroscopia. 4ªed. São Paulo. Cengage Learning. 2010, p. 365-398.
- [40] CHANG, R. Estudos químicos da própolis do estado de Minas Gerais. 2005. 130f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química. Belo Horizonte.

- [41] MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. The Systematic identification of flavonoids. Ed. Springer. Berlin, 1970, p.41-169.
- [42] FERREIRA, Márcia M. C. et. al. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. Química Nova, vol. 22, p. 724-731, 1999.
- [43] NETO, Benício de Barros; SCARMINIO, Ieda S.; BRUNS, Roy E. 25 anos de Quimiometria no Brasil. Química Nova, vol. 29, n.6, p. 1401-1406, 2006.
- [44] SEIDEL, Véronique et.al. Comparative study of the antibacterial of propolis from different geographical and climatic zones. Phytotherapy Research, vol. 22, p. 1256-1263, 2008.
- [45] LIMA, Beatriz et. al. Main flavonoids, DPPH activity, and metal content allow determination of the geographical origin of propolis from the province of San Juan (Argentina). Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 57, p. 2691-2698, 2009.
- [46] CANTARELLI, Miguel Ángelet. al. Trace mineral content of Argentinean raw propolis by neutron activation analysis (NAA): assessment of geographical provenance by chemometrics. LWT-Food Science and Technology, vol. 44, p. 256-260, 2011.
- [47] MARCUCCI, Maria Cristina et. al. Evaluation of phenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions. Zeitschrift für Naturforschung, vol. 55c, p. 76-81, 2000.
- [48] CORGOZINHO, Camila Nunes da Costa. Utilização de técnicas espectrofluorimétricas e quimiométricas na análise de biodiesel e de suas misturas com óleo diesel. 2009. 164f. Tese (Doutorado)- Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química. Belo Horizonte.
- [49] BRERETON, R. G. Chemometrics Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant. John Wiley and Sons, England, 2003.
- [50] LYRA, Wellington da Silva et. al. Classificação periódica: um exemplo didático para ensinar análise de componentes principais. Química Nova, vol. 33, p. 1594-1597, 2010.

[51] PAGANOTTI, Rosilene Silva Nascimento. Desenvolvimento de métodos analíticos para a análise de própolis utilizando técnicas espectrométricas e análise multivariada. 2013. 166f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química. Belo Horizonte.

[52] WOLD, Svant; SJÖSTRÖM, Michael; ERIKSSON, Lennart. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 58, p. 109-130, 2001.

[53] PATACA, Luiz Carlos Moutinho. Análises de mel e própolis utilizando métodos quimiométricos de classificação e calibração. 2006. 102f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas.

[54] MERKEN, Howard M.; BEECHER, Gary R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, 2000.

[55] AABY, Kjersti, HVATTUM, Erlend; SKREDE, Grete. Analysis of flavonoids and other phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection: relationship to antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, p. 4595-4603, 2004.

[56] SOUSA, João P. B. et. al. A reliable quantitative method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian propolis by reverse phase high performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, vol. 30, p. 2656-2665, 2007.

[57] POPOVA, Milena et. al. A validated spectrophotometric method for quantification of prenylated flavanones in pacific propolis from Taiwan. *Phytochemical Analysis*, vol. 21, p. 186-191, 2009.

[58] POPOVA, Milena et. al. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochemical Analysis*, vol. 15, 235-240, 2004.

[59] KUMAZAWA, Shigenori; HAMASAKA, Tomoko; NAKAYAMA, Tsutomu. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, vol. 84, p. 329-339, 2004.

-
- [60] PARK, Young K. et. al. Antimicrobial Activity of Propolis on Oral Microorganisms. *Current Microbiology*, vol. 36, p. 24-28, 1998.
- [61] BANKOVA, Vassya et. al. Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography*, vol. 607, p. 150-153, 1992.
- [62] MARKHAM, Kenneth R. et. al. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zeland propolis. *Phytochemistry*, vol. 42, nº1, p. 205-211, 1996.
- [63] POPOVA, M. et. al. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine*, vol. 12, p.221-228, 2005.
- [64] FERNÁNDEZ, Mercedes Campo et. al. GC-MS determination of isoflavonoids in seven red Cuban propolis samples. *J. Agric. FoodChem.*, vol. 56, p. 9927-9932, 2008.
- [65] MARGHITAS, L. Al. et al. Validated method for estimation of total flavonoids in Romanian propolis. *Bulletin USAMV-CN*, vol. 63, p. 63-64, 2007.
- [66] CHANG, Chia-chi et. al. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 10, n.3, p. 178-182, 2002.
- [67] CROCI, Anda Natanela et. al. Spectrofotometric determination of flavonic compouds from propolis. *Farmacia*, vol. 57, p. 104-108, 2009.
- [68] MELLO, Beatriz C. B. S.; PETRUS, José Carlos Cunha; HUBINGER, Mirian Dupas. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. *Journal of Food Engineering*, vol. 96, p. 533-539, 2010.
- [69] OLIVEIRA, Keily Alves de Moura Oliveira et. al. Atividade antimicrobiana e quantificação de flavonoides e fenóis totais em diferentes extratos de própolis. *Ciências Biológicas e da Saúde*, vol. 33, p. 211-222, 2012.
- [70] ALVES, Elizângela; KUBOTA, Ernesto Hashime. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, vol. 34, p. 37-41, 2013.

-
- [71] NUNES, L. C. C. et. al. Avaliação das propriedades físico-químicas e aspectos legais de extratos de própolis comercializados no mercado brasileiro. *Revista Brasileira de Farmácia.*, vol. 89, p.59-63, 2008.
- [72] SOUZA, E. A. et. al. Propriedade físico-química da própolis em função da sazonalidade e método de produção. *Archivos de Zootecnia*, vol.59, p. 571-576, 2010.
- [73] KENNARD R. W.; STONE L. A. Computer aided design of experiments. *Technometrics*, 11, p. 137-148, 1969.
- [74] VALDERRAMA, Patrícia; BRAGA, Jez Willian; POPPI, Ronei Jesus.. 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*, vol. 55, p. 8331-8338, 2007.
- [75] MAMMEN, Denni; Mammen, Daniel. A critical evaluation on the reability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids. *Food Chemistry*, vol. 135, p. 1365-1368, 2012.
- [76] DOWD, L. E. Spectrophotometric Determination of Quercetin. *Analytical Chemistry*, vol 32, nº 7, p. 1184-1187, 1959.
- [77] MARKHAM, K. R. *Techniques of flavonoid identification*. Academic Press. USA, 1982, p. 36-49.
- [78] CHANG, Roberto et. al. Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 18, p. 549-556. 2008
- [79] GARDANA, Claudio et. al. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 45, p. 390-399, 2007.

-
- [80] KUMAZAWA, Shigenori et. al. Direct Evidence for the Plant Origin of Brazilian Propolis by the Observation of Honeybee Behavior and Phytochemical Analysis. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 51, p. 740-742, 2003.
- [81] MARCUCCI, M. C. et. al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 74, p. 105-112, 2001.
- [82] MIDORIKAWA, Kiyoshi et. al. Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Analysis of Propolis. *Phytochemical Analysis*, vol. 12, p. 366-373, 2001.
- [83] BOTELHO, Bruno C.; MENDES, Bruna A. P.; SENA, Marcelo M. Implementação de um método robusto para o controle fiscal de umidade em queijo minas artesanal. *Abordagem metrológica multivariada. Quimica Nova*, vol. 36, p. 1416-1422, 2013.
- [84] BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Garantia da Qualidade Analítica. 2011. <http://bibliotecaquimicaufmg2010.files.wordpress.com/2012/02/mapa-2011-manual-de-garantia-da-qualidade-analitica.pdf>
- [85] CAI, Ruiet. al. Rapid quantification of flavonoids in propolis and previous study for classification of propolis from different origins by using near infrared spectroscopy. *Analytical Methods*, vol. 4, p. 2388-235, 2012.
- [86] YANG, et. al. Pinocembrin, a major flavonoid in propolis, improves the biological functions of EPCs derived from rat bone marrow through the PI3K-eNOS-NO signaling pathway. *Cytotechnology*, vol. 65, p. 541-551, 2013.
- [87] MATSUDA, Adriana Hitomi; ALMEIDA-MURADIAN, Ligia Bicudo de. Validated method for the quantification of artepillin-C in Brazilian propolis. *Phytochemical Analysis*, vol. 19, p. 179-183, 2008.
- [88] BANKOVA, Vassya. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 100, p.114-117, 2005.
- [89] SAVITZKY, A.; GOLAY, M.J.E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedure. *Anal. Chem.*, vol. 36, p. 1627 ,1967.

[90] PARK, Yong K. et. al. Chemical Constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the Main Botanical Origin of Southeastern Brazilian Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, vol. 52, p. 1100-1103, 2004.