



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E
CIÊNCIA DE ALIMENTOS



Área de Concentração: Engenharia e Ciência de Alimentos

PROSPECÇÃO DE CONSTITUINTES BIOATIVOS EM PRÓPOLIS
VERMELHA DO ESTADO DA BAHIA: UTILIZAÇÃO DE
ESPECTROSCOPIA NIR E MIR PARA CALIBRAÇÃO
MULTIVARIADA

Autor: Amanda Beatriz Sales de Lima

Orientador: Prof. D. Sc. Leandro Soares Santos

ITAPETINGA
BAHIA - BRASIL
Fevereiro de 2020

AMANDA BEATRIZ SALES DE LIMA

**PROSPECÇÃO DE CONSTITUINTES BIOATIVOS EM PRÓPOLIS
VERMELHA DO ESTADO DA BAHIA: UTILIZAÇÃO DE
ESPECTROSCOPIA NIR E MIR PARA CALIBRAÇÃO
MULTIVARIADA**

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Orientador: Prof. D. Sc. Leandro Soares Santos.

Co-orientadores: Prof. D. Sc. Marcondes Viana da Silva.

Prof^a. D^a. Sc. Cristiane Martins Veloso.

ITAPETINGA
BAHIA - BRASIL
Fevereiro de 2020

638.16 Lima, Amanda Beatriz Sales de.
L696p Prospecção de constituintes bioativos em própolis vermelha do estado da Bahia: utilização de espectroscopia NIR e MIR para calibração multivariada. / Amanda Beatriz Sales de Lima. – Itapetinga-BA: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2020.
99 fl.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos. Sob a orientação do Prof. D. Sc. Leandro Soares Santos e coorientação dos Profs. D. Sc. Marcondes Viana da Silva e D. Sc. Cristiane Martins Veloso

1. Própolis vermelha – Bioatividade – Quimiometria. 2. Própolis vermelha – Análise multivariada – Capacidade antioxidante. 3. Própolis vermelha – Espectroscopia NIR e MIR – Usos. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Santos, Leandro Soares. III. Silva, Marcondes Viana da. IV. Veloso, Cristiane Martins. V. Título.

CDD(21): 638.16

Catálogo na Fonte:

Cláudia Aparecida de Souza – CRB 1014-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Própolis vermelha : Bioatividade
2. Própolis vermelha : Quimiometria
3. Própolis vermelha : Análise multivariada
4. Própolis vermelha : Capacidade antioxidante
5. Própolis vermelha : Espectroscopia NIR e MIR



ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB
Instituída pelo Decreto Estadual
N.º 16.825, de 04/07/2016



UESB



Governo do
Estado da Bahia

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: PROSPECÇÃO DE CONSTITUINTES BIOATIVOS EM PRÓPOLIS VERMELHA DO ESTADO DA BAHIA: UTILIZAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA NIR E MIR PARA CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA.

Autor (a): AMANDA BEATRIZ SALES DE LIMA

Orientador (a): Prof. Dr. Leandro Soares Santos

Coorientador (a): Prof. Dr. Marcondes Viana da Silva

Prof.^a Dr.^a Cristiane Martins Veloso

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.

Dr.^a Iasnaia Maria de Carvalho Tavares
UESB

Prof.^a Dr.^a Sibelli Passini Barbosa Ferrão
UESB

Prof. Dr. Leandro Soares Santos
Orientador - UESB
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 19 de fevereiro de 2020.

“O sertanejo é, antes de tudo, um forte.”

Euclides da Cunha, Os sertões.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre presente em todos os meus dias e por me permitir viver minhas falhas e aprender com elas. Por falar comigo em coisas tão simples. Por me amar tanto apesar de tão ínfima que sou.

Aos meus pais, Alcides e Betânia, por todo apoio e o incentivo. Por me ensinarem que eu sou capaz e acreditarem em mim. Pela garra e a força de vontade que demonstram em tudo que se propõem a fazer. Por todo amor me dado na vida.

Mamãezinha, você me mostrou a força que uma mulher pode ter e que podemos ser o que quisermos. Você me ensinou a ser determinada. Nunca se permita esquecer quão longe podemos ir e que apesar das adversidades sempre existem as vitórias.

Aos meus irmãos, Alícia, Breno e Daysla, por todos os momentos compartilhados, pelas brigas e alegrias. Por crescer e partilhar a vida comigo. São esses momentos que nos fazem ser quem somos, retirem o melhor deles pra vida.

Em especial ao meu pequeno José. Você me mostrou o amor mais puro que conheço até hoje na vida. É por você que eu quero ser melhor e quero um mundo melhor. Você é minha força e esperança nos dias de luta. Você me ensina que a vida é muito maior que os problemas e quão fúteis são minhas preocupações. Você é meu pequeno guerreiro.

À minha vovozinha Maria Bandeira, por me trazer tanta paz e sabedoria.

À minha “boadrasta” Neidinha, pela alegria e garra. Por me mostrar que dias ruins podem vir, mas que devemos encará-los de cabeça erguida. Por toda sua força.

Ao meu noivo Elton, pelo incentivo, companheirismo, carinho, cuidado e por todo amor que tem me dado. Por me ouvir e sempre ter uma palavra de sabedoria pra me acalmar. Por entender minha ausência e sempre se fazer presente em todos os meus momentos e aonde quer que eu vá. Você me faz bem.

À toda minha família. Vocês são meu porto seguro, meu alicerce e minha inspiração. Eu amo muito vocês!

Às minhas amigas, Gabriela, Jessyka e Jana. Vocês também são minha família. Me ensinam diariamente o que verdadeiramente é uma amizade e apesar de todos os meus momentos sempre estão presentes e ao meu lado. Por tornarem meus dias mais alegres, pela confiança e acolhimento, por compartilharem a vida comigo. Também ao meu amigo Nenem, por todos os momentos vividos, pelas palavras e demonstração de amizade.

Ao meu orientador Leandro Soares, que além de uma mente brilhante é uma pessoa maravilhosa. Por toda a paciência e orientação, por todas as conversas, ensinamentos e amizade. Pelo acolhimento e a confiança depositada. Você me inspira.

À nossa equipe de laboratório Acsa, Roberta, Júlia, Renata, Shefany, Ramile e Esdras, por toda ajuda, conversas e momentos compartilhados. Pela nossa troca constante. Em especial a Acsa Batista por todas as risadas, momentos, conversas e lanches, pela amizade. Vocês tornaram essa jornada e os dias de laboratório mais leves.

À turma de mestrado, em especial aos meus presentinhos pra vida: Ingrid, Mariana, Annie e Heliara. Por compartilhar juntas tantos momentos de angústias e vitórias. Independente do caminho que trilhemos agora, sempre estarão em meu coração. Vocês me cativaram. Também à Mateus Flores, pelos estresses e perturbações no laboratório, por alegrar tantos momentos simples.

A todos os professores do PPGEAL com quem tive a honra de conviver e aprender durante esse período. Vocês são inspirações.

Aos integrantes da banca examinadora pelas contribuições e disponibilidade.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos pela oportunidade e acolhimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos.

A todos que não foram citados, mas que de alguma forma estiveram presentes ou torceram por mim nesses dois anos.

Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
I. REFERENCIAL TEÓRICO.....	1
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Própolis: aspectos gerais.....	3
2.2. Própolis Vermelha.....	5
2.2.1. Compostos bioativos da própolis vermelha.....	6
2.2.2. Propriedades bioativas da própolis vermelha.....	7
2.3. Capacidade antioxidante	9
2.4. Espectroscopia por Infravermelho	18
2.5. Quimiometria.....	20
II. OBJETIVOS GERAIS.....	25
1. Objetivo Geral	25
2. Objetivos Específicos.....	25
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
1. Material	26
2. Caracterização das amostras.....	26
2.1. Obtenção do extrato	26
2.2. Constituintes Fenólicos Totais - CFT	26
2.3. Constituintes Flavonoides Totais – FT	27
2.4. Determinação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> pelo método de DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil).....	27
2.5. Determinação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> pelo método de redução do ferro - Poder Redutor (PR)	27
2.6. Determinação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> pelo método da co-oxidação do sistema β-caroteno:ácido linoleico – BCAL	28
2.7. Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE).....	29
2.8. Espectroscopia de Infravermelho Próximo – NIR	30
2.9. Espectroscopia de Infravermelho Médio – MIR	30
3. Tratamento de dados	31
4. Análises Quimiométricas	31
4.1. Análise de Agrupamento (AG).....	31
4.2. Análise de Componentes Principais (ACP).....	32
4.3. Análise de Correlações Canônicas (ACC).....	33

4.4.	Regressão Linear Múltipla (RLM)	33
4.5.	Regressão por mínimos quadrados parciais (RMQP)	35
IV.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
1.	Constituintes fenólicos e flavonoides totais e capacidade antioxidante	36
2.	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE)	39
3.	Espectroscopia de Infravermelho Próximo – NIR	43
4.	Espectroscopia de Infravermelho Médio – MIR	44
5.	Análises Quimiométricas	46
5.1.	Análise de Agrupamento	46
5.2.	Análise de Componentes Principais	51
5.3.	Análise de Correlações Canônicas	56
5.4.	Regressão Linear Múltipla	63
5.5.	Regressão por mínimos quadrados parciais	69
V.	CONCLUSÕES	75
VI.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação e estruturas químicas dos principais antioxidantes naturais.....	10
Tabela 2 - Estudo da arte: Artigos disponíveis na literatura sobre a capacidade antioxidante da própolis vermelha.....	16
Tabela 3 - Equações da reta, linearidade (R), faixa de concentração, comprimento de onda e tempo de retenção para cada padrão utilizado na CLAE.....	29
Tabela 4 - Potencial antioxidante das amostras de própolis vermelha da Bahia.....	36
Tabela 5 - Compostos fenólicos individuais (mg. 100 g ⁻¹) das amostras de própolis vermelha da Bahia quantificados por CLAE.....	40
Tabela 6 – Parâmetros de ajuste dos modelos preditivos de RLM.....	65
Tabela 7 – Parâmetros de ajustes dos modelos preditivos de RMQP.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Áreas de mangue do Nordeste brasileiro e seus respectivos climas. Fonte: O autor.....	6
Figura 2 - Tipos de vibrações moleculares. Note que + indica movimento da página em direção ao leitor e - indica o movimento do leitor em direção à página. Fonte: Barbosa (2007) e Skoong, Holler & Niemman (2009).	19
Figura 3 - Gráfico de dispersão PC1 vs. PC2 das principais fontes de variabilidade entre as amostras de própolis; (a) distinção entre as amostras; (b) relação entre os compostos voláteis (variáveis). Fonte: Cheng et al. (2013).	23
Figura 4 - ORMQP-DA e Análise de Agrupamento para marcadores bioativos da própolis egípcia. Fonte: Shawky & Ibrahim (2018).	23
Figura 5 - Diferenciação da própolis argentina de diferentes espécies de abelhas em grupos (A e B) e por diferentes localidades da Argentina (C e D). Fonte: Maldonado et al. (2018).	24
Figura 6 - Agrupamento em um escore PC 2D (a) e gráfico loadings (b) baseado nas variáveis ABTS, DPPH, FRAP, compostos fenólicos totais e flavonóides para própolis coletados em 2013. Fonte: Calegari et al. (2017).....	24
Figura 7 - Espectros de absorvâncias do NIR da própolis vermelha da Bahia.....	43
Figura 8 - Espectros de absorvâncias no MIR da amostra bruta (A) e do extrato seco (B) da própolis vermelha da Bahia.....	45
Figura 9 - Dendograma de agrupamento das amostras de própolis vermelha do estado da Bahia de acordo com os dados de capacidade antioxidante.	47
Figura 10 - Dendograma de agrupamento das amostras de própolis vermelha do estado da Bahia de acordo com os dados quantificados por CLAE.	48
Figura 11 - Dendograma de agrupamento das amostras de própolis vermelha do estado da Bahia de acordo com os dados observados por NIR.	49
Figura 12 - Dendograma de agrupamento das amostras de própolis vermelha do estado da Bahia de acordo com os dados observados por MIR das amostras brutas (A) e dos extratos (B).	50
Figura 13 - Dispersão dos Componentes Principais 1 e 2 das variáveis (A) e das amostras (B) de própolis vermelha do estado da Bahia de acordo com os dados de atividade antioxidante.	52
Figura 14 - Dispersão dos Componentes Principais 1 e 2 das variáveis (A) e das amostras (B) de própolis vermelha do estado da Bahia de acordo com os dados quantificados por CLAE.	53
Figura 15 - Dispersão dos Componentes Principais 1 e 2 das variáveis (A) e das amostras (B) de própolis vermelha do estado da Bahia de acordo com os dados quantificados por NIR.....	54
Figura 16 - Dispersão dos Componentes Principais 1 e 2 das variáveis (A e C) e das amostras de própolis vermelha do estado da Bahia de acordo com os dados quantificados por MIR para as amostras brutas (B) e extratos secos (D).	55
Figura 17 - Correlação canônica entre dados de CLAE e capacidade antioxidante de amostras de própolis do estado da Bahia.	57
Figura 18 - Correlação canônica entre dados obtidos por NIR e capacidade antioxidante de amostras de própolis do estado da Bahia.....	60
Figura 19 - Correlação canônica entre dados obtidos por MIR das amostras brutas (A) e extrato seco (B) e capacidade antioxidante de amostras de própolis do estado da Bahia.	62
Figura 20 - Coeficientes de regressão em função do número de onda do modelo RLM construído para prever os constituintes fenólicos totais em amostras de própolis vermelha do estado da Bahia.....	66
Figura 21 - Coeficientes de regressão em função do número de onda do modelo RLM construído para prever os constituintes flavonoides totais em amostras de própolis vermelha do estado da Bahia....	67
Figura 22 - Coeficientes de regressão em função do comprimento de onda do modelo RLM construído para prever o CE ₅₀ do DPPH em amostras de própolis vermelha do estado da Bahia.	67
Figura 23 - Coeficientes de regressão em função do comprimento de onda do modelo RLM construído para prever o CE ₅₀ do PR em amostras de própolis vermelha do estado da Bahia.....	68

Figura 24 - Coeficientes de regressão em função do número de onda do modelo RLM construído para prever o percentual de proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico em amostras de própolis vermelha do estado da Bahia.....	69
Figura 25 - Coeficientes de regressão em função do comprimento de onda do modelo RMQP construído para prever os constituintes fenólicos totais em amostras de própolis vermelha do estado da Bahia.....	71
Figura 26 - Coeficientes de regressão em função do número de onda do modelo RMQP construído para prever os constituintes flavonoides totais em amostras de própolis vermelha do estado da Bahia.	72
Figura 27 - Coeficientes de regressão em função do número de onda do modelo RMQP construído para prever o CE_{50} do DPPH em amostras de própolis vermelha do estado da Bahia.	73
Figura 28 - Coeficientes de regressão em função do comprimento de onda do modelo RMQP construído para prever o CE_{50} do PR em amostras de própolis vermelha do estado da Bahia.....	73
Figura 29 - Coeficientes de regressão em função do número de onda do modelo RMQP construído para prever o percentual de proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico em amostras de própolis vermelha do estado da Bahia.....	74

LISTA DE ABREVIACÕES

- ABTS – radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico
- ACC – análise de correlações canônicas
- ACP – análise de componentes principais
- AD – análise discriminante
- AG – análise de agrupamento
- BCAL – Co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico
- CE₅₀ – concentração de efeito para inibir 50% do radical testado
- CFT – constituintes fenólicos totais
- CLAE – cromatografia líquida de alta
- CP – componente principal
- CUPRAC – capacidade antioxidante redutora de íons cúpricos
- DPPH – radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilil
- FIR – espectroscopia no infravermelho distante
- FRAP – capacidade de redução férrica
- FT – constituintes flavonoides totais
- FTIR – espectroscopia no infravermelho médio com transformada de Fourier
- FTIR-ATR – espectroscopia no infravermelho médio com transformada de Fourier e reflectância total atenuada
- IR – infravermelho
- MIR – espectroscopia no infravermelho médio
- NIR – espectroscopia no infravermelho próximo
- ORMQP-DA – mínimos quadrados parciais ortogonais para análise discriminante
- ORAC – capacidade de absorção de íons de oxigênio
- RMQP – regressão por mínimos quadrados parciais
- PR – poder redutor de ferro
- RER – razão de erro de intervalo
- RLM – regressão linear múltipla
- RPD – relação entre o desempenho e o desvio
- TAH – transferência de átomos de hidrogênio
- TES – transferência de elétrons simples

RESUMO

LIMA, A. B. S. **Prospecção de constituintes bioativos em própolis vermelha do estado da Bahia: utilização de espectroscopia NIR e MIR para calibração multivariada.** Itapetinga-BA: UESB, 95 p. 2020. Dissertação. (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos). *

A própolis vermelha brasileira tem origem botânica em uma leguminosa conhecida como rabo-de-bugio e apresenta composição química e propriedades biológicas diferenciadas dos demais tipos de própolis. Essa composição pode variar com as condições climáticas, sazonais e de flora da região de produção. Este estudo tem como objetivo avaliar o potencial bioativo da própolis vermelha da Bahia através de quimiometria. Para isso foram utilizados métodos de análise multivariada com dados de análises convencionais como: constituintes fenólicos totais (CFT) e flavonoides totais (FT), atividade antioxidante por DPPH, poder redutor (PR) e proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico (BCAL), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e métodos não convencionais: espectros de infravermelho próximo (NIR) e médio (MIR). Foram analisadas 44 amostras de própolis vermelha do estado da Bahia, coletadas de colmeias, produtores, estações e anos diferentes. Os dados foram obtidos e discriminados por análise de agrupamento (AG), componentes principais (ACP) e correlações canônicas (ACC). Modelos matemáticos foram ajustados por regressão linear múltipla (RLM) e por mínimos quadrados parciais (RMQP) para prever valores de potencial antioxidante com dados de CLAE, NIR e MIR. As análises convencionais indicaram heterogeneidade entre as amostras, com teor médio de CFT de 67,68 (mg ácido gálico.g⁻¹ amostra) e FT de 73,41 (mg catequina.g⁻¹ de amostra). Demonstram potencial antioxidante primário (CE₅₀ do DPPH de 0,72 mg.mL⁻¹) e secundário (CE₅₀ do PR de 0,27 mg.mL⁻¹ e %proteção BCAL de 82,57). Esses dados possibilitaram a diferenciação qualitativa de amostras de própolis vermelha com qualidade antioxidante superior ou inferior. A ACC foi melhor na separação dos grupos em relação as demais análises qualitativas com destaque para a classificação gerada com dados de MIR. Quanto as análises quantitativas, a RMQP gerou melhores parâmetros de ajuste e os dados do MIR das amostras se destacaram pela alta correlação entre valores reais e preditos. Esses dados indicam que essa técnica pode ser utilizada para prever a qualidade antioxidante de própolis vermelha de forma confiável e precisa sendo uma alternativa de substituição de análises dispendiosas.

Palavras-chave: Análise multivariada, capacidade antioxidante, CLAE

*Orientador: D. Sc. UESB Leandro Soares Santos; Co-orientadores: D. Sc. UESB Marcondes Viana da Silva; D^a. Sc. UESB Cristiane Martins Veloso.

ABSTRACT

LIMA, A. B. S. **Prospection of bioactive constituents in red propolis from the state of Bahia: use of NIR and MIR spectroscopy for multivariate calibration.** Itapetinga-BA: Itapetinga-BA: UESB, 95 p. 2020. Dissertation. (Master in Engineering and Food Sciences, Concentration in the Food Science area.).*

Brazilian red propolis has botanical origins in a legume known as rabo-de-bugio and has a chemical composition and biological properties differentiated from other types of propolis. This composition may vary with climatic, seasonal, and flora conditions in the region of production. This study aims to evaluate the bioactive potential of red propolis from Bahia using chemometry. For this, multivariate analysis methods were used with conventional analysis data such as: total phenolic constituents (CFT)¹ and total flavonoids (FT)², the antioxidant activity of DPPH, reducing power (PR)³ and protection of the β -carotene system / linoleic acid (BCAL)⁴, high performance liquid chromatography (HPLC) and non-compatible methods: near infrared (NIR) and middle (MIR) spectroscopy. 44 samples of red propolis from the state of Bahia were analyzed, collected from hives, producers, seasons, and different years. The data were obtained and separated by cluster analysis (CA), principal components analysis (PCA), and canonical correlations analysis (CCA). Mathematical models were adjusted by multiple linear regression (MLR) and partial least squares (PLS) to predict antioxidant potential values with HPLC, NIR, and MIR data. As the defined statistics indicate the heterogeneity between the samples, with an average CFT content of 67.68 (mg of the gallic acid.g⁻¹ sample) and FT of 73.41 (mg of catechin.g⁻¹ sample). Which demonstrate primary antioxidant potential (EC50 of DPPH of 0.72 mg.mL⁻¹) and secondary (EC50 of PR of 0.27 mg.mL⁻¹ and % BCAL protection of 82.57). These data enabled the qualitative differentiation of samples of red propolis with superior or inferior antioxidant quality. The ACC was better at separating the groups concerning the other qualitative analysis with emphasis on the classification originated with MIR data. As for the quantitative analysis, PLS caused better adjustment parameters, and the MIR data of the samples stood out for the high correlation between real and predicted values. These data indicate that this technique can be used to predict the antioxidant quality of red propolis reliably and accurately as an alternative to replacing expensive analyzes.

Keywords: Multivariate analysis, antioxidant capacity, HPLC.

*Advisor: D. Sc. UESB Leandro Soares Santos; Co-advisors: D. Sc. UESB Marcondes Viana da Silva; D^a. Sc. UESB Cristiane Martins Veloso.

¹ From Portuguese: Constituintes Fenólicos Totais (CFT).

² From Portuguese: Flavonoides Totais (FT).

³ From Portuguese: Poder Redutor (PR).

⁴ From Portuguese: β -caroteno/ácido linoleico (BCAL).

I. REFERENCIAL TEÓRICO

1. INTRODUÇÃO GERAL

A própolis é um produto apícola que apresenta diversos tipos de atividades biológicas atribuídas aos seus constituintes químicos, e por isso tem ocupado lugar de destaque no mercado nacional e internacional (COSTA et al., 2014). Sua composição química e cor dependem da biodiversidade da região visitada pelas abelhas, assim, as substâncias presentes encontram-se diretamente relacionadas com a composição química da resina da planta de origem (GHISALBERTI, 1979; MACHADO et al., 2016) e sua coloração pode variar do marrom escuro passando a uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado (ADELMANN, 2005; ANDRADE et al., 2017).

Estudos indicam a presença de quantidades significativas de constituintes fenólicos na própolis vermelha, os quais permitem diferenciá-la dos demais tipos de própolis (ANDRADE et al., 2017). Dentre eles podem ser destacados a biochanina A, a daidzeína, a pinocembrina, a formononetina, a quercetina, o vestitol e neovestitol, a liquiritigenina, e a isoliquiritigenina, considerados como seus biomarcadores (FROZZA et al., 2013; LÓPEZ et al., 2014; MENDONÇA et al., 2015). Alguns desses compostos tem sido associados a atividades antibacterianas (TRUSHEVA et al., 2006; MACHADO et al., 2016; REGUEIRA-NETO et al., 2017; SILVA et al., 2017; RUFATTO et al., 2018; FREIRES et al., 2018), antitumorais (FROZZA et al., 2013; MENDONÇA et al., 2015; SILVA et al., 2017; RUFATTO et al., 2018), anti-inflamatórias (FREIRES et al., 2018) e antioxidantes (TRUSHEVA et al., 2006; OLDONI et al., 2011; FROZZA et al., 2013; MENDONÇA et al., 2015; MACHADO et al., 2016; ANDRADE et al., 2017; SILVA et al., 2017).

O estado de Alagoas foi o pioneiro na produção, pesquisa, reconhecimento e consolidação da própolis vermelha (SEBRAE, 2014a). No entanto, todo o litoral do Nordeste brasileiro apresenta condições favoráveis para a produção desse tipo de própolis, já que sua origem botânica é uma leguminosa conhecida como rabo-de-bugio (*Dalbergia ecastophyllum*). Essa planta cresce em abundância na área de mangues e é a provável responsável por esses compostos de atividade biológica (RUFATTO et al., 2018). Entretanto, em razão das diferentes condições climáticas, sazonais e de flora, a própolis vermelha pode apresentar diferenças na composição química de acordo com estados ou microrregiões, podendo ocorrer variações no seu potencial bioativo, levantando questões determinantes sobre a análise e certificação da qualidade da própolis (ANDRADE et al., 2017; MACHADO et al., 2016; NUNES et al., 2009; PARK et al., 2002; SILVA et al., 2006). Esses levantamentos indicam a importância de se

avaliar a própolis vermelha produzida em diferentes estados do Nordeste quanto a composição e a bioatividade a fim de verificar possíveis diferenças e/ou similaridades.

Alguns estudos tem utilizado essas diferenças para promover a indicação de qualidade de outros tipos de própolis. Os quais têm associado dados de composição fenólica, potencial antioxidante e técnicas de espectroscopia no infravermelho através de métodos quimiométricos de classificação e quantificação (CHENG et al., 2013; LÓPEZ et al., 2014; SALGUEIRO; CASTRO, 2016; REVILLA et al., 2017; SILVA et al., 2018; CALEGARI et al., 2019). A espectroscopia na região do infravermelho tem sido amplamente utilizada por se tratar de uma técnica rápida e que não requer preparo de amostra ou reagentes. Se baseia em alterações nos modos vibracionais e rotacionais das moléculas ao receberem esse tipo de radiação (BARBOSA, 2007; SKOONG; HOLLER; NIEMMAN, 2009) e como cada ligação possui sua própria frequência natural de vibração torna a técnica de alta sensibilidade e precisão (PAVIA et al., 2010). Por gerar um número elevado de dados, é comum sua utilização associada a métodos estatísticos multivariados que possibilitem identificar padrões dos materiais em processo, agrupamento de amostras, permitindo também estimar valores de parâmetros analíticos após metodologias de calibração prévia (SANTOS, 2007).

Assim, o presente estudo objetiva avaliar a qualidade bioativa da própolis vermelha produzida no estado da Bahia utilizando técnicas convencionais e de espectroscopia no infravermelho através de quimiometria.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Própolis: aspectos gerais

A própolis vem ocupando lugar de destaque no mercado nacional e internacional de produtos apícolas (COSTA et al., 2014). De acordo com Lopes (2009), a produção de própolis expandiu e adquiriu maior importância no agronegócio, com aumento de demanda no mercado interno e significativa representação nas exportações do setor. Um boletim divulgado pelo Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE) em 2014, traz o Brasil como o terceiro maior produtor mundial de própolis, sendo as condições climáticas, geográficas e as características da vegetação, cruciais para este sistema de produção. Mostra ainda que 92% da própolis in natura consumida no Japão é de origem brasileira (SEBRAE, 2014a).

Segundo Teixeira et al. (2003), a forte inserção da própolis no mercado se deve, essencialmente, ao grande número de constatações dos diversos tipos de atividades biológicas atribuídas aos seus constituintes químicos. Como consequência, observou-se incremento do valor agregado ao produto, sendo este um dos importantes indicadores que representam a cadeia produtiva da apicultura.

A Instrução Normativa Nº3, de 19 de Janeiro de 2001, ao aprovar os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de produtos apícolas, define própolis como sendo o produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas, de brotos, flores e exsudados de plantas, nas quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para elaboração final do produto (BRASIL, 2001). A palavra própolis é derivada do grego pro-, em defesa, e polis-, comunidade, isto é, em defesa da comunidade, ou da colmeia (GHISALBERTI, 1979), assim, esta substância é utilizada pelas abelhas na proteção da colmeia contra a proliferação de microrganismos, incluindo fungos e bactérias, utilizada também para isolamento térmico e contra inimigos, no preparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha e na mumificação de insetos invasores (ADELMANN, 2005; SILVA et al., 2006).

Segundo Gómez-Caravaca et al. (2006), a própolis é composta de resina (50%), cera (30%), óleos essenciais (10%), pólen (5%) e outros compostos (5%). Foram identificados mais de 200 compostos diferentes, tais como ácidos fenólicos e seus ésteres, flavonoides, terpenos, vitaminas (B1, B2, B6, C e E) e minerais (alumínio, antimônio, cálcio, céσιο, cobre, ferro, lítio, manganês, mercúrio, níquel, prata, vanádio e zinco) (ALMEIDA; MENEZES, 2002).

A composição química da própolis é dependente da biodiversidade da região visitada pelas abelhas. Portanto, as substâncias presentes encontram-se diretamente relacionadas com a composição da resina da planta de origem (GHISALBERTI, 1979; MACHADO et al., 2016).

Assim, a complexidade e a composição química da própolis são decorrentes de vários fatores, entre eles se destacam a ecologia da flora de cada região (ANDRADE et al., 2017; MACHADO et al., 2016; PARK et al., 2002) e a sazonalidade e clima de produção e colheita (SILVA et al., 2006; NUNES et al., 2009). As amostras tropicais de própolis, especialmente as brasileiras, têm mostrado diferenças significativas nas suas composições químicas em relação à própolis da zona temperada (NUNES et al., 2009).

De acordo com Bankova (2005) e Silva et al. (2008), entre as fontes vegetais da própolis brasileira estão a *Baccharis* spp., particularmente a *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo) e a *Dalbergia ecastophyllum* (rabo-de-bugio), sendo a coloração da própolis dependente de sua procedência e podendo variar da cor amarelada, parda, esverdeada, marrom e outras, dependendo da origem botânica e idade (BRASIL, 2001; MARCUCCI, 1996).

Mendonça (2011), Park et al. (2000) e Park et al. (2002), realizaram a classificação de amostras de própolis em treze grupos principais de acordo com estados do Brasil e por cor devido a diferenças nas origens botânicas e constituintes químicos, os quais podem variar de acordo com os fatores citados anteriormente. Esses dados estão resumidos no Quadro 1.

Quadro 1 - Classificação dos tipos de própolis brasileiras.

Grupo	Estados	Cor	Origem Botânica
1	Rio Grande do Sul	Amarelo e amarelo escuro	-
2	Rio Grande do sul	Castanho claro	-
3	Paraná	Castanho escuro	Resina do botão floral de <i>Populus alba</i>
4	Paraná	Castanho claro	-
5	Paraná	Marrom esverdeado	-
6	Bahia	Marrom avermelhado	Resina das folhas jovens de <i>Hyptis divaricata</i>
7	Bahia	Marrom esverdeado	-
8	Pernambuco	Castanho escuro	Resina do botão floral de <i>Populus alba</i>
9	Pernambuco	Amarelo e amarelo escuro	-
10	Ceará	Amarelo e amarelo escuro	-
11	Piauí	Amarelo e amarelo escuro	-
12	São Paulo e Minas Gerais	Verde ou Marrom esverdeado	Resina de folhas jovens de <i>Baccharis dracunculifolia</i>
13	Alagoas, Bahia e Pernambuco	Vermelha	Exsudado do caule de <i>Dalbergia ecastophyllum</i>

Fonte: Mendonça (2011), Park et al. (2000) e Park et al. (2002) adaptado.

Andrade et al. (2017), avaliando os componentes bioativos e o potencial antioxidante da própolis marrom, verde e vermelha do Nordeste do Brasil, encontraram valores superiores de compostos fenólicos para amostra de própolis vermelha em relação às demais, os quais são responsáveis pelas propriedades funcionais da própolis. Essa variação foi atribuída ao fato de que a composição química da própolis pode variar significativamente dependendo da vegetação que cresce em torno das colmeias, podendo influenciar na atividade biológica (ANDRADE et al., 2017).

A própolis vermelha do grupo 13 pode ser encontrada principalmente nos estados de Alagoas, Bahia e Pernambuco, sua fonte apícola é o exsudato do caule da *Dalbergia ecastophyllum*, e os seus constituintes químicos de maior destaque são flavonoides (pinocembrina, formononetina, rutina, quercetina, dalbergina entre outros) e ácidos fenólicos (ácido ferúlico) (MENDONÇA, 2011; PARK et al., 2000).

2.2. Própolis Vermelha

Segundo o SEBRAE (2014b), devido às propriedades medicinais reconhecidas e utilizadas, principalmente pela indústria farmacêutica, a própolis vermelha possui um valor agregado diferenciado em relação à própolis verde, tipo mais comum. Esse tipo de própolis tem chamado atenção de compradores internacionais como Japoneses e Chineses, os quais tem investido consideravelmente em pesquisas.

Desde a década de 90, alguns trabalhos vem descrevendo o potencial biológico da própolis de cor vermelha encontrada em Cuba e na Venezuela, e demonstraram atividade antimicrobiana, cicatrizante e antioxidante, sendo identificados os seus antecessores botânicos como *Clusia nemorosa* e a *Clusia scrobiculata* (TRUSHEVA et al., 2006).

A própolis vermelha brasileira geralmente é encontrada em colmeias próximas a manguezais do litoral brasileiro, especialmente na região Nordeste (PARK et al., 2002; SILVA et al., 2008). A origem botânica dessa própolis em tons de vermelho é uma leguminosa conhecida como rabo-de-bugio (*Dalbergia ecastophyllum*), que cresce em abundância na área de mangues. Na Figura 1 observa-se a área de mangue do Nordeste brasileiro e seus climas predominantes, indicando os locais com potencial para produção da própolis vermelha bem como as diferenças climáticas existentes. Através dela podem se observar grandes diferenças em relação à umidade predominante do ar e os níveis de precipitação de chuva nessas áreas, o que pode gerar diferenças na composição da própolis vermelha produzida nessas diferentes áreas. Esses comportamento foi observado por Lopez (2014), o qual indica que amostras de própolis vermelha, embora todas provenientes de regiões litorâneas do nordeste do Brasil, apresentam diferenças na composição química. O mesmo autor levanta algumas questões que

devem ser levadas em consideração, como as similaridades ou diferenças entre amostras de própolis vermelha de diferentes regiões; a quantidade de fontes botânicas compartilhadas, ao se considerar têm amostras de origens geográficas diferentes e; a possibilidade de associar diretamente a composição da amostra de própolis com a sua cor. Esses levantamentos indicam a importância de se avaliar a própolis vermelha produzida em diferentes estados do Nordeste quanto à composição e a bioatividade a fim de verificar possíveis diferenças e/ou similaridades.

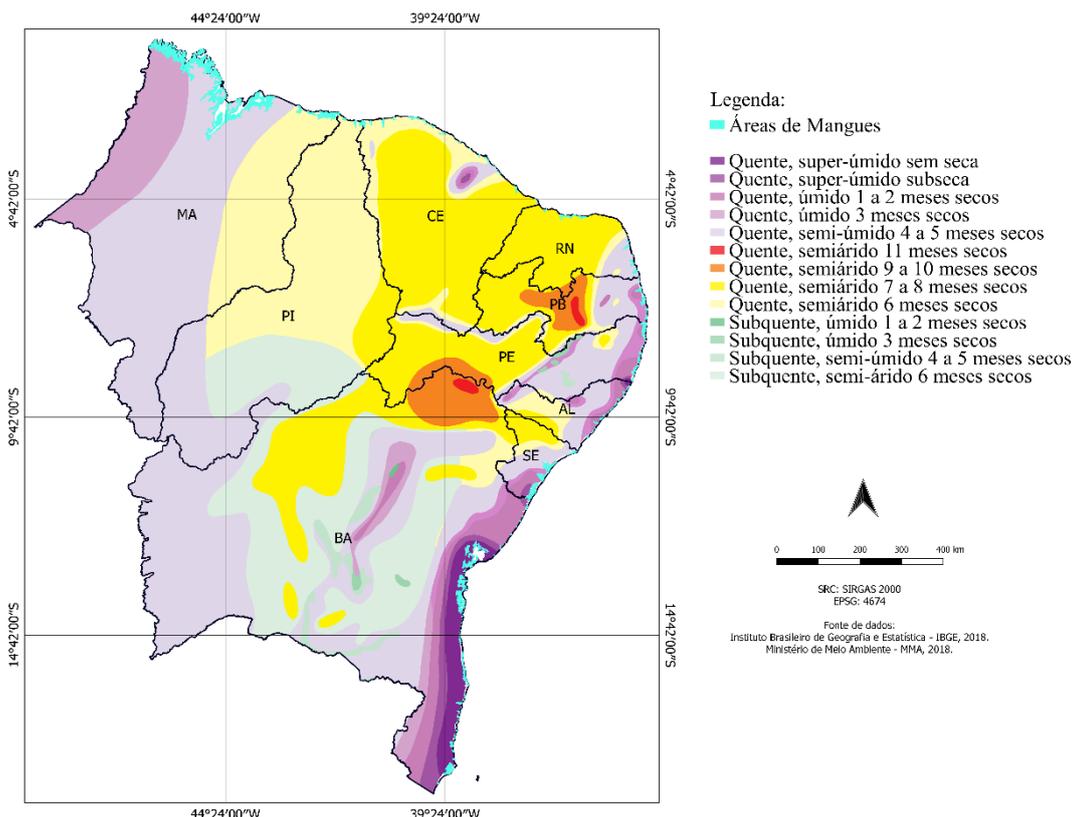


Figura 1 - Áreas de mangue do Nordeste brasileiro e seus respectivos climas. Fonte: O autor.

2.2.1. Compostos bioativos da própolis vermelha

Algumas moléculas constituintes como elemicina, isoelemicina, metil isoeugenol, metil eugenol, formononetina, biochanina A, isoliquiritigenina, liquiritigenina, medicarpina, homopterocarpan, quercetina e vestitol foram encontradas em estudos de caracterização dessa própolis vermelha, as quais permitem diferenciá-la de outros tipos de própolis brasileira (ANDRADE et al., 2017; RUFATTO et al., 2018; SILVA et al., 2008; TRUSHEVA et al., 2006).

Oldoni (2007) ao avaliar a capacidade antioxidante de isoflavonas da própolis vermelha e a bioatividade de *Dalbergia odorifera* T. Chen., observou a importância dessa família das leguminosas (as quais produzem isoflavonóides como metabólitos secundários em resposta a

condições de estresse sofridas pela planta) como fonte de resina para a própolis, além de sugerir um grande potencial biológico para a própolis vermelha brasileira.

Os compostos daidzeína, biochanina A (LÓPEZ et al., 2014), pinocembrina e quercetina (MENDONÇA et al., 2015) são biomarcadores da própolis vermelha brasileira. Além desses compostos, outros estudos trazem ainda como biomarcadores da própolis vermelha o vestitol e neovestitol, C-glicosídeo, liquiritigenina, isoliquiritigenina, formononetina e medicarpina (FROZZA et al., 2013; LÓPEZ et al., 2014).

Andrade et al. (2017), avaliando os componentes bioativos da própolis vermelha encontraram quantidades significativas de constituintes fenólicos, e associaram a presença de alguns desses compostos polifenólicos a atividades antibacterianas, antitumorais, anti-inflamatórias, antioxidantes e ainda outras propriedades terapêuticas benéficas à saúde humana. Segundo Oršolic e colaboradores (2004), tais características bioativas podem ser atribuídas aos constituintes como os flavonoides.

2.2.2. Propriedades bioativas da própolis vermelha

Freires et al. (2018) listaram as cepas microbianas as quais a própolis vermelha tem apresentado atividade antimicrobiana. Os autores indicaram potencial antimicrobiano de cepas gram positivas, para *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus sp.*, com concentrações inibitórias mínimas variando de 3,8 a 1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; já para cepas gram negativas, para *Klebsiella sp.*, *Escherichia coli*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Pseudomonas aeruginosa*, com concentrações inibitórias mínimas variando de 25 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os autores indicaram ainda que esse potencial contribui para o controle da cárie dentária e doença periodontal, além de ação anti-inflamatória, inibindo a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos, na dose de 10 mg.kg^{-1} de peso corporal, sendo considerada tão eficaz quanto o medicamento padrão anti-inflamatório utilizado.

Atividades antitripanosomos, antileishmania e citotóxica da própolis vermelha brasileira foram determinadas por Regueira-Neto et al. (2018). Os autores observaram que doses variando de 35 a 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ eram suficientes para inibir 50% das cepas de Leishmania, enquanto que para inibir 50% das cepas de Tripanosomos foram determinadas concentrações variando de <31 a 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, já a citotoxicidade para 50% dos Fibroblastos variou de 48 a 142 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Concluíram que as amostras de própolis vermelha apresentaram alta atividade citotóxica contra os parasitas e que apesar de apresentar alta citotoxicidade a células de fibroblastos são seguras para serem usada em concentrações específicas.

A atividade antibacteriana da própolis vermelha foi determinada por Rufatto et al. (2018), que determinaram uma concentração inibitória mínima variando de 125 a 5000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Os autores indicaram o uso da própolis vermelha e seus derivados como uma alternativa contra microrganismos patogênicos na área de saúde e na indústria de alimentos.

Machado et al. (2016), avaliando a composição química e atividade biológica de extratos de própolis marrom, verde e vermelha do Brasil, observaram ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* para própolis vermelha com concentração inibitória mínima variando de 25 a 800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Quanto a ação antitumoral de linhagens celulares de melanoma, ao avaliar os efeitos antiproliferativos, os autores observaram que após 24 e 48 horas de incubação, os extratos provocaram inibição significativa da proliferação celular em comparação ao controle e atribuíram esse efeito a presença de formononetina. Realizaram ainda a quantificação fenólica e de flavonoides das amostras e encontraram valores entre 157 a 300 $\text{mg EAG}\cdot\text{g}^{-1}$ e 25 a 58 $\text{mg EQ}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente, e ação antioxidante das amostras, obtendo CE_{50} de 44-186 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para DPPH e 87-98 μg de Trolox. mL^{-1} para ABTS. Todas as análises indicaram alto potencial bioativo.

A atividade antioxidante e citotóxica da própolis vermelha do Brasil foi demonstrada por Frozza et al. (2013), que observaram um CE_{50} de 270 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o DPPH, e atividade semelhante a enzimas antioxidantes como a superóxidodismutase e a catalase. Avaliaram também a atividade antitumoral frente a células de carcinomas humanos, apresentando uma concentração de no máximo 86 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ com 24 horas de exposição para combater 50% das células tumorais. Indicaram ainda que células tumorais apresentaram maior sensibilidade que as células normais aos compostos bioativos da própolis.

Oldoni (2007) analisando o isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante da própolis vermelha por diferentes métodos de obtenção do extrato, observaram que a própolis vermelha, possui elevado teor de compostos fenólicos totais e um baixo teor de flavonóides. Segundo o autor, o composto isolado da fração hexânica possui elevada atividade sequestrante para o radical livre DPPH, sendo estatisticamente semelhante aos controles positivos para α -tocoferol e BHA.

Andrade et al. (2017), ao avaliar a atividade antioxidante das própolis marrom, verde e vermelha, observaram que a própolis vermelha apresentou potencial antioxidante estatisticamente superior à própolis verde pelo método de remoção do ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico (ABTS^+), e superior a própolis marrom em todos os métodos de avaliação. Sendo a capacidade antioxidante pelo método de absorção de oxigênio (ORAC), o método que apresentou maiores valores em relação aos demais métodos.

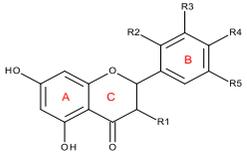
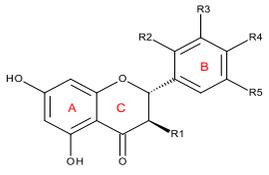
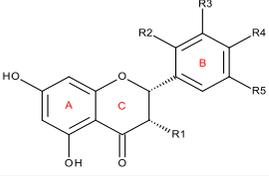
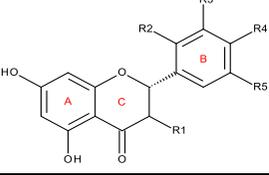
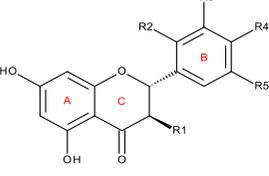
2.3. Capacidade antioxidante

De acordo com Halliwell & Gutteridge (2015), antioxidantes são compostos que em baixas concentrações podem retardar ou inibir a oxidação de lipídios ou outras moléculas. São capazes de inibir a oxidação de moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos, por meio de dois mecanismos principais: o primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação; o segundo envolve a estabilização de radicais importantes na etapa de propagação, como alcoxila e peroxila, interrompendo ou retardando a reação em cadeia (NAMIKI, 1990; SIMIC; JOVANOVIC, 1994).

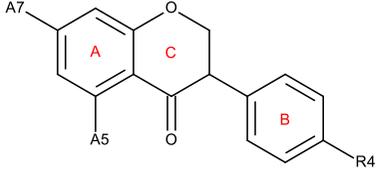
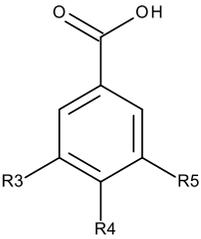
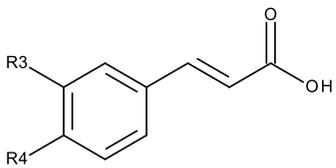
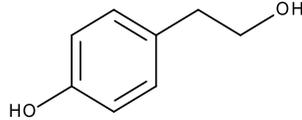
De acordo com Cömert & Gökmen (2018), como classificação geral, os antioxidantes são agrupados em vitaminas (ácido ascórbico, tocoferóis), carotenóides (taninos condensados, xantofilas e carotenos), flavonóides (flavonas, isoflavonas, flavonóis, flavanóis, flavanonas), ácidos fenólicos (ácido hidroxibenzoico e ácido hidroxicinâmico), álcoois fenólicos, estilbenos, lignanas, taninos, compostos de enxofre e compostos neo-formados (melanoidinas). Na Tabela 1 apresentam-se as classes e as estruturas químicas dos principais antioxidantes naturais encontrados. Estão destacados os compostos fenólicos antioxidantes que são considerados biomarcadores na própolis vermelha (FROZZA et al., 2013; LÓPEZ et al., 2014; MENDONÇA et al., 2015).

Os antioxidantes fenólicos podem atuar como sequestradores de radicais ou como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários resultantes da ação desses compostos são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992; SOARES, 2002). Estudos realizados para explicar a relação entre a estrutura dos compostos fenólicos e sua atividade antioxidante, relataram que o número de grupos hidroxila e a posição dos substituintes determinaram essa atividade (CÖMERT; GÖKMEN, 2018). De acordo com Bravo (1998), um fenol em si é inativo como antioxidante, mas os orto e para-difenóis têm capacidade antioxidante, que aumenta com a substituição de átomos de hidrogênio por grupos etil ou n-butyl. Além disso, a eficiência antioxidante dos flavonoides é diretamente correlacionada com seu grau de hidroxilação e diminui com a presença de carboidratos.

Tabela 1 - Classificação e estruturas químicas dos principais antioxidantes naturais.

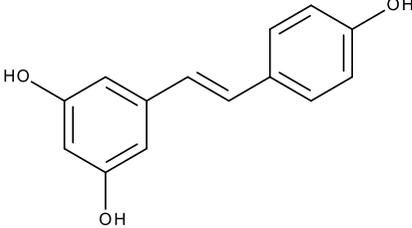
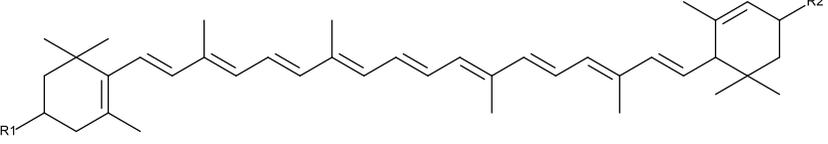
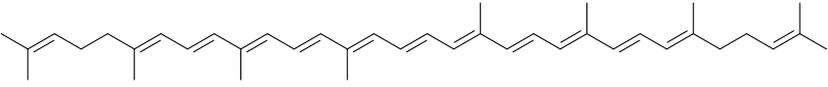
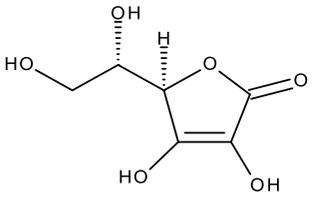
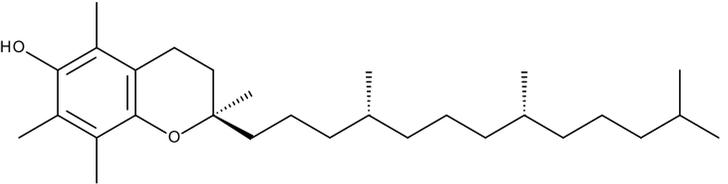
Classe	Subclasse	Principais Compostos	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Fórmula Estrutural	Fonte		
Flavonóides	Flavones	Apigenina	H	H	H	OH	H				
		Crisina	H	H	H	H	H				
		Luteolina	H	H	OH	OH	H				
	Flavonóis	Datiscetina	OH	H	OH	OH	H				
		Quercetina	OH	H	OH	OH	H				
		Miricetina	OH	H	OH	OH	OH				
		Morina	OH	OH	H	OH	H				
		Kaempferol	OH	H	H	OH	H				
		Flavanóis	Catequina	H	OH	OH	OH			H	
	Epicatequina		H	OH	OH	OH	H				
	Flavanonas		Hesperetina	H	H	OH	OCH ₃			H	
		Naringerina	H	H	H	OH	H				
Pinocembrina		H	H	H	H	H					
Flavanonol	Taxifolina	OH	H	OH	OH	H					

Continua...

		A5	A7	R4	
Isoflavonas	Genisteína	OH	OH	OH	
	Genistina	OH	Oglc	OH	
	Daidzeina	H	OH	OH	
	Daidzina	H	Oglc	OH	
	Biochanina A	OH	OH	OCH ₃	
	Formononetina	H	OH	OCH ₃	
		R3	R4	R5	
Ácidos Hidroxiben-zóicos	Ácido Gálico	OH	OH	OH	
	Ácido p-hidroxibenzóico	H	OH	H	
	Ácido Vanílico	H	OH	OCH ₃	
	Ácido Siríntrico	OCH ₃	OH	OCH ₃	
	Ácido Cafeico	OH	OH		
Ácidos Fenólicos	Ácido Clorogênico	Éster de ácido cafeico e ácido quinico			
Ácidos Hidroxicinâmicos	Ácido Ferúlico	OCH ₃	OH		
	Ácido p-cumárico	H	OH		
Álcoois Fenólicos	Tirosol				

Cömert & Gökmen (2018)

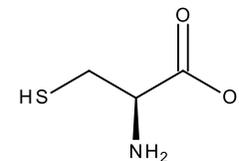
Continua...

Estilbeno	Resverastrol				
Lignanas	Lignanas				
Taninos	Taninos Hidrolizáveis	Elagitaninos			
		Galotaninos			
Carotenóides	Xantofilas	Luteolina	OH	OH	
		Zeaxantina			
	Carotenos	α -caroteno			
		β -caroteno			
		Licopeno			
Vitaminas	Ácido Ascórbico	Ácido Ascórbico			
	Tocoferóis	Tocoferóis			

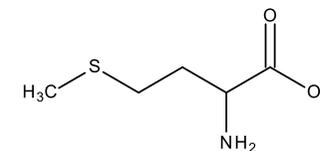
Continua...

**Compostos
de enxofre**

Cisteína



Metionina



Alil-cisteína

Sulfato de
dialilo

Trissulfeto de
alilo

**Compostos
neo-
formados**

Melanóidi-
nas

Melanóidinas

Fonte: Cömert & Gökmen (2018) e Gülçin (2012).

Estes compostos antioxidantes podem ser classificados de acordo com sua função: (i) sequestrantes de radicais livres, (ii) removedores de agentes oxidantes não radicais, (iii) quelantes de metais de transição que catalisam as reações oxidativas e (iv) compostos que são capazes de estimular a produção de compostos antioxidantes endógenos (sinergistas); quanto a polaridade: hidrossolúveis ou lipossolúveis; e quanto ao mecanismo, podendo neutralizar a ação danosa de espécies reativas de membranas celulares, principalmente por três mecanismos: transferência de átomos de hidrogênio (TAH), transferência de elétrons simples (TES) e a capacidade de quelar metais de transição (GRANATO et al., 2018; SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992).

Também é comum classificar antioxidantes como “primário” ou “secundário”. Os antioxidantes primários reagem com radicais livres de alta energia para convertê-los em produtos termodinamicamente mais estáveis. Os antioxidantes secundários, também conhecidos como antioxidantes preventivos, funcionam retardando a taxa de iniciação da cadeia, quebrando os hidróxidos (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992). Os antioxidantes primários atuam de acordo com os mecanismos TAH e TES ou com os dois simultaneamente (GRANATO et al., 2018; AMAROWICZ; PEGG, 2019). O mecanismo TAH ocorre quando um composto antioxidante (AH) extingue as espécies de radicais livres (como o radical peroxil – ROO•) doando átomos de hidrogênio e estabilizando o radical peroxil por ressonância de acordo com a Equação 1:

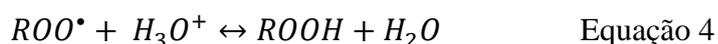
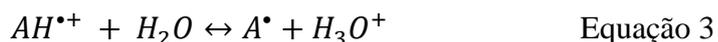


O radical livre gerado nesta reação é muito mais estável que o radical peroxil.

O mecanismo TES ocorre nos casos em que um antioxidante transfere um único elétron para auxiliar na redução de radicais livres, metais pró-oxidantes (como o Fe²⁺ e o Cu²⁺) e as carbonilas. Estas reações são baseadas nas Equações 2, 3 e 4 (AMAROWICZ; PEGG, 2019; GRANATO et al., 2018):



O composto antioxidante radical-catiônico resultante é então desprotonado interagindo com a água:



Segundo Shahidi & Zhong (2015), dentre os métodos comumente utilizados para determinar capacidade antioxidante, os ensaios de TAH incluem a capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC), inibição da lipoperoxidação, ensaio de branqueamento com crocina e ensaio de branqueamento com β-caroteno. Os principais métodos TES são de capacidade antioxidante redutora de íons cúpricos (CUPRAC), capacidade de redução férrica

(FRAP), capacidade de redução do reagente fenol por Folin-Ciocalteu. Enquanto alguns métodos são relatados por medir os dois mecanismos ou ainda tem sido relatado que a ação TAH e TES podem ocorrer simultaneamente. Os principais ensaios são: ensaios de eliminação em relação ao 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) e ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS) (AMAROWICZ; PEGG, 2019).

Compostos fenólicos podem atuar como antioxidantes “secundários” em um processo de quelação ao inibir a oxidação sem interagir diretamente com espécies oxidativas (AMAROWICZ; PEGG, 2019; GRANATO et al., 2018). Os antioxidantes secundários são os inibidores de oxigênio singlete, decompositores de peróxido que produzem espécies não-radicalar, quelantes de metais, enzimas oxidativas, inibidores ou absorvedores de radiação UV. Podem agir ainda com sinergismo aos antioxidantes primários, regenerando-os por doação de hidrogênio, quelantes de cátions de metais de transição pró-oxidantes ou pela supressão do oxigênio molecular (PISOSCHI; POP, 2015).

Alguns estudos tem indicado o potencial antioxidante de própolis vermelha atuando por meio de diferentes mecanismos (AZEVEDO et al., 2018; FROZZA et al., 2013; MENDONÇA et al., 2015; PARK et al., 2000; SILVA et al., 2018; VIUDA-MARTOZ et al., 2008), os quais estão apresentados de forma resumida na Tabela 2.

Tabela 2 - Estudo da arte: Artigos disponíveis na literatura sobre a capacidade antioxidante da própolis vermelha.

Tipo de extrato	Análises	Principais resultados	Autores
Frações separadas por cromatografia do extrato hidroalcoólico (etanol 70:30 v.v ⁻¹) da própolis do estado de Alagoas	%Inibição do DPPH	0,7 a 49%	Trusheva et al. (2006)
Extrato hidroalcoólico (etanol 80:20 v.v ⁻¹) da própolis do estado de Alagoas	%Inibição do DPPH	57%	Alencar et al. (2007)
Extrato hidroalcoólico (etanol 80:20 v.v ⁻¹) da própolis do estado de Alagoas	%Inibição do DPPH	50,5%	Cabral et al. (2009)
	%Proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico	61,3%	
Extrato metanoico da própolis do estado de Alagoas	%Inibição do DPPH	30,62 a 39,12%	Righi et al. (2011)
	%Proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico	84,5 a 85,7% em relação a rutina	
Extrato hidroalcoólico (etanol 80:20 v.v ⁻¹) da própolis do estado de Alagoas	%Proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico	26%	Oldoni et al. (2011)
Extrato etanoico da própolis do estado de Alagoas - Brasil, Cuba e China	%Inibição do DPPH	81,1 a 98,8% em relação ao BHT e α -tocoferol (20 μ g.mL ⁻¹)	Hatano et al., (2012)
	%Inibição do ABTS	54,2 a 90,9% em relação ao BHT e α -tocoferol (1 mg.mL ⁻¹)	

Tipo de extrato	Análises	Principais resultados	Autores
	FRAP	40,7 a 89,2% em relação ao BHT e α -tocoferol ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
	ORAC	4090 a $14900 \mu\text{mol Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$	
Extrato hidroalcoólico (etanol 70:30 v.v ⁻¹) da própolis do estado de Sergipe	CE ₅₀ do DPPH	270,13 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Frezza et al. (2013)
Extrato etanoico, hexano, clorofórmio e acetato de etil da própolis do estado de Alagoas	CE ₅₀ do DPPH	5,15 a 8,01 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Mendonça et al. (2015)
Extratos hidoralcoolicos de própolis por extração por fluidos supercríticos e por baixa pressão (etanol 80:20 v.v ⁻¹) própolis dos estados de Sergipe e Alagoas	CE ₅₀ do DPPH %Inibição do ABTS	44,29 a 183, 11 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 82,80 a 98,50 % (Trolox $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Machado et al. (2016)
Extrato hidroalcoólico (etanol 70:30 v.v ⁻¹) da própolis do estado de Alagoas	Inibição do DPPH Inibição do ABTS FRAP ORAC	4663,80 ($\mu\text{mol Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$ propolis) 2913,55 ($\mu\text{mol Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$ propolis) 633,18 ($\mu\text{mol Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$ propolis) 6665,75 ($\mu\text{mol Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$ propolis)	Andrade et al. (2017)
Extrato hidroalcoólico (etanol 80:20 v.v ⁻¹) e extrato etanoico com fluidos supercríticos das própolis dos estados de Sergipe e Alagoas	%Inibição do ABTS	20 a 81% em relação ao Trolox	Silva et al. (2017)

Outros estudos tem mostrado métodos alternativos para prever ou indicar o potencial antioxidante de própolis, como a espectroscopia no infravermelho associada a métodos quimiométricos, os quais não necessitam de preparo de amostra ou reagentes além de ser tratar de métodos rápidos e precisos (CALEGARI et al., 2017; CALEGARI et al., 2019; REVILLA et al., 2017; SILVA, C. et al., 2018; XU et al., 2013).

2.4. Espectroscopia por Infravermelho

A espectroscopia é um termo geral empregado para designar a ciência que trata e compreende das interações dos diversos tipos de radiação eletromagnética com a matéria, cujo principal objetivo é a determinação dos níveis de energia e transições de espécies atômicas e moleculares (SKOONG; HOLLER; NIEMMAN, 2009).

Segundo Mendham et al. (2002), a maioria dos compostos, orgânicos ou inorgânicos, que possuam ligações covalentes absorvem várias frequências da radiação eletromagnética na região do infravermelho do espectro eletromagnético. Essa região envolve comprimentos de onda entre àqueles associados à luz visível e os associados a micro-ondas.

As radiações nas regiões de ultravioleta e do visível ao incidirem sobre uma molécula, causam transições eletrônicas. A radiação infravermelha age de forma diferente, causando alterações nos modos rotacionais e vibracionais das moléculas. Essas vibrações podem ser classificadas nas categorias de estiramento e deformação. Uma vibração de estiramento envolve uma variação contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos. As vibrações de deformação são caracterizadas por uma variação no ângulo entre duas ligações e são de quatro tipos: deformação simétrica no plano, deformação assimétrica no plano, deformação simétrica fora do plano e deformação assimétrica fora do plano (BARBOSA, 2007; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005; SKOONG; HOLLER; NIEMMAN, 2009). Essas vibrações são mostradas na Figura 2.

Cada tipo de ligação possui sua própria frequência natural de vibração, e como dois tipos idênticos de ligações em dois diferentes compostos estão em dois ambientes levemente diferentes, os padrões de absorção no infravermelho em duas moléculas de estruturas diferentes nunca serão exatamente idênticos. Apesar das frequências absorvidas nos dois casos poderem ser iguais, jamais os espectros infravermelhos de duas moléculas diferentes serão idênticos (PAVIA et al., 2010).

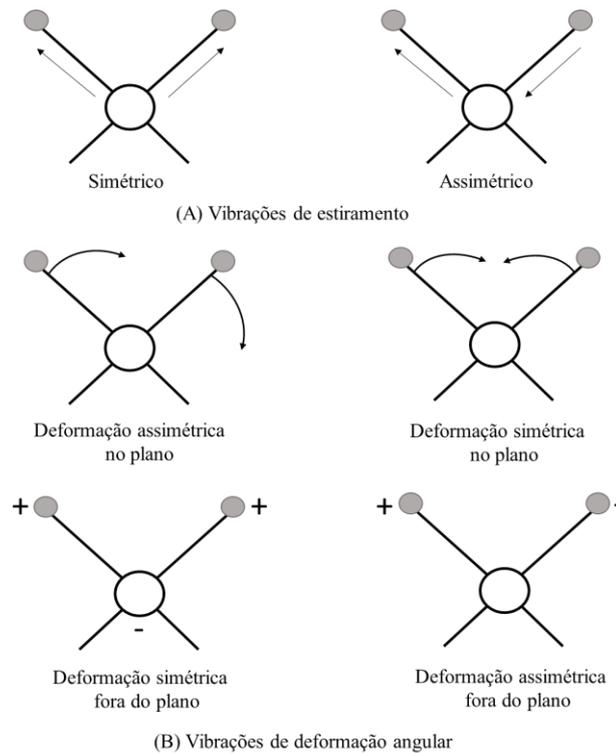


Figura 2 - Tipos de vibrações moleculares. Note que + indica movimento da página em direção ao leitor e - indica o movimento do leitor em direção à página. Fonte: Barbosa (2007) e Skoong, Holler & Nieman (2009).

De acordo com Skoong, Holler & Nieman (2009), a região do infravermelho (IR, do inglês *infrared*) do espectro eletromagnético, compreende a radiação com número de onda que varia de cerca de 12.800 a 10 cm^{-1} , ou com comprimento de onda de $0,78$ a $1.000\text{ }\mu\text{m}$, podendo ser dividida em três partes principais: infravermelho próximo (NIR – Near Infrared - região das harmônicas) $0,78 - 2,5\text{ }\mu\text{m}$ ($12.800 - 4.000\text{ cm}^{-1}$); infravermelho médio (MIR – Middle Infrared - região de vibração-rotação) $2,5 - 50\text{ }\mu\text{m}$ ($4.000 - 200\text{ cm}^{-1}$) e infravermelho distante (FIR – Far Infrared - região de rotação) $50 - 1.000\text{ }\mu\text{m}$ ($200 - 10\text{ cm}^{-1}$).

Os equipamentos sofrem mudanças a partir da utilização de espectrofotômetros com transformada de Fourier (FT), sendo utilizada no processamento de dados, principalmente no IR-médio, possibilitando várias vantagens, entre elas trabalhos com alta resolução, investigações que requerem varreduras rápidas, coleta de dados IR de amostras muito pequenas. Há uma vasta utilização do IR-médio para análises qualitativas, podendo fazer a identificação de grupos funcionais, como também a identificação de uma molécula específica, devido à alta sensibilidade, causando mudanças significativas no aspecto e distribuição de bandas de absorção na região (SKOONG; HOLLER; NIEMMAN, 2009).

Ao contrário da espectroscopia no IR-médio, o maior uso da radiação NIR (infravermelho próximo) são em determinações quantitativas. Os espectros de absorção no NIR são menos úteis para identificação e mais úteis na quantificação de compostos que contenham

grupos funcionais com hidrogênio ligado a carbono, nitrogênio e oxigênio. As bandas espectrais no NIR normalmente são largas e frequentemente sobrepostas. Essa complexidade requer o uso de técnicas de calibração multivariada quando se deseja a determinação de um analito ou uma propriedade a ser investigada em determinado material (SKOONG; HOLLER; NIEMMAN, 2009).

De acordo com Santos (2007), é comum a utilização de métodos estatísticos multivariados no tratamento de dados de espectroscopia, uma vez que a espectroscopia origina uma grande quantidade de dados. Assim, as técnicas quimiométricas permitem extrair essa informação dos espectros, possibilitando identificar padrões de evolução dos materiais em processo, agrupamento de amostras e detecção de amostras anômalas, permitindo também estimar valores de parâmetros analíticos após metodologias de calibração prévia.

González-Martín et al. (2017), avaliando presença de pesticidas em amostras de própolis do Chile e da Espanha, e concluiu que a equação desenvolvida usando a tecnologia do NIRS permitiu a quantificação do pesticida triadimefon em amostras de própolis sem tratamento ou manipulação das amostras ao longo de uma ampla gama de concentrações. Demonstrando que esse procedimento tem excelente potencial para a determinação rápida e econômica de pesticidas na própolis.

Xu et al. (2013) avaliando a detecção da adulteração da própolis chinesa por álamo-balata através da análise FTIR utilizando métodos quimiométricos, observaram que a partir de 2% de adulterante foi possível detecção pelos métodos utilizados.

Calegari et al. (2019) realizaram a calibração multivariada para prever a atividade antioxidante pelo poder redutor de ferro (FRAP) de amostras de própolis com dados de FT-NIR e concluíram que a atividade antioxidante da própolis pode ser estimada com sucesso por meio de uma técnica rápida e não destrutiva, sem qualquer preparação da amostra.

2.5. Quimiometria

Alguns autores tem feito a identificação de origem geográfica, bem como controle de pureza e qualidade da própolis através de quimiometria (GONZÁLEZ-MARTÍN et al., 2017; CHENG et al., 2013). Segundo Kumar et al. (2014), a quimiometria pode ser brevemente descrita como a interação de certos métodos matemáticos e estatísticos em processos de medição química. Foi desenvolvida em decorrência da mudança nos dados obtidos com o surgimento de novas técnicas analíticas e microprocessadores.

Das diversas áreas da quimiometria, pode-se dar destaque ao planejamento de experimentos, o reconhecimento de padrões e a calibração multivariada. No planejamento de experimentos, o objetivo é encontrar as variáveis que mais influenciam em um determinado

processo, bem como a interação entre elas. No reconhecimento de padrões, utiliza-se uma vasta gama de informações (medidas químicas ou espectrais, por exemplo) sobre uma série de objetos, a partir dos quais se deseja encontrar agrupamentos de amostras similares entre si e, assim, detectar tendências nos dados. Já na calibração multivariada, busca-se estabelecer um modelo que relacione uma série de medidas (químicas ou espectrais) realizadas em amostras com uma determinada propriedade (capacidade antioxidante, por exemplo) (SOUZA; POPPI, 2012).

De acordo com Kumar e colaboradores (2014), o objetivo da análise de dados multivariada é determinar todas as variações no estudo da matriz de dados. Logo, as ferramentas quimiométricas tentam encontrar as relações entre as amostras e as variáveis em um determinado conjunto de dados e convertê-las em novas variáveis latentes. A análise multivariada de dados é principalmente classificada em regressão multivariada e métodos de calibração multivariada com base na complexidade dos dados estimados e no objetivo da pesquisa.

Análise multivariada compreende um conjunto de técnicas utilizado em análise de dados que está sempre em expansão e que engloba um vasto domínio de possíveis situações de pesquisa. Entre as técnicas mais utilizadas temos: Análise de Componentes Principais (ACP); Análise de Agrupamento (AG) e Regressão Linear Múltipla (RLM) (HAIR JR. et al., 2009).

Segundo Hongyu, Sandanielo & Oliveira Júnior (2015), a ACP é a técnica mais conhecida da análise multivariada e está associada à ideia de redução de massa de dados, com menor perda possível da informação, consiste em transformar um conjunto de variáveis originais em outro conjunto de variáveis de mesma dimensão denominadas de componentes principais. Os componentes principais apresentam propriedades importantes: cada componente principal é uma combinação linear de todas as variáveis originais, são independentes entre si e estimados com o propósito de reter, em ordem de estimação, o máximo de informação, em termos da variação total contida nos dados.

Esta técnica pode ser utilizada para geração de índices e agrupamento de indivíduos de acordo com sua variação, isto é, os indivíduos são agrupados segundo suas variâncias, representado pela variação do conjunto de características que define o indivíduo (MELO; MATSUDA; ALMEIDA-MURADIAN, 2012).

Outra técnica que visa a redução da dimensionalidade de dados é a AG, também conhecida como análise de conglomerados ou *cluster* tem como objetivo dividir os elementos da amostra ou população, em grupos, de modo que os elementos pertencentes a um mesmo grupo sejam similares entre si em relação a determinadas características e diferentes entre grupos em relação a essas mesmas características (MINGOTI, 2005). Como o objetivo dessa é

agrupar objetos semelhantes, é necessária uma medida da distância entre eles, então os objetos com menor distância entre si são mais semelhantes, logo se encontram em um mesmo grupo. Já os mais distantes participam de grupos distintos (HAIR JR. et al., 2009).

Entre as técnicas que visam realizar a calibração multivariada, temos a análise de Regressão Linear Múltipla – RLM, que tem o objetivo de obter uma equação matemática que pode ser usada para analisar a relação de causa e efeito entre uma única variável dependente (critério ou resposta) e diversas variáveis independentes (preditoras ou explicativas). Essa técnica requer que o número de amostras seja maior que o número de variáveis e é útil também para selecionar as variáveis significativas (variáveis preditoras) e que contribuem para uma melhor descrição do modelo (HAIR JR. et al., 2009).

Segundo Morellato (2010), em vários problemas envolvendo o uso de modelos de regressão as variáveis podem ser altamente correlacionadas ou ainda o número de variáveis pode ser maior que o de observações. Nestas situações, uma alternativa é usar o método de regressão por mínimos quadrados parciais (RMQP). O método de regressão por mínimos quadrados parciais não parte da hipótese de que as variáveis sejam não correlacionadas, e nem requer que os resíduos sigam uma distribuição normal. O método de RMQP utiliza as componentes obtidas, a fim de maximizar a covariância entre as variáveis independentes e as variáveis dependentes (GARCIA; FILZMOSE, 2017).

López e colaboradores (2014), avaliando marcadores fitoquímicos de diferentes tipos de própolis vermelha, utilizaram a ACP para separar amostras com dados de análise de espectroscopia de massa, e observaram a separação de três grupos distintos, o primeiro formado pelas amostras dos estados da Paraíba e Alagoas, o segundo grupo composto apenas por amostras do estado de Sergipe e último grupo com amostras do estado de Roraima, sugerindo assim a variação dos constituintes da própolis de acordo com a fonte vegetal, região e clima.

Salgueiro & Castro (2016), comparando a composição química e a capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde, utilizaram análise de multivariada por meio de análise de componentes principais, e puderam diferir amostras in natura de amostras comerciais, concluindo que a análise exploratória dos dados permitiu a obtenção de informações rápidas e eficientes sobre a similaridade entre as amostras de própolis pela visualização gráfica, indicando assim a sua procedência in natura ou comercial.

Paganotti (2013), avaliando o espectro de UV-Vis das amostras de própolis marrom e verde, utilizando o método de análise de componentes principais conseguiu separar as amostras de acordo com as regiões produtoras, não havendo separação entre as própolis marrom e verde. O mesmo autor cita ainda que ACP identifica a variabilidade bruta e não diferencia variações dentro dos grupos e entre os grupos, assim, realizou a Análise Discriminante, e concluiu que o

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

Cheng et al. (2013) identificaram a origem geográfica da própolis chinesa por métodos quimiométricos, através da análise multivariada pela técnica de agrupamento por análise de componentes principais usando dados de cromatografia gasosa, e conseguiram classificar as amostras de própolis em quatro grupos com base em suas diferentes origens geográficas (Figura 3).

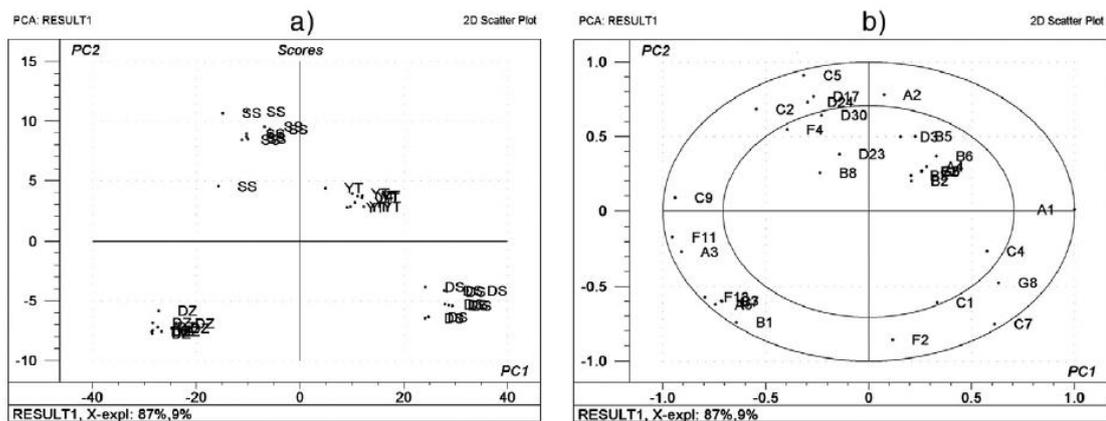


Figura 3 - Gráfico de dispersão PC1 vs. PC2 das principais fontes de variabilidade entre as amostras de própolis; (a) distinção entre as amostras; (b) relação entre os compostos voláteis (variáveis). Fonte: Cheng et al. (2013).

Shawky & Ibrahim (2018) avaliando o controle de qualidade da própolis egípcia usando uma estratégia integrada de análise de imagem NIR e CLAE, e usando ACP, AG e ORMQP-DA puderam estabelecer um padrão de agrupamento baseado nos marcadores bioativos, sugerindo que a abordagem poderia ser implementada para avaliação de rotina (Figura 4).

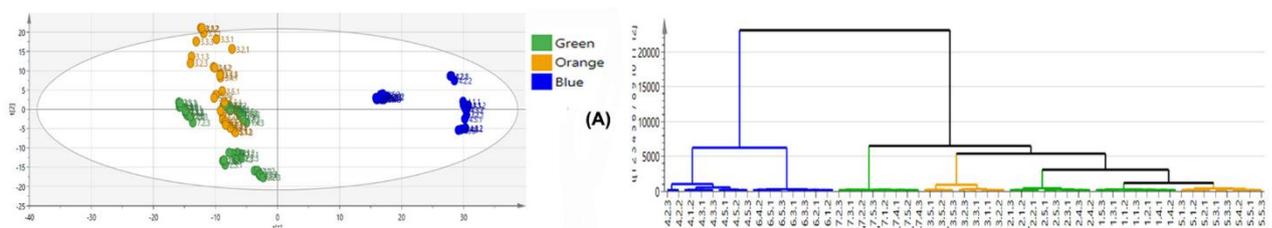


Figura 4 - ORMQP-DA e Análise de Agrupamento para marcadores bioativos da própolis egípcia. Fonte: Shawky & Ibrahim (2018).

Maldonado et al. (2018), analisando diferenças da própolis argentina de diferentes espécies de abelhas e origens geográficas por espectroscopia UV, obtiveram boa separação de grupos por ACP e AG (Figura 5).

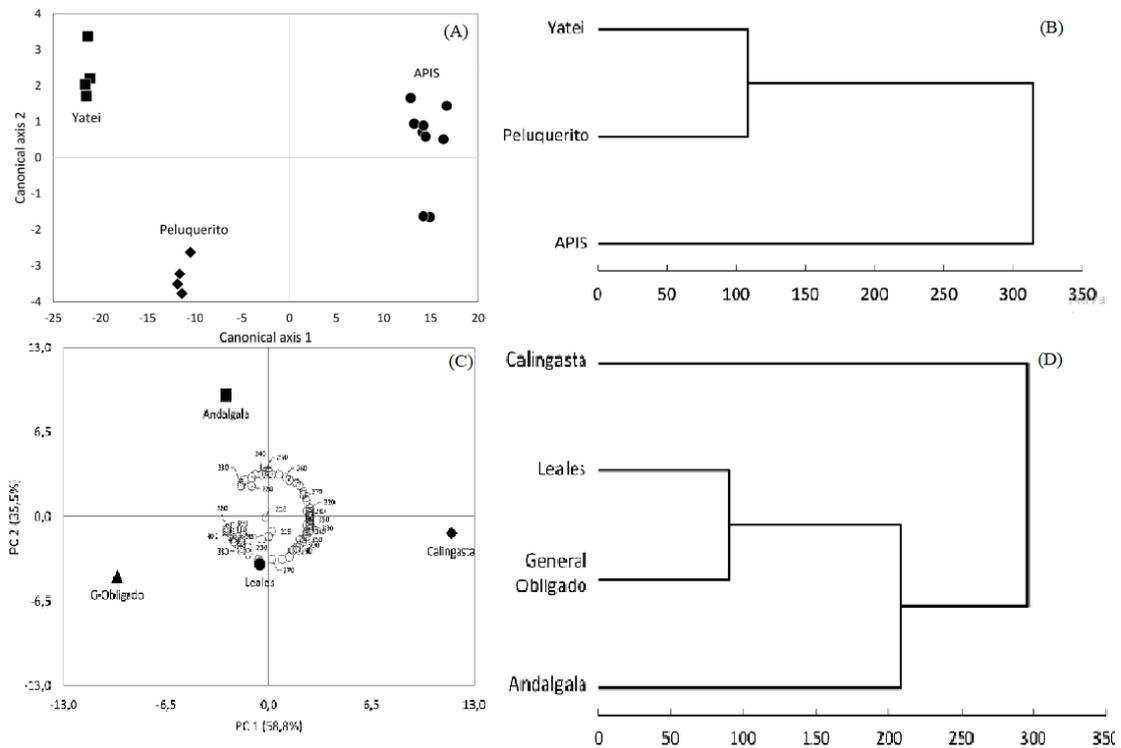


Figura 5 - Diferenciação da própolis argentina de diferentes espécies de abelhas em grupos (A e B) e por diferentes localidades da Argentina (C e D). Fonte: Maldonado et al. (2018).

Calegari e colaboradores (2017), avaliando o efeito da sazonalidade de própolis do sul do Paraná através da atividade antioxidante e perfil de fenólicos por análise de componentes principais, observou a separação de amostras de própolis produzidas nos meses mais quentes daquelas produzidas nos meses mais frios, como também observou a separação de grupos por ACP e uma boa predição por RMQP, ambos com dados de atividade antioxidante através do sequestro de radicais DPPH e ABTS (Figura 6).

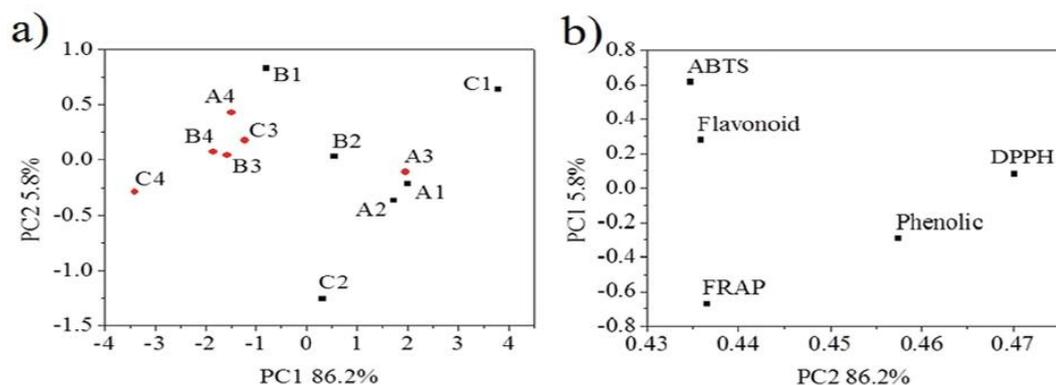


Figura 6 - Agrupamento em um escore PC 2D (a) e gráfico loadings (b) baseado nas variáveis ABTS, DPPH, FRAP, compostos fenólicos totais e flavonóides para própolis coletados em 2013. Fonte: Calegari et al. (2017)

II. OBJETIVOS GERAIS

1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial bioativo da própolis vermelha do estado da Bahia quanto aos constituintes fenólicos e a capacidade antioxidante através de quimiometria.

2. Objetivos Específicos

- Determinar o potencial bioativo das amostras de própolis vermelha quanto à atividade antioxidante;
- Quantificar os constituintes fenólicos e flavonoides totais de amostras de própolis vermelha;
- Avaliar os constituintes fenólicos individuais de amostras de própolis vermelha por meio de CLAE;
- Obter dados de espectros de amostras brutas e extratos hidroalcoólicos de própolis vermelha do estado da Bahia utilizando MIR e NIR;
- Aplicar técnicas de análise multivariada para classificação e agrupamento de amostras de própolis visando seu potencial antioxidante;
- Promover a calibração multivariada utilizando dados de MIR e NIR a fim de determinar o teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante da própolis vermelha.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Material

Foram obtidas 44 amostras de própolis vermelha da região litoral sul do estado da Bahia, Brasil. As amostras foram adquiridas em uma associação de apicultores que abrange produtores das cidades de Canavieiras, Una e Belmonte. Cada amostra foi coletada de uma colmeia e/ou produtor diferente, nos meses de agosto de 2018 (amostras C1 a C16) e maio de 2019 (amostras C17 a C44). Sendo esse período de coleta correspondente a duas estações climáticas diferentes (a primeira coleta em período mais chuvoso e a segunda em período mais seco), garantindo heterogeneidade das amostras por diferentes locais de produção, diferentes produtores, diferentes anos e períodos de produção.

As amostras foram transportadas até a Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, campus de Itapetinga, onde foram armazenadas à -4 °C até a realização das análises.

2. Caracterização das amostras

2.1. Obtenção do extrato

A própolis foi congelada até -4 °C e triturada em um multiprocessador até a obtenção de um pó. 10 g de amostra foram pesados, o volume foi completado para 100 mL de etanol:água 70:30 (v.v⁻¹) e agitado em mesa agitadora Quimis® a 150 rpm à temperatura ambiente por 24 h. Após extração, a mistura foi filtrada com papel filtro qualitativo (80 g.m⁻²) e o solvente foi evaporado em concentrador a vácuo Martin Christ® com temperatura controlada de 40 °C e 1300 rpm até se obter um pó.

O extrato seco foi mantido congelado a -18°C e preparado em diferentes concentrações com etanol a 96% (v.v⁻¹) de acordo com o procedimento analítico a ser adotado.

2.2. Constituintes Fenólicos Totais - CFT

O conteúdo fenólico total foi determinado usando o reagente de Folin Ciocalteau (SINGLETON; ROSSI JR., 1965; SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1998). A reação foi preparada com uma alíquota de 0,5 mL de extrato de própolis (0,4 mg.mL⁻¹), 2,5 ml de solução aquosa de Folin-Ciocalteau a 10% e 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5%. A mistura foi introduzida em banho-maria com regulação térmica a 45°C durante 15 minutos; em seguida, a mistura foi retirada e mantida ao abrigo de luz e temperatura ambiente por 30 minutos. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro (Marca Shimadzu Modelo UV Mini 1240) a 750 nm. A quantidade de constituintes fenólicos totais foi expressa como equivalente de ácido gálico (EAG) (mg EAG / g de amostra ou extrato), através de uma curva

de calibração preparada com soluções de concentrações conhecidas do padrão de ácido gálico (0,01 a 0,1 mg ácido gálico.mL⁻¹ de solução) nas mesmas condições ($\lambda = 750$ nm).

2.3. Constituintes Flavonoides Totais – FT

Os constituintes flavonoides totais foram quantificados por espectrofotometria UV/Vis de acordo com o método descrito por Sakanaka; Tachibana & Okada (2005), utilizando cloreto de alumínio. A análise foi realizada adicionando-se em tubos de ensaio, 0,5 mL do extrato de própolis (1 mg.mL⁻¹), 2,5 mL de água destilada e 0,15 mL de nitrito de sódio 5%. Essa mistura foi homogeneizada por agitação em vórtex e mantida em repouso por 6 minutos a abrigo de luz. Em seguida, foi adicionado 0,3 mL de uma solução metanólica de cloreto de alumínio 10%, a mistura foi novamente agitada e mantida em repouso e abrigo de luz por 5 minutos. Logo depois adicionou-se 1 mL de hidróxido de sódio 1M e 0,55 mL de água destilada afim de se obter um volume final de 5 mL. A leitura de absorvância foi realizada a 510 nm, para o branco utilizou-se etanol absoluto no lugar da amostra. A quantidade de constituintes flavonoides totais foi expressa como equivalente de catequina (mg de eq. Catequina. g de amostra⁻¹), através de uma curva de calibração preparada com soluções de concentrações conhecidas do padrão de catequina (0,02 a 0,51 mg catequina.mL⁻¹ de solução) nas mesmas condições.

2.4. Determinação da capacidade antioxidante *in vitro* pelo método de DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil)

A capacidade antioxidante *in vitro* da própolis foi avaliada utilizando o método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilil (DPPH•) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; MOLYNEUX, 2004). Cinco diluições dos extratos foram preparadas (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg.mL⁻¹) em triplicata. Uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição de extrato foi transferida para tubos de ensaio com 3,9 mL da solução etanólica (etanol - álcool absoluto 99,8%) do radical DPPH•, o qual teve a absorvância inicial ajustada para a faixa de 0,6 a 0,7 em espectrofotômetro a 515 nm. Após 30 minutos de incubação no escuro e à temperatura ambiente, a redução do radical livre DPPH• foi medida através da leitura da absorvância a 515 nm. O mesmo procedimento foi realizado com etanol substituindo a amostra, considerada como branco. O valor de CE₅₀ (concentração necessária do extrato para sequestrar 50% do radical DPPH) foi calculado através da equação linear baseada nas concentrações de extratos e suas respectivas porcentagens de sequestro de radical DPPH.

2.5. Determinação da capacidade antioxidante *in vitro* pelo método de redução do ferro - Poder Redutor (PR)

Avaliou-se o poder redutor conforme o procedimento descrito por Oyaizu (1986), com adaptações. O método fundamenta-se na mudança da coloração amarela da solução composta por complexo Fe^{3+} /ferricianeto, que varia da tonalidade verde para o azul, dependendo do poder de redução de cada substância, ou seja, a presença de agentes redutores (antioxidantes) reduz o complexo para a forma ferrosa (Fe^{2+}). O extrato seco foi diluído em etanol em cinco diferentes concentrações (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Em seguida 1 mL de cada extrato diluído foi adicionado em tubos de ensaio, juntamente com 2,5 mL de solução tampão fosfato 0,2 M (pH 6,6) e 2,5 mL de ferricianeto de potássio a 1% (p.v⁻¹). Posteriormente, a mistura foi incubada a 50°C por 20 minutos. Após a incubação foram acrescidos 2,5 mL de ácido tricloroacético a 10% (p.v⁻¹) e a mistura foi centrifugada a 1000 rpm durante 8 minutos. Um volume de 2,5 mL da mistura foi transferido para outro tubo de ensaio, adicionou-se 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto férrico a 0,1% (p.v⁻¹), submeteu-se o sistema à agitação e em logo após realizou-se as leituras das absorvâncias a 700 nm. O branco foi feito sob as mesmas condições, excetuando-se a amostra.

A concentração do extrato correspondente a 0,500 de absorvância (CE_{50}) foi calculada a partir da representação gráfica da absorvância registrada a 700 nm em função da concentração de extrato correspondente. Neste ensaio, o aumento da absorvância indica um maior poder redutor dos íons férricos que implica em uma maior capacidade antioxidante.

2.6. Determinação da capacidade antioxidante *in vitro* pelo método da co-oxidação do sistema β -caroteno:ácido linoleico – BCAL

O método de análise antioxidante pelo sistema β -caroteno:ácido linoleico utilizado foi descrito por Miller (1971). Para o preparo da mistura reativa, adicionou-se 50 μg de ácido linoléico, 200 mg de Tween 40, 1 mL de solução de β -caroteno a 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em clorofórmio. Posteriormente, a mistura foi submetida ao evaporador rotativo a 50°C por 10 minutos para a completa evaporação do clorofórmio. A esta mistura isenta de clorofórmio, adicionou-se aos poucos 50 mL de água previamente saturada com oxigênio durante 30 minutos agitando-se vigorosamente. A mistura reativa, assim preparada, apresentou absorvância entre 0,6 e 0,7 em 470 nm. Outra mistura reativa foi preparada de forma semelhante com exceção da adição da solução de β -caroteno para o branco.

Alíquotas de 5 mL da emulsão foram transferidos para tubos contendo 0,5 mL dos extratos diluídos a 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em etanol, realizados em triplicata. Feita a mistura os tubos foram agitados e imediatamente lidas as absorvâncias a 470 nm. Após a primeira leitura, os tubos foram incubados em banho-maria a 50 °C para favorecer a reação de oxidação, e em intervalos de quinze minutos até completar 120 minutos, a leitura a 470 nm, foi repetida.

Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da oxidação. A redução da absorbância do sistema sem amostra (Equação 5) é considerada como como 100% da oxidação.

$$\text{Redução da absorbância} = Abs_{\text{inicial}} - Abs_{\text{final}} \quad \text{Equação 5}$$

O decréscimo da leitura da absorbância das amostras é correlacionado com o sistema e estabelece a porcentagem de oxidação (Equação 6), subtraindo-se a porcentagem de oxidação de cada amostra de 100 (Equação 7).

$$\%Oxidação = \frac{[(Redução Abs)_{\text{amostra}} \times 100]}{(Redução Abs)_{\text{sistema}}} \quad \text{Equação 6}$$

$$\%Proteção = 100 - (\%Oxidação) \quad \text{Equação 7}$$

2.7. Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE)

Para o preparo das amostras, os extratos secos foram diluídos em metanol grau CLAE na concentração de 2 mg.mL^{-1} e filtrados em filtro de seringa com membranas de $0,22 \mu\text{m}$. Os experimentos cromatográficos foram realizados com o sistema HPLC-SHIMADZU DGU-20A_{5R}, equipado com um detector UV-DA e de injeção manual, composto por uma coluna de fase reversa C18, $5 \mu\text{m}$, de $25\text{cm} \times 4,6\text{mm}$ de dimensões (SUPELCO ANALYTICAL, SIGMA ALDRICH), com volume de injeção de $20 \mu\text{m}$. A separação cromatográfica foi baseada no método proposto por Park et al. (2002) com modificações. A fase móvel utilizada foi água/ácido acético (19:1, v.v⁻¹) (solvente A) e metanol (solvente B), com fluxo constante de 4 mL.min^{-1} . O gradiente iniciou com 30% do solvente B até 40% de B em 15 minutos, 50% de B em 30 minutos, 60% de B em 45 minutos, 75% de B em 65 minutos, 75% de B em 85 minutos, 90% de B em 95 minutos, 100% de B em 100 minutos e 30% de B em 110 minutos. O tempo de corrida total foi 120 minutos. As substâncias foram determinadas pela comparação com os espectros dos padrões na região ultravioleta de 200 a 400 nm obtidos por meio do detector de arranjo de diodos. A coluna foi mantida a uma temperatura constante de $35 \text{ }^\circ\text{C}$.

Foram utilizados padrões autênticos (Sigma Aldrich) de Ácido Caféico, Ácido Ferúlico, Ácido Clorogênico, Ácido Gálico, Ácido Cumárico, Catequina, Epicatequina, Kaempferol e Quercetina para identificação e quantificação. As Equações da reta, linearidade (R) e a faixa de concentração de cada padrão estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Equações da reta, linearidade (R), faixa de concentração, comprimento de onda e tempo de retenção para cada padrão utilizado na CLAE.

Classe	Padrões	Equação da reta	R	Faixa de concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Comprimento de onda (nm)	Tempo de retenção (min)
--------	---------	-----------------	---	---	--------------------------	-------------------------

Ácidos Fenólicos	Ácido Gálico	$y = 7E-06x$	0,9945	0,2 - 200	270	3,1
	Ácido Cafeico	$y = 3E-05x$	0,9997	1 - 200	270	6,0
	Ácido Clorogênico	$y = 1E-05x$	0,9996	2 - 200	310	4,1
	Ácido Cumárico	$y = 7E-06x$	0,9989	0,2 - 200	310	10,0
	Ácido Ferúlico	$y = 5E-06x$	0,9969	2 - 200	310	10,8
Flavonoides	Catequina	$y = 5E-05x$	0,9952	2 - 200	270	3,5
	Pirocatequina	$y = 2E-05x$	0,9986	6 - 100	270	5,7
	Kaempferol	$y = 2E-05x$	0,9988	2 - 200	270	35,7
	Quercetina	$y = 4E-06x$	0,9957	10 - 200	270	27,5

Os resultados de quantificação dos constituintes fenólicos por CLAE foram expressos em $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de amostra de própolis.

2.8. Espectroscopia de Infravermelho Próximo – NIR

A análise espectroscópica por NIR foi realizada somente nas amostras de própolis bruta por demandar uma quantidade maior de amostra (≈ 20 g) para preencher o fundo copo de Quartzo, quantidade não disponível para os extratos secos. Os espectros foram coletados em espectrômetro NIR (SpectraStar 2500XL, Unity Scientific, Brookfield, CT, EUA) equipado com uma lâmpada de halogênio de tungstênio como fonte de luz e um detector de arseneto de índio-gálio (InGaAs). Os sinais foram gerados no modo de refletância (%R) e transformados em absorbância usando $\log 1/R$. As amostras foram colocadas no compartimento e digitalizadas no intervalo de 1100 a 2500 nm em intervalos de 1 nm. Cada ponto é a pontuação média de 64 varreduras com 1400 pontos. Durante a coleta, a temperatura no laboratório foi mantida em torno de 25°C. O software Unity InfoStar V3.11.3 foi usado para configuração, controle e aquisição de dados do espectrômetro.

2.9. Espectroscopia de Infravermelho Médio – MIR

A análise espectroscópica por MIR foi realizada nas amostras de própolis bruta e nos extratos concentrados. Os espectros foram obtidos por meio do FTIR-ATR: Espectroscopia de Infravermelho Médio com Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (Agilent Cary® 630), utilizando-se a faixa espectral de 4000 a 500 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , 64 scans e leitura por meio do cristal de diamante. Durante a coleta, a temperatura no laboratório foi mantida em torno de 25°C. Cerca de 0,1 g das amostras foram colocadas sobre a superfície

do diamante para a realização da leitura. Antes de cada digitalização foi realizada a leitura do branco, sendo realizada uma leitura sem amostra na superfície. Foram utilizados como variáveis os valores de números de onda onde ocorreram as máximas absorbâncias das bandas.

3. Tratamento de dados

As amostras foram organizadas em conjuntos de dados numéricos, os quais foram manipulados por meio do Microsoft Office Excel. Para a apresentação dos dados de análises convencionais (CFT, FT, DPPH, PR, BCAL e CLAE) foram calculadas médias e desvios-padrão de acordo com as Equações 8 e 9, respectivamente.

$$\mu = \frac{\sum x_i}{n} \quad \text{Equação 8}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \mu)^2}{n}} \quad \text{Equação 9}$$

Onde: μ : média; x_i : valor individual; n : número de observações; σ : desvio padrão.

Para as análises de estatística multivariada, os dados foram padronizados, criando uma variável (Z) com média igual zero e desvio padrão igual a 1 de acordo com a Equação 10, eliminando as diferenças entre as unidades de medidas das variáveis estudadas.

$$Z = \frac{X - \mu}{\sigma} \quad \text{Equação 10}$$

Onde Z : nova variável (forma padrão); X : variável; μ : média; σ : desvio padrão.

4. Análises Quimiométricas

Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa estatístico *Statistical Analysis System* (SAS)[®] *University Edition* para a Análise de Agrupamento (AG), Análise de Componentes Principais (ACP), Análise de Correlações Canônicas (ACC), Análise de Regressão Linear Múltipla (RLM) e Análise de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (RMQP).

4.1. Análise de Agrupamento (AG)

A Análise de Agrupamento (AG) foi baseada na técnica descrita por Mingoti (2005). Essa análise se baseia na formação de aglomerados de amostras com maior homogeneidade intragrupos e maior heterogeneidade intergrupos em relação ao comportamento. Para se proceder o agrupamento, foram adotadas medidas de dissimilaridade, assim, quanto menor seus valores, mais similares são os elementos que foram comparados. O processo foi realizado usando o método de agrupamento de mínima variância (*ward*). Cada passo do agrupamento pelo método de Ward, combina os dois conglomerados que resultam em menor valor da soma

de quadrados entre todos os grupos. Para a determinação do número de grupos em cada método utilizou-se como referência o valor de R^2 , onde valores baixos desse parâmetro indicam perdas de similaridade intragrupos e de Pseudo F. Onde se o valor de Pseudo F for alto em relação aos demais, os dois clusters considerados não devem ser combinados, pois o vetor médio desses dois clusters pode ser considerado diferente.

Para o desenvolvimento da AG foi organizada uma matriz $m \times n$ (linhas x colunas), onde m representa a quantidade de amostras de própolis vermelha e n representa as variáveis analisadas em cada amostra. Para análise de dados do FTIR e NIR foram utilizados como variáveis as absorbâncias associadas aos modos vibracionais responsáveis pelas principais bandas dos espectros.

4.2. Análise de Componentes Principais (ACP)

Para a realização da ACP, os dados foram organizados em uma matriz como descrito para AG (Item 3.2.). A partir dos dados padronizados foi obtida a matriz de variância e covariância (S), que foi fatorada numa matriz diagonal, cujos elementos s iguais a $a_{ii} < \lambda_{ii} = 1, 2, \dots, n$. A matriz foi obtida resolvendo a equação característica da matriz S, Equação 11, contendo autovalores com $\lambda^1 > \lambda^2 > \dots > \lambda^n$.

$$|S - \lambda I| = 0 \quad \text{Equação 11}$$

Em que: S é a matriz de variância e covariância; λ_i é o Autovalor e I é a Matriz Identidade.

Para cada autovalor (λ_i) foi determinado um autovetor α_i a partir da solução da Equação 12:

$$|S - \lambda I| \alpha_i = \emptyset \quad \text{Equação 12}$$

Em que: S é a matriz de variância e covariância; λ_i o Autovalor; I a Matriz Identidade; α_i o Autovetor e \emptyset : conjunto vazio.

A normalização dos autovetores (α_i) foi obtida através da Equação 13.

$$a = \frac{1}{\sqrt{a_{i1}^2 + a_{i2}^2 + \dots + a_{in}^2}} \begin{pmatrix} a_{i1} \\ a_{i2} \\ \vdots \\ a_{in} \end{pmatrix} = \frac{a_{i1}}{a_i} \quad \text{Equação 13}$$

Em que: α_i é Autovetor normalizado;

$\alpha_{i1}, \alpha_{i2} \dots \alpha_{in}$, são autovetores normalizados correspondentes aos grupos estudados; $a_{i1}, a_{i2} \dots, a_{in}$, são autovetores não normalizados correspondentes aos grupos estudados.

Tomando-se os elementos do vetor α_i determinados como os coeficientes CP_i , temos que o i -ésimo CP é obtido pela Equação 14.

$$CP_i = a_{i1}z_1 + a_{i2}z_2 + \dots + a_{in}z_n \quad \text{Equação 14}$$

Em que: $i = 1, 2, \dots, n$, e CP_i : i -ésimo componente principal; $\alpha_{i1}, \alpha_{i2}, \dots, \alpha_{in}$, elementos do i -ésimo autovetor (α_i) do i -ésimo componente principal (CP_i).

4.3. Análise de Correlações Canônicas (ACC)

A análise de correlações canônicas foi realizada com o intuito de observar as relações lineares entre os vetores das variáveis de capacidade antioxidante, de composição com o CLAE e espectroscópicas com o NIR e MIR das amostras e dos extratos, objetivando avaliar a influência dos teores de compostos fenólicos individuais e bandas de máximas absorvências do espectro nos valores de conteúdo fenólico e flavonoide total e capacidade antioxidante primária e secundária (DPPH, poder redutor e proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico) das amostras de própolis vermelha.

Uma combinação linear foi desenvolvida em cada um dos pares de variáveis canônicas dos conjuntos de amostras, para que a correlação entre os dois fosse maximizada e, desta forma, considerou-se as combinações lineares do primeiro par como U (capacidade antioxidante) e V (CLAE, NIR, FTIR da amostra ou do extrato) expressas por:

$$U_k = a_k' X \quad \text{e} \quad V_k = b_k' Y$$

Tal que o valor da correlação (Equação 15) seja a maior possível, ou seja, $\max \text{Corr}(U, V)$, que expressa a máxima associação entre as funções lineares dos dois grupos de variáveis (JOHNSON; WICHERN, 1999).

$$\text{Corr}(U_k, V_k) = \frac{a_k' \Sigma_{xy} b_k}{\sqrt{a_k' \Sigma_{xx} a_k} \sqrt{b_k' \Sigma_{yy} b_k}} \quad \text{Equação 15}$$

Após a obtenção das correlações canônicas foi realizado o teste estatístico F ($p < 0,10$), cuja hipótese de nulidade foi que não há correlação entre os conjuntos de dados para testar a significância dos resultados. Já as cargas canônicas, que se referem às associações entre cada variável original e a correspondente variável canônica, foram obtidas através das correlações estruturais. Foi calculada, ainda, a proporção da variância total que é explicada por cada par de variáveis canônicas e isto permitiu avaliar a relevância deste par no conjunto total dos dados.

4.4. Regressão Linear Múltipla (RLM)

O potencial antioxidante foi correlacionado com a informações da CLAE e de espectros do NIR e MIR usando as principais bandas pelo método de RLM. A análise foi realizada inicialmente para remover amostras consideradas outliers. Em seguida, o conjunto de dados das amostras de própolis vermelha foi dividido em dois subconjuntos usando o algoritmo Kennard-Stone (KS) (KENNARD; STONE, 1969): i) a calibração definida com 70% das amostras, a partir da qual foi estabelecido as funções de regressão; e (ii) o conjunto de validação com os

30% de amostras restantes, que foram utilizadas para verificar a capacidade de generalização das funções formadas na calibração.

Três métodos de otimização foram testados: *Backward*, *Forward* e *Stepwise*. Na técnica *Backward*, todos os preditores são incluídos de uma só vez na equação de regressão gerada e são retirados um por um, em ordem de maiores valores de probabilidade ($p > 0,05$), até que os melhores preditores sejam identificados, ou seja, aqueles que apresentavam significância ($p < 0,05$), além de baixa inflação da variância. Em *Forward*, a equação inicia com apenas um preditor e cada novo preditor que apresenta significância ($p < 0,05$) é adicionado individualmente na equação até que todos os preditores adicionados sejam capazes de explicar o fenômeno em estudo. A técnica *Stepwise* é caracterizada por incluir preditores em blocos até que o melhor modelo gerado se ajuste aos dados (TABACHNICK; FIDELL, 2006).

O modelo MLR foi testado de acordo com a Equação 16.

$$y = \beta_0 + \beta_1 \times x_1 + \dots + \beta_n \times x_n + \varepsilon \quad \text{Equação 16}$$

Onde: y = resposta ou variável dependente (técnica de potencial antioxidante); β_0 = constante (intercepto); $x_1 \dots x_n$ = variáveis explicativas ou independentes (fenólicos individuais ou absorbâncias); $\beta_1 \dots \beta_n$ = parâmetros do modelo (coeficientes de regressão); ε = erros do modelo.

O desempenho dos modelos de RLM obtidos foram avaliados de acordo com a raiz quadrada do erro médio (RMSE), o coeficiente de correlação (R), a relação de desempenho para desvio (RPD) e razão de erro de intervalo (RER), assim definidos como:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad \text{Equação 17}$$

o coeficiente de correlação é:

$$R = \sqrt{1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad \text{Equação 18}$$

a relação de desempenho para desvio é:

$$RPD = \frac{DP}{RMSE} = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}}{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}}} \quad \text{Equação 19}$$

e a razão de erro de intervalo:

$$RER = \frac{\text{Amplitude dos dados de referência}}{RMSE} = \frac{y_{\text{máx}} - y_{\text{min}}}{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}}} \quad \text{Equação 20}$$

onde n é o número de amostras no conjunto de teste, y_i é o resultado de referência medido experimentalmente para a amostra i e \hat{y}_i são os resultados estimados do modelo para a

amostra de teste correspondente i (Equação 17). O coeficiente de correlação (R) entre os valores previstos e medidos foi calculado com a Equação 16, em que y é a média dos resultados de medição de referência para todas as amostras. O RMSE é o erro quadrático médio (Equações 17, 19 e 20). Para a Equação 20, a amplitude é igual aos valores máximo e mínimo determinados na técnica de potencial antioxidante. A melhor das técnicas de pré-processamento foi selecionada escolhendo o modelo RLM com um RMSE baixo, um R alto e um número baixo de variáveis (LIMA et al., 2020).

4.5. Regressão por mínimos quadrados parciais (RMQP)

Os mínimos quadrados parciais (RMQP) são a ferramenta multivariada mais popular para desenvolver um modelo de calibração, a fim de relacionar as informações de interesse de uma amostra ao seu espectro (CHEN; TAN; LIN, 2018). As matrizes contendo os dados fornecidos pelos espectros, denominados X , e o vetor Y contendo o conteúdo a ser predito foram empregados para construir o modelo de regressão. A regressão do RMQP foi realizada após identificação e retirada dos *outliers*.

Os dados foram padronizados e separados em conjuntos de dados de treinamento e validação para cada teste, conforme descrito em 3.5. O número de variáveis latentes nos modelos foi selecionado de acordo com o método proposto no software, sendo o teste de T^2 usado para determinar se dois valores de PRESS eram significativamente diferentes. Não havendo diferença significativa, foram escolhidos mais modelos parcimoniosos e apenas comparados aqueles com menos fatores que o modelo mínimo do PRESS. Após a seleção do número de variáveis latentes, o modelo RMQP gerado foi utilizado para prever os dados de capacidade antioxidante nos dados de validação. Os valores de R , RMSE, RPD e RER foram obtidos para os dados de calibração e validação como descrito para RLM (Item 3.5.).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Constituintes fenólicos e flavonoides totais e capacidade antioxidante

Na Tabela 4 estão apresentados os valores das 44 amostras analisadas para o teor de constituintes fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante por DPPH, poder redutor (PR) e proteção da co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico e suas respectivas médias e desvios-padrão.

Tabela 4 - Potencial antioxidante das amostras de própolis vermelha da Bahia.

Amostra	CFT (mg ácido gálico. g ⁻¹ de extrato seco)	CFT (mg ácido gálico. g ⁻¹ de amostra)	FT (mg catequina. g ⁻¹ de amostra)	DPPH (CE ₅₀ mg. mL ⁻¹ do extrato)	PR (CE ₅₀ mg. mL ⁻¹ do extrato)	BCAL (%Prote- ção do extrato)
C1	180,6438	54,8308	46,4731	0,5485	0,2980	88,0584
C2	169,3688	35,3744	23,3883	0,5555	0,2436	88,0584
C3	184,1031	58,7455	58,1776	0,4793	0,2560	89,6048
C4	111,3015	27,3112	52,5337	0,9030	0,2843	64,9351
C5	193,0719	60,0705	42,8713	0,4293	0,2377	68,3983
C6	219,8500	69,3121	14,5581	0,6559	0,3314	67,9654
C7	182,8219	40,7912	26,3775	0,3199	0,3658	90,5844
C8	207,6781	72,3031	35,4312	1,0535	0,3238	79,9401
C9	236,5063	108,0455	75,5180	0,6402	0,2806	78,2435
C10	214,3406	66,3834	34,5059	0,7169	0,2971	73,8523
C11	151,2620	36,4481	43,7960	0,5749	0,2112	80,1397
C12	187,3295	80,5123	91,2828	0,7039	0,2368	69,1617
C13	188,7035	55,9827	74,6219	0,5774	0,2147	86,0714
C14	198,4360	62,8427	63,0398	0,7909	0,2593	74,0476
C15	84,6781	18,6038	46,7866	1,1869	0,3265	82,3810
C16	176,5438	68,4601	56,9527	0,4284	0,2636	77,2619
C17	170,6458	76,8623	144,9786	0,5635	0,1224	97,8128
C18	183,7025	74,9653	117,5765	0,5961	0,1690	95,5381
C19	197,3810	74,0593	81,3934	0,7051	0,2038	90,3762
C20	204,2203	80,0503	146,6256	0,5677	0,1078	96,8504
C21	210,8523	87,4446	139,6045	0,4567	0,1238	96,0630
C22	160,0760	67,8898	101,5044	0,4540	0,2132	93,7008
C23	265,1063	115,6208	96,7116	0,6123	0,1864	86,3517
C24	240,9648	84,5256	41,3701	0,9275	0,3639	83,2896
C25	202,7028	74,8399	68,3629	0,6887	0,3111	87,9265
C26	231,0576	76,2883	116,3874	0,5588	0,3254	92,5634
C27	194,5038	67,6523	35,3976	0,9635	0,4253	83,1146
C28	248,3666	87,4275	139,6618	0,5066	0,1957	81,6049
C29	150,0925	42,7839	6,5328	1,2011	0,4415	74,9383
C30	226,2749	73,8018	45,8674	0,9169	0,2729	75,5556
C31	217,2788	75,9737	57,1064	0,7902	0,2889	74,6914

C32	208,5104	65,5619	39,7586	0,7932	0,3388	76,1728
C33	211,9266	55,2641	43,4025	0,7692	0,2535	77,0370
C34	184,1411	56,7302	69,7147	0,5650	0,2666	81,6049
C35	228,2108	79,8738	85,7528	0,9650	0,2980	72,7160
C36	208,5104	93,8778	143,5396	0,7410	0,2644	79,4588
C37	240,2815	87,9430	99,4312	0,9222	0,3079	75,6458
C38	235,2710	67,2216	128,3536	0,6697	0,2445	76,1378
C39	244,7226	77,0069	91,4664	0,7107	0,2897	75,7688
C40	213,5209	64,5623	152,3857	0,5341	0,2592	91,9048
C41	166,3971	51,1172	48,6905	1,1399	0,4139	92,3810
C42	170,0240	52,9489	25,5983	1,1089	0,3827	90,6349
C43	201,1115	63,5633	63,3626	0,9252	0,3593	95,0794
C44	253,2349	86,0138	113,1815	0,7857	0,2286	79,6825
Média ±	198,9938 ±	67,6793 ±	73,4099 ±	0,7205 ±	0,2747 ±	82,5751 ±
DP	35,7923	19,3345	40,3895	0,2196	0,0760	8,7777

A legislação brasileira preconiza o teor mínimo de constituintes fenólicos totais em amostras de própolis destinadas ao comércio nacional ou internacional (BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2001) como 5,0% (m.m⁻¹), assim, em média as amostras de própolis vermelha da Bahia apresentaram um percentual de acordo com o estabelecido pela legislação (6,77% m.m⁻¹), embora se tratando de um valor médio, existiram amostras com valores abaixo do estabelecido. Essas amostras foram: C15, C4, C2, C11, C7 e C29. Cinco das seis amostras fora do padrão foram coletadas no período chuvoso, o que sugere que a estação do ano pode ter afetado a qualidade das amostras. A mesma legislação traz como valores mínimos para constituintes fenólicos totais em extrato de própolis, 0,5% (m.m⁻¹). Todos os extratos apresentaram conteúdo de compostos fenólicos acima do mínimo estabelecido (média de 19,90% m.m⁻¹), estando de acordo com a legislação. Em relação aos flavonoides, a legislação traz como teor mínimo aceitável para amostras de própolis 0,5% (m.m⁻¹) e as classifica como de baixo, médio e alto teor de flavonoides quando apresentarem valores de até 1,0%, entre 1,0 e 2,0% e maior que 2,0% (m.m⁻¹), respectivamente. De acordo com a classificação apresentada, as amostras de própolis vermelha estão de acordo com o estabelecido pela legislação e ainda podem ser consideradas como de alto teor de flavonoides, tendo em média apresentado 7,34% (m.m⁻¹) desses constituintes, com exceção das amostras C29 e C6 que apresentaram baixo e médio teores de flavonoides totais respectivamente.

Esses dados foram semelhantes ou superiores aos encontrados na literatura para amostras de própolis vermelha dos estados de Alagoas e Sergipe, com valores variando de 2,58 a 300,36 mg ácido gálico. g⁻¹ de extrato seco para CFT e de 1,02 a 31,48 mg catequina. g⁻¹ de amostra para FT (CABRAL et al., 2009; MACHADO et al., 2016; ANDRADE et al., 2017; CALEGARI et al., 2017; RUFATTO et al., 2018). Os dados foram superiores também aos

reportados para própolis vermelha do Paraná produzidas nos meses de março, maio e junho, onde Calegari et al. (2017) encontraram valores de CFT variando de 36,6 a 48,2 mg ácido gálico. g^{-1} de amostra no mês de março e de 8,54 a 18,3 mg ácido gálico. g^{-1} de amostra nos meses de maio e junho. Os valores de FT ficaram entre 1,02 e 5,56 mg quercetina. g^{-1} de amostra no mês de março e de 0,24 a 1,00 quercetina. g^{-1} de amostra nos meses de maio e junho. Essas informações corroboram com o trabalho pois embora tenhamos amostras heterogêneas entre coletadas em um mesmo período, há uma maior tendência a presença de valores mais elevados de constituintes fenólicos em amostras produzidas em períodos mais secos e quentes como observado também por Calegari et al. (2017). Essa determinação é importante por ser um indicativo de bioatividade da amostra, principalmente por ação antioxidante (AMAROWICZ & PEGG, 2019).

A análise de DPPH indica a ação antioxidante primária, por medir quanto de um radical livre pode ser inibido por um determinado composto, podendo ser inibidos por mecanismos TAH e TES (AMAROWICZ & PEGG, 2019; SHAHIDI & ZHONG, 2015). Os valores de concentração dos extratos necessários para inibir 50% dos radicais DPPH (CE_{50}) foram baixos, em média 0,7205 CE_{50} mg. mL^{-1} demonstrando alta atividade antioxidante primária das amostras, porém ainda maiores que os reportados por Frozza et al. (2013), Mendonça et al. (2015) e Machado et al. (2016) para amostras de própolis vermelha dos estados de Sergipe e Alagoas, com valores variando de 0,005 a 0,27 mg. mL^{-1} .

As análises de poder redutor e percentual de proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico indicam duas formas diferentes de ação antioxidante secundária. A análise de poder redutor mede a capacidade dos antioxidantes de reduzir o complexo férrico ao complexo ferroso (GÜLÇİN, 2012). Já o método de oxidação do β -caroteno/ácido linoléico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Para o Poder Redutor de Ferro, uma concentração baixa de extrato foi requerida para a redução de 50% dos íons ferro presentes, além de se observar o menor desvio padrão entre as análises, demonstrando que todas as amostras de própolis vermelha da Bahia analisadas apresentaram alta capacidade de quelar íons de ferro. Quanto ao percentual de proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico, as amostras analisadas apresentaram, em média, 82,57% de proteção da oxidação das moléculas do sistema presentes, inibindo satisfatoriamente o efeito das condições favoráveis à oxidação que são inseridas durante a análise. Esses dados foram superiores aos encontrados por Cabral et al. (2009), Oldoni et al. (2011) e Righi et al. (2011), os quais obtiveram percentuais de proteção do sistema variando de 26 a 61,3% todos para amostras de própolis vermelha de Alagoas.

Os dados de análises deste estudo sugerem a existência de heterogeneidade entre as amostras, com diferentes valores de constituintes fenólicos e flavonoides, além de variabilidade na capacidade antioxidante das amostras, embora tenham demonstrado alto potencial antioxidante seja por ação primária ou secundária.

2. Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE)

Com o intuito de verificar a composição dos constituintes fenólicos individuais nas amostras, realizou-se a cromatografia líquida de alta eficiência, onde comparou-se os extratos de amostras de própolis vermelha com padrões analíticos das substâncias puras. Na Tabela 5 estão apresentados os resultados da análise de CLAE para as 44 amostras de própolis vermelha da Bahia para cada padrão de constituinte fenólico individual analisado além da média e desvios-padrão para cada constituinte.

Tabela 5 - Compostos fenólicos individuais (mg. 100 g⁻¹) das amostras de própolis vermelha da Bahia quantificados por CLAE.

Amostra	Concentração (mg. 100 g ⁻¹ de amostra)								
	Ácidos Fenólicos					Flavonoides			
	Ácido gálico	Ácido Cafeico	Ácido Clorogênico	Ácido Cumárico	Ácido Ferúlico	Catequina	Pirocatequina	Quercetina	Kaempferol
C1	9,0856	nd	3,7044	nd	nd	nd	7,9485	26,1633	208,1275
C2	8,0266	5,9635	5,3266	nd	nd	nd	11,0882	22,1885	52,8583
C3	nd*	nd	41,6045	36,9285	nd	nd	20,8669	251,6784	nd
C4	46,4689	5,3970	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C5	40,1598	nd	nd	nd	nd	nd	21,6665	10,7457	274,5778
C6	8,7108	11,7663	10,0038	5,6429	7,9750	35,9053	4,1146	65,4758	196,5311
C7	4,8578	nd	14,7968	nd	nd	nd	1,0281	nd	nd
C8	8,4650	nd	3,1330	nd	nd	42,5013	11,6481	41,3306	64,6880
C9	15,6920	nd	20,5998	nd	nd	53,5771	3,1791	28,5002	51,7394
C10	14,8392	nd	nd	nd	nd	30,2525	5,5107	15,3049	383,6715
C11	6,2361	nd	31,2793	nd	nd	nd	4,3966	nd	nd
C12	12,2841	nd	2,8192	nd	nd	nd	nd	73,6447	110,4053
C13	8,8299	nd	5,4322	nd	nd	nd	27,6265	27,5808	36,1567
C14	8,4580	nd	10,3537	8,9091	10,7837	31,1758	3,6312	40,2898	183,0665
C15	8,3728	nd	2,6740	nd	0,7797	33,3966	nd	12,5222	26,3464
C16	8,4242	nd	4,2890	nd	nd	nd	4,9834	21,6566	nd
C17	7,0284	nd	10,5556	nd	nd	nd	4,1596	nd	nd
C18	6,8597	nd	3,4009	nd	nd	nd	2,7643	2,3593	18,6537
C19	4,8594	nd	1,3870	nd	nd	nd	3,4080	19,8422	68,9167
C20	5,9594	4,5274	18,0342	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C21	6,1346	nd	14,9158	nd	nd	nd	2,1876	nd	nd
C22	6,8697	nd	12,3081	nd	nd	nd	2,2889	8,1135	nd
C23	7,6475	nd	0,9420	0,6962	3,1100	nd	nd	40,9647	247,2399
C24	7,6666	nd	1,2400	nd	1,6374	22,0246	3,1230	61,4583	179,0427

C25	7,0892	nd	1,9391	0,4487	0,7610	nd	nd	32,7845	98,0149
C26	4,7783	2,6174	10,1826	nd	nd	18,5052	nd	0,7311	nd
C27	6,3644	nd	1,6567	0,6798	1,0976	nd	nd	41,3129	128,6165
C28	2,2322	nd	0,9779	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C29	4,8276	nd	nd	nd	nd	nd	nd	70,0315	147,5536
C30	8,0658	nd	4,0759	nd	nd	29,5346	nd	71,5460	154,4951
C31	6,6143	nd	nd	nd	nd	nd	nd	59,1289	145,0851
C32	7,3542	nd	2,9432	0,4093	nd	14,3034	nd	67,4213	149,2203
C33	8,1586	nd	nd	nd	nd	nd	2,8299	47,6058	79,6279
C34	2,7792	nd	nd	nd	nd	nd	nd	32,0037	49,9074
C35	7,8847	nd	0,2011	nd	nd	nd	nd	60,0829	154,7175
C36	8,0190	nd	2,2446	0,5227	1,2851	24,7138	nd	78,0957	182,9258
C37	5,1246	nd	nd	0,5247	0,7761	23,3947	nd	61,0702	164,8310
C38	6,0652	3,8649	8,3757	nd	nd	nd	nd	32,1252	80,2682
C39	6,4675	39,9170	6,3873	0,2596	0,1683	nd	48,6215	48,0864	91,5960
C40	2,6382	nd	8,8679	nd	nd	nd	4,5204	nd	nd
C41	5,8891	3,6228	0,6714	0,2378	nd	23,2927	nd	47,5847	96,5087
C42	7,0459	5,5972	0,4243	0,4494	1,0021	26,1935	nd	68,2875	125,5203
C43	4,6240	nd	0,3203	0,4881	0,5236	nd	nd	41,7610	112,5556
C44	6,7070	5,1988	2,5094	0,4438	3,0180	nd	3,4659	69,3429	161,4404
Média ±	8,5917 ±	2,6805 ±	6,0057 ±	1,2313 ±	0,7156 ±	8,8863 ±	5,0285 ±	39,6005 ±	98,2451 ±
DP	7,9952	7,8783	8,4494	5,5933	2,0207	14,6266	9,3712	41,0759	88,6389

*nd: não detectado.

A análise por CLAE mostrou variação na composição química das amostras de própolis vermelha em relação aos padrões analíticos analisados. Esse comportamento é resultado da variabilidade da composição em função de vários fatores naturais e antrópicos, como clima, flora, sazonalidade, horário de coleta, método de coleta, armazenamento, entre outros (ANDRADE et al., 2017; MACHADO et al., 2016; NUNES et al., 2009; PARK et al., 2002; SILVA et al., 2006).

De forma geral, entre os padrões analisados, a concentração de constituintes flavonoides foi maior em relação a concentração dos ácidos fenólicos. Esse dado é desejável já que entre os constituintes fenólicos totais, o grupo dos flavonoides tem demonstrado maior bioatividade em relação aos ácidos fenólicos de acordo com o que é reportado na literatura. Esse comportamento está associado ao maior número de hidroxilas e fenóis presentes nos flavonoides (BRAVO, 1998; CÔMERT; GÖKMEN, 2018). Vale ressaltar que esse levantamento não exclui e/ou diminui o potencial das propriedades bioativas desempenhadas pelos demais constituintes fenólicos. Entre os constituintes quantificados, o kaempferol e a quercetina foram os compostos identificados em maior concentração nos extratos de própolis vermelha, sendo a quercetina considerada como biomarcador desse tipo de própolis (TRUSHEVA et al., 2006; SILVA et al., 2008; LÓPEZ et al., 2014; ANDRADE et al., 2017; RUFATTO et al., 2018) enquanto que a literatura retrata a ausência de kaempferol em amostras de própolis vermelha de outros estados de origem (NUNES et al., 2009; LÓPEZ et al., 2014). Os mesmos estudos relatam ainda que a composição química de amostras de própolis é particular de cada região de origem e que deve ser avaliada minuciosamente em cada caso. Sendo assim, a presença desse constituinte nas amostras de própolis vermelha da Bahia pode ser um diferencial das demais amostras de própolis vermelha do Brasil.

As amostras C4, C7, C11, C17, C20, C21, C28 e C40 não apresentaram detecção para quercetina, um biomarcador. Isso indica que tais amostras podem se tratar de amostras de própolis vermelha de baixa qualidade ou não genuínas. No entanto, para tal afirmação esses dados devem ser contestados e confirmados frente a testes com outros padrões de biomarcadores. Calegari et al. (2017) encontraram maiores concentrações para ácido cafeico, ácido cumárico e ácido ferúlico em amostras de própolis de diferentes tipos e regiões de origem em relação as encontradas no presente estudo. Andrade et al. (2017) observaram valores menores que os determinados para ácido cafeico, catequina, ácido clorogênico, ácido gálico, quercetina, kaempferol e ácido cumárico para amostras de própolis vermelha.

A análise por CLAE demonstra a variabilidade entre as amostras analisadas. Demonstra ainda que, embora algumas amostras não apresentem todos os constituintes fenólicos

analisados, elas apresentam um número elevado de constituintes de interesse quanto à bioatividade, demonstrando uma alta complexidade química das amostras.

3. Espectroscopia de Infravermelho Próximo – NIR

Os espectros de absorvâncias do NIR das amostras de própolis vermelha da Bahia são apresentados na Figura 7.

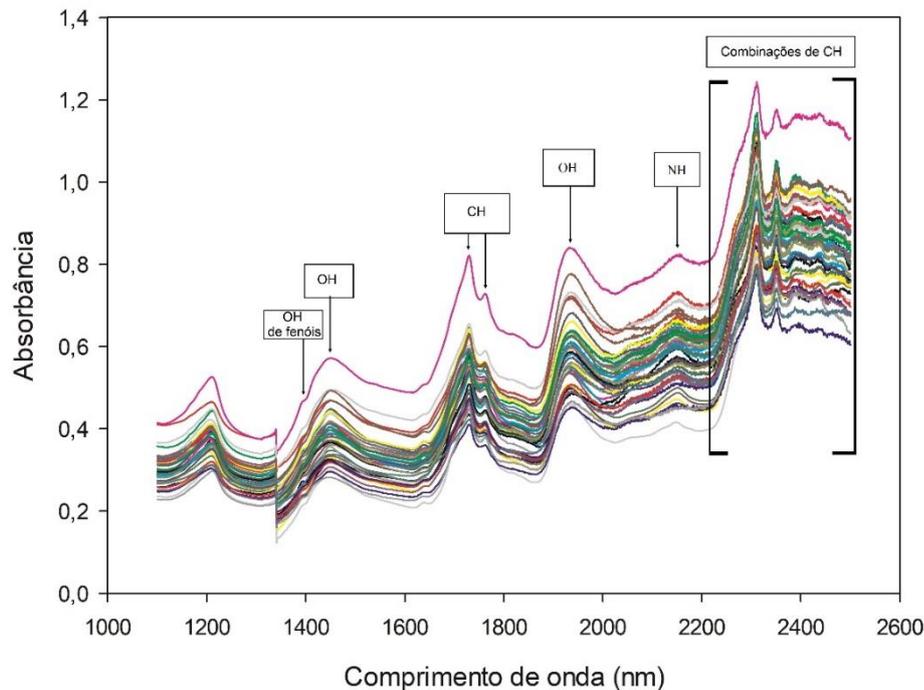


Figura 7 - Espectros de absorvâncias do NIR da própolis vermelha da Bahia.

Na Figura 7 podemos observar um comportamento semelhante entre as amostras com o aparecimento das mesmas bandas apenas com variação de absorvâncias. Uma pequena variação de comportamento é observada apenas na região entre 2000 e 2200 nm, onde se observa a presença de formação de bandas de absorvâncias em apenas algumas amostras e que são referentes a vibrações de amins (WORKMAN JUNIOR, 2000). Essa variação pode ter ocorrido devido à heterogeneidade da composição das amostras, que podem variar de acordo com a colmeia, região, flora e sazonalidade.

De acordo com Skoong, Holler & Niemman (2009), as bandas de espectros no NIR são normalmente largas e apresentam frequentes sobreposições, sendo menos úteis para identificação de compostos (em relação ao MIR) e mais úteis para quantificação de compostos que contenham grupos funcionais com hidrogênio ligado a carbono, nitrogênio e oxigênio. Segundo Mehrotra (2000), Chakravartula et al. (2019) e Ramos-Diaz et al. (2019), na região de

1450 e 1940 nm são observadas as bandas de ressonância das ligações O–H relacionadas à água e carboidratos, entre 2050–2070 nm podem ser relacionados a presença de ligações N–H. A região compreendida entre 2200 e 2500 nm representa as combinações de C–H. Enquanto que as bandas de absorção em 1730, 1770 e 2310 nm correspondem ao grupo C=O e ao grupo C–O e podem ser atribuídas aos lipídios. A determinação de fenóis, álcoois, ácidos orgânicos e hidroperóxidos pode ser baseada na vibração de estiramento O–H, que absorve radiação em cerca de 1400 nm (SKOONG; HOLLER; NIEMMAN, 2009; WORKMAN JUNIOR, 2000).

4. Espectroscopia de Infravermelho Médio – MIR

Os espectros de absorbâncias do MIR das amostras brutas e do extrato seco de própolis vermelha da Bahia estão mostrados na Figura 8.

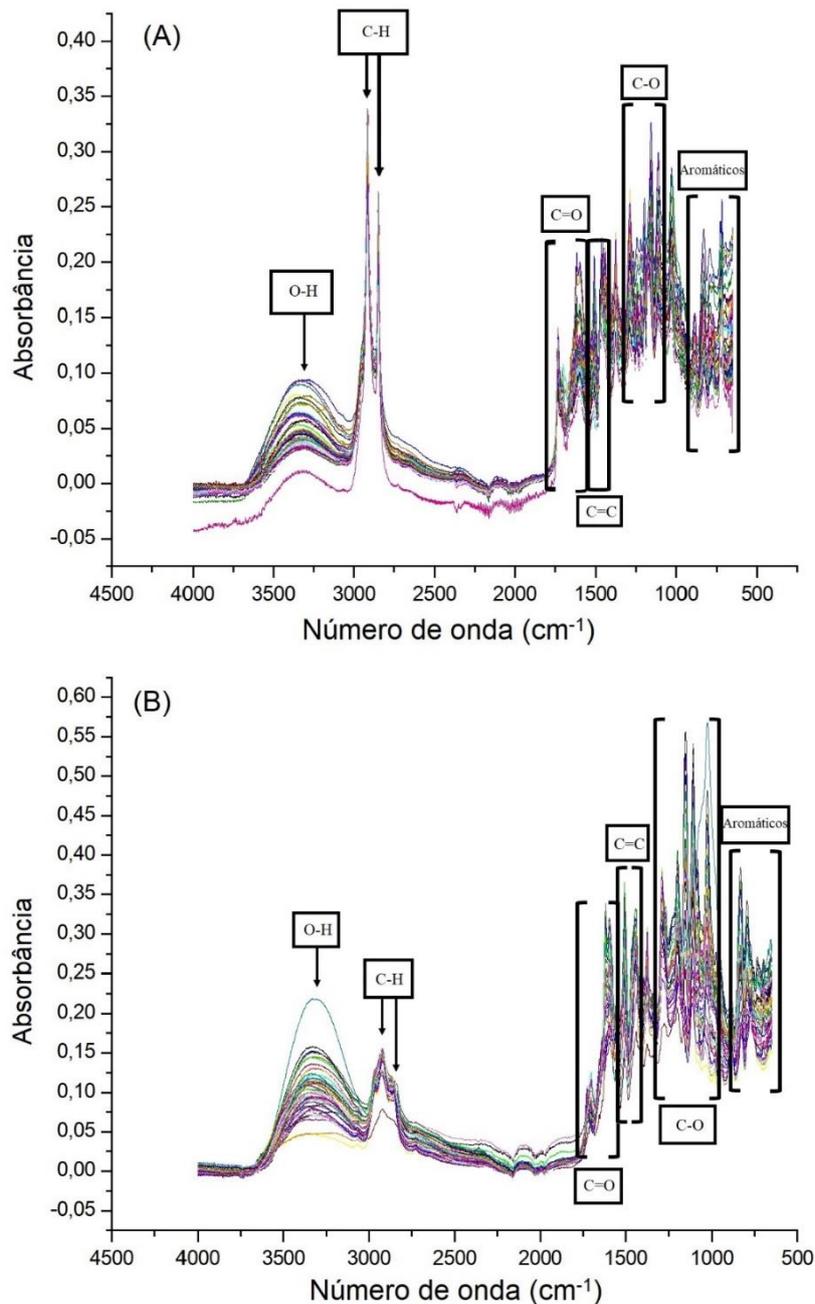


Figura 8 - Espectros de absorvâncias no MIR da amostra bruta (A) e do extrato seco (B) da própolis vermelha da Bahia.

De acordo com as Figuras 8A e 8B, pode-se observar o comportamento espectral das amostras brutas e das amostras de extrato seco, respectivamente. A principal diferença entre os dois gráficos está na intensidade da absorvância na região de impressão digital, que aumentaram no extrato seco. Além de uma diminuição das absorvâncias das bandas referentes aos comprimentos de onda de 2916, 2849 cm⁻¹ (alongamento de vibrações de grupos CH), 1736 cm⁻¹ (alongamento de vibrações das carbonilas de ésteres) e 1467 cm⁻¹ (vibrações de hidrocarbonetos) (BARBOSA, 2007; SKOONG; HOLLER; NIEMMAN, 2009). Esses grupos

funcionais citados são atribuídos à cera de abelha segundo Mazur et al. (2019). As bandas ainda presentes no extrato seco nessa região citada indicam a presença de alcanos proveniente de outros compostos como também de resíduo de cera e resina remanescente nas amostras. Essa região apresenta várias bandas de estiramentos simétrico e assimétrico das ligações CH de grupos CH₃, CH₂ e CH de alcanos e de grupos alquilas (BARBOSA, 2007; SKOONG; HOLLER; NIEMMAN, 2009). Silverstein, Webster & Kiemle (2005), associam essas bandas com lipídeos.

A região entre 3590 a 3200 cm⁻¹ tem sido associada principalmente à água, álcoois, fenóis e outros compostos aromáticos contendo grupo OH, tendo como característica uma banda larga (BARBOSA, 2007). Segundo Skoong, Holler & Niemman (2009), as bandas que compreendem os comprimentos de onda de 1760 a 1690 cm⁻¹ são relacionadas a vibrações de aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos e ésteres, os quais contém o grupo C=O e ainda esses mesmos compostos absorvem energia vibracional de 1300 a 1050 cm⁻¹ devido aos grupos de C-O. Ainda de acordo com os mesmos autores, a região de 1600 a 1500 cm⁻¹ absorve energia das ligações de C=C de anéis aromáticos, sendo também os anéis aromáticos responsáveis por vibrações fortes de 900 a 600 cm⁻¹, variando as bandas de acordo com o quantidade e a conformação das substituições dos benzenos (BARBOSA, 2007; SKOONG; HOLLER; NIEMMAN, 2009). Nota-se que essas bandas de absorbância são devido principalmente a ligações presentes abundantemente nos compostos antioxidantes, como insaturações e presença de anéis aromáticos (CÖMERT; GÖKMEN, 2018; GÜLÇİN, 2012). Então, o aumento das absorbâncias dessas bandas no extrato seco indica que há maior concentração desses compostos em relação as amostras brutas.

5. Análises Quimiométricas

Diante do número alto de variáveis obtidas e a fim de classificar amostras de própolis vermelha da Bahia de acordo com a qualidade antioxidante, realizou-se análises estatísticas multivariadas. O intuito dessas análises foi: i) separar em grupos, amostras de acordo com a capacidade antioxidante, usando Análise de Agrupamento, Análise de Componentes Principais e Análise de Correlações Canônicas; e ii) realizar a calibração de modelos matemáticos que possam prever essa atividade usando dados de espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) e médio (MIR).

5.1. Análise de Agrupamento

A Figura 9 apresenta o dendograma de agrupamento das amostras de própolis vermelha do estado da Bahia de acordo com os dados de capacidade antioxidante (Constituintes fenólicos totais, flavonoides totais, DPPH, poder redutor e sistema β -caroteno/ácido linoleico).

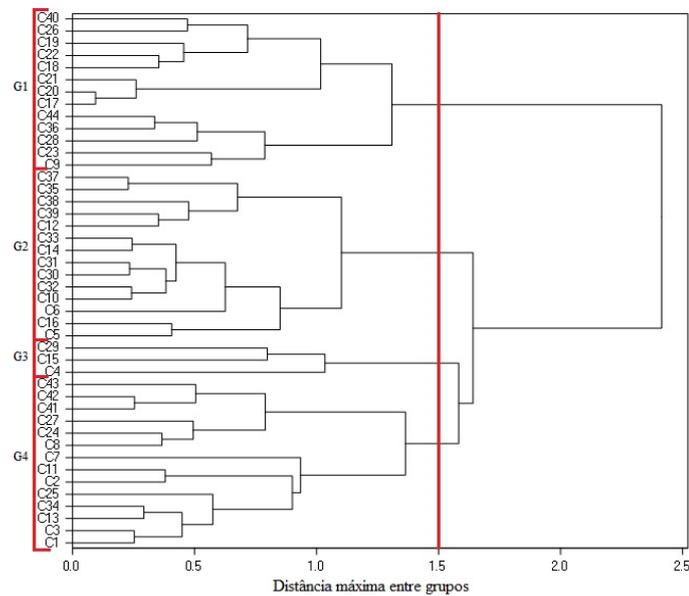


Figura 9 - Dendograma de agrupamento das amostras de própolis vermelha do estado da Bahia de acordo com os dados de capacidade antioxidante.

De acordo com a análise de agrupamento utilizando os dados de capacidade antioxidante (Figura 9), pode-se observar a formação de quatro grupos de amostras de acordo com os valores de R^2 e Pseudo F. Já segundo os valores médios em cada grupo das variáveis originais, observa-se que o primeiro grupo é composto pelas amostras que apresentaram maior capacidade antioxidante, apresentando maiores valores de constituintes fenólicos e flavonoides totais além de maior capacidade antioxidante primária e secundária dentre todas as amostras. O segundo grupo é composto por amostras com alto teor de fenólicos totais e alta capacidade de redução de íons de ferro (menor CE_{50} para PR), porém com menores valores de proteção do BCAL entre as demais amostras. O terceiro grupo compreende as amostras que de forma geral, apresentaram menor capacidade antioxidante. Esse grupo compõe os menores valores de CFT e FT além de possuir menor capacidade antioxidante tanto primária quanto secundária. O quarto grupo apresenta amostras com valores médios de CFT e FT, baixa capacidade antioxidante primária e secundária por PR, porém são amostras com alto potencial de proteção do BCAL. Vale ressaltar que esses grupos foram formados comparando-se valores entre as amostras analisadas e que embora sejam citadas como de menor ou maior capacidade antioxidante ainda apresentam valores da capacidade antioxidante maiores que os encontrados em própolis vermelha em outros

trabalhos (CABRAL et al., 2009; MACHADO et al., 2016; ANDRADE et al., 2017; CALEGARI et al., 2017; RUFATTO et al., 2018).

Esses resultados apontam que a análise multivariada de agrupamento pode ser um método de triagem de capacidade antioxidante da própolis, unindo vários resultados de análises laboratoriais de modo que se possa levar a uma conclusão classificatória a respeito dessa qualidade geral, o que muitas vezes não é possível quando se avaliam individualmente os resultados analíticos.

Na Figura 10 o dendograma de agrupamento das amostras de própolis vermelha do estado da Bahia de acordo com os dados quantificados por CLAE está apresentado.

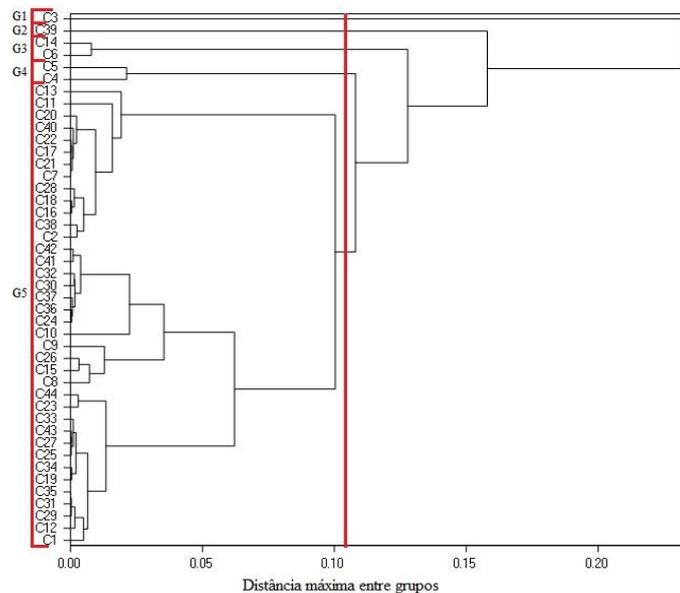


Figura 10 - Dendograma de agrupamento das amostras de própolis vermelha do estado da Bahia de acordo com os dados quantificados por CLAE.

Com os dados de análise cromatográfica acerca da composição dos fenólicos individuais podemos observar a formação de 5 grupos, sendo o primeiro formado por uma única amostra (C3), que se destacou por apresentar dentre todas as outras, as maiores concentrações de ácido clorogênico, ácido cumárico e quercetina e um dos maiores teores de pirocatequina. O segundo grupo, formado também por apenas uma amostra (C39) que apresenta a maior concentração de ácido cafeico além de teores elevados para a maioria dos fenólicos analisados. O terceiro grupo (C14 e C6) é composto pelas amostras com os maiores teores de ácido cumárico, ácido ferúlico e altos valores para kaempferol, quercetina e catequina. O quarto grupo (C4 e C5) representa as amostras com maiores teores de ácido gálico. Já o quinto grupo, composto pelas demais amostras, representa as amostras que, embora não tenham apresentado as maiores concentrações de nenhum padrão específico, se destacaram com valores altos para a maioria dos constituintes fenólicos individuais testados.

Assim, podemos indicar as amostras presentes nos quatro primeiros grupos como as melhores, do ponto de vista de composição de fenólicos individuais e as amostras presentes no quinto grupo como as de qualidade média a inferior. Esses dados não corroboram com o agrupamento gerado para dados de capacidade antioxidante, o que pode apontar que além dos constituintes fenólicos quantificados podem estar presentes outros constituintes não quantificados e que desempenhem papel significativo nessa atividade.

Na Figura 11 observa-se o dendograma de agrupamento das amostras de própolis vermelha do estado da Bahia de acordo com os dados observados por NIR da própolis bruta.

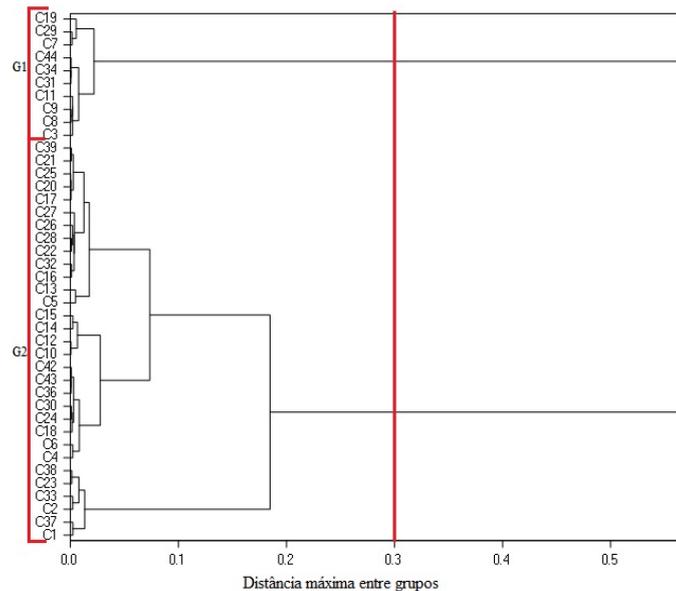


Figura 11 - Dendograma de agrupamento das amostras de própolis vermelha do estado da Bahia de acordo com os dados observados por NIR.

Podemos observar a formação de dois grupos, sendo o primeiro grupo composto pelas amostras que apresentaram menores absorvâncias para todas as bandas selecionadas com destaque para a banda em 1397 nm, a qual está associada a vibrações de OH de fenóis o que sugere que essas amostras dispõem de menores concentrações de compostos que contenha esse grupo funcional. Ao associar esses dados com os das análises convencionais (CFT e FT), é possível verificar que existem amostras com baixos valores quantificados para esses compostos porém essa contestação não se aplica a todas, havendo algumas amostras que apresentaram altos teores de CFT e FT mesmo apresentando baixas absorvâncias na região de vibração desses grupos funcionais. Esse comportamento pode ser decorrente do processo de extração para a análise convencional, que concentra esses compostos bioativos e remove compostos indesejados os quais foram também medidos na análise por NIR visto que se analisou somente amostras de própolis bruta. O segundo grupo é composto pelas amostras que apresentaram

maiores absorvâncias nas bandas selecionadas, havendo também nesse grupo variação entre a composição fenólica e a capacidade antioxidante das amostras.

Assim, como essa análise se baseia na variação de absorvâncias de grupos funcionais relativos a diferenças na composição química das amostras, esses resultados sugerem a sensibilidade da espectroscopia no infravermelho próximo para o agrupamento de amostras com características químicas semelhantes porém a análise de agrupamento utilizando dados de NIR pode não ser a análise mais indicada para seleção e triagem de amostras quanto a composição fenólica e capacidade antioxidante.

A Figura 12 apresenta o dendograma de agrupamento das amostras de própolis vermelha do estado da Bahia de acordo com os dados observados por MIR.

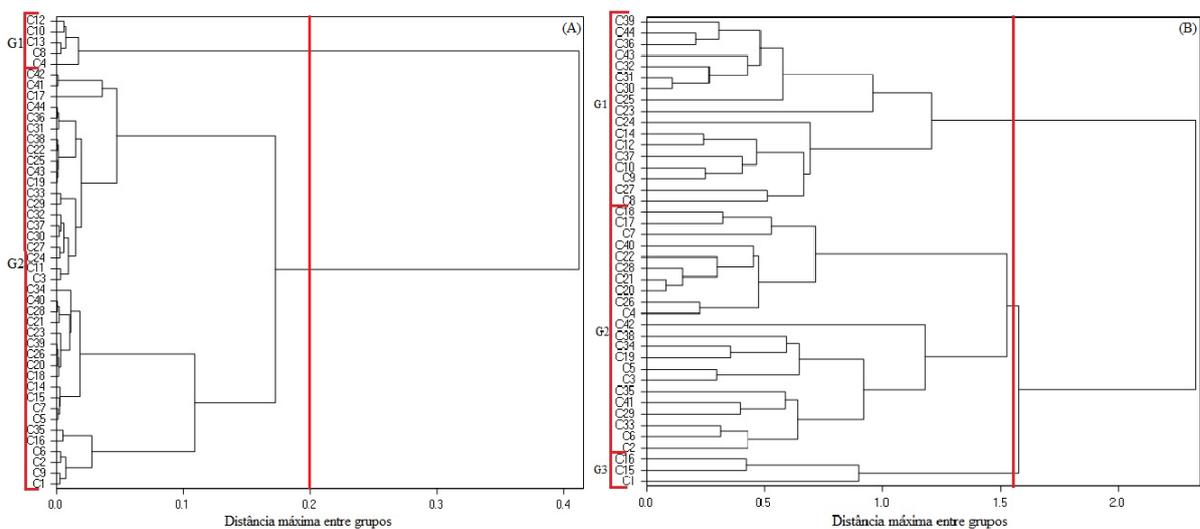


Figura 12 - Dendograma de agrupamento das amostras de própolis vermelha do estado da Bahia de acordo com os dados observados por MIR das amostras brutas (A) e dos extratos (B).

Na Figura 12A podemos observar o dendograma gerado com dados do MIR das amostras brutas com a formação de dois grupos de amostras. O primeiro grupo corresponde as amostras que apresentaram os menores valores de absorvâncias nos comprimentos de onda de 2916, 2849 e 1737 cm^{-1} os quais podem ser associados a menores concentrações de cera nessas amostras (MAZUR et al., 2019). Ainda esse grupo se destacou por apresentar maiores absorvâncias nos comprimentos de onda associados a vibrações de anéis aromáticos, aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos e ésteres o que pode indicar maior presença de compostos bioativos. Já com os dados obtidos do MIR dos extratos secos (Figura 12B), podemos observar a formação de três grupos. O primeiro grupo é formado pelas amostras com maiores absorvâncias nas bandas associadas a vibrações de grupos funcionais da cera (MAZUR et al., 2019) e também maiores absorvâncias nas bandas associadas a vibrações de anéis aromáticos, aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos e ésteres. Esse grupo de amostras apresenta teores médios

dos compostos fenólicos e flavonoides totais, alta capacidade antioxidante secundária por PR e média por BCAL, porém baixa capacidade antioxidante primária entre as amostras analisadas. As amostras que compõe o segundo grupo apresentam, majoritariamente, melhor capacidade antioxidante primária e secundária. Essas amostras apresentaram absorbâncias mais baixas para todos as bandas selecionadas no espectro. O último grupo é composto por amostras com os menores valores de capacidade antioxidante. Vale ressaltar que em todos os grupos pode ser observada a presença de amostras com características antioxidante diferentes da composição majoritária dos elementos do grupo.

Os resultados de separação de grupos indicam que a análise do extrato seco por MIR pode ser mais eficiente como método de triagem de capacidade antioxidante em relação a análise realizada com dados do MIR das amostras de própolis bruta. Esse comportamento provavelmente se dá devido a maior concentração e purificação dos compostos bioativos que são associados a maior capacidade antioxidante, o que facilita a separação de grupos no extrato seco.

5.2. Análise de Componentes Principais

Na Figura 13 está apresentado o gráfico de dispersão dos Componentes Principais (CP) das amostras de própolis vermelha do estado da Bahia de acordo com os dados de capacidade antioxidante. A CP1 foi responsável por explicar 51,39% da variabilidade dos dados e está correlacionada positivamente com os constituintes fenólicos e flavonoides totais e negativamente com o CE_{50} da redução do DPPH e do poder redutor de ferro (Figura 13A). Isso indica que quanto maior o valor de uma amostra para CP1, maior será seu conteúdo de constituintes fenólicos e flavonoides e menor será seu valor de CE_{50} para redução do DPPH e do poder redutor de ferro, o que é desejável para maior qualidade das amostras. A CP2 explicou 19,16% da variação total dos dados e está correlacionada negativamente com percentual de proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico, indicando que quanto menor o valor de CP2, maior a proteção da amostra com o sistema β -caroteno/ácido linoleico. Logo, as melhores amostras devem apresentar valores altos de CP1 e baixos de CP2.

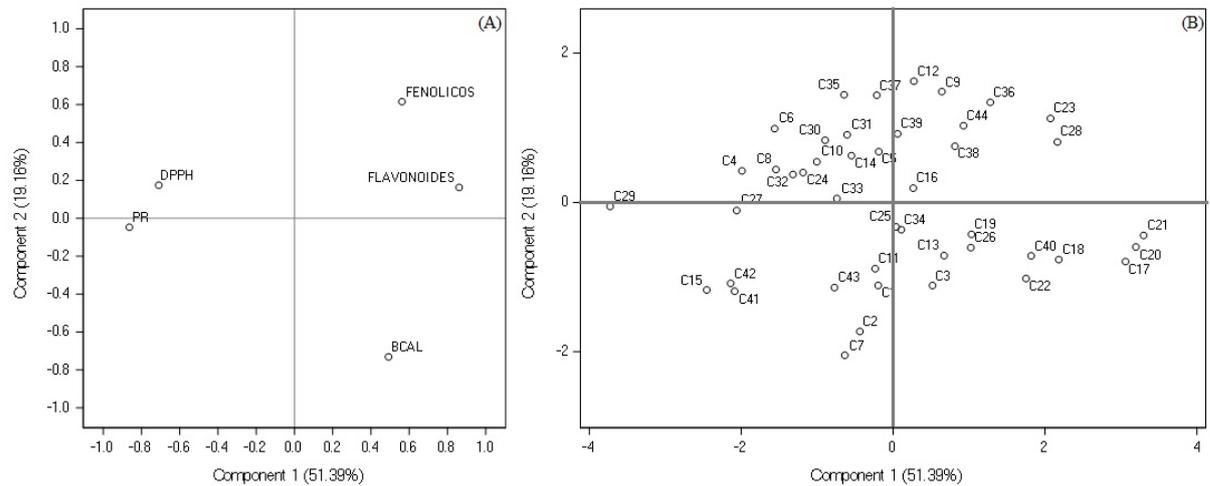


Figura 13 - Dispersão dos Componentes Principais 1 e 2 das variáveis (A) e das amostras (B) de própolis vermelha do estado da Bahia de acordo com os dados de atividade antioxidante.

De acordo com a Figura 13B, as amostras com maior capacidade antioxidante estão localizadas no quadrante inferior direito, as quais unem baixo CE_{50} de DPPH, poder redutor, alto teor de constituintes fenólicos e flavonoides totais e alto percentual de proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico. As amostras localizadas no quadrante superior direito embora apresentem baixo CE_{50} de DPPH, poder redutor, alto teor de constituintes fenólicos e flavonoides totais não desempenham uma proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico tão alta quanto as anteriormente citadas. As amostras dispersas no quadrante superior esquerdo podem ser consideradas as que possuem a pior capacidade antioxidante entre as amostras, com maior CE_{50} de DPPH, poder redutor, menor teor de constituintes fenólicos e flavonoides totais e menor percentual de proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico. Já as que se encontram no quadrante inferior esquerdo, embora possuam maior CE_{50} de DPPH, poder redutor, menor teor de constituintes fenólicos e flavonoides totais entre as amostras, apresentam alto percentual de proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico. A maioria das amostras que se encontraram fora dos padrões da legislação para conteúdo fenólico encontram-se nesse quadrante, indicando que embora o menor teor de constituintes fenólicos totais não influenciou tanto no potencial de proteção da co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico quanto influenciou no poder redutor de íons de ferro (PR) e na estabilização de radicais livres oxidantes (DPPH).

Esses dados mostram semelhança com a Análise de Agrupamento (AG) em relação a dispersão das amostras, no entanto com a ACP tem-se um maior detalhamento desse comportamento de dispersão por indicar o motivo dessa separação de grupos.

Na Figura 14 temos apresentado o gráfico de dispersão dos CPs das amostras de própolis vermelha do estado da Bahia de acordo com os dados quantificados por CLAE. A CP1 foi

responsável por 28,06% da variabilidade dos dados e está positivamente correlacionada com o teor de ácido cumárico, quercetina e ácido clorogênico (Figura 14A). Já a CP2 representou 20,99% da variabilidade dos dados e está positivamente correlacionada com o teor de kaempferol, ácido ferúlico e catequina. O ácido gálico, a pirocatequina e o ácido cafeico somente apresentaram alta correlação com os demais CPs que possuem baixa explicação dos dados, provavelmente por não apresentarem variação expressiva entre as amostras a ponto de promover a sua separação.

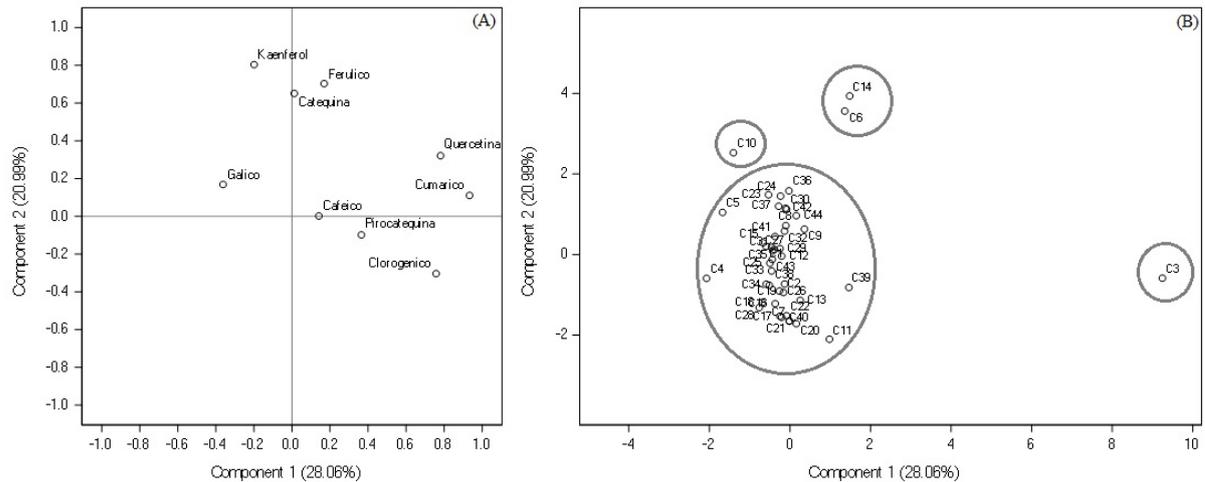


Figura 14 - Dispersão dos Componentes Principais 1 e 2 das variáveis (A) e das amostras (B) de própolis vermelha do estado da Bahia de acordo com os dados quantificados por CLAE.

Os grupos formados pela dispersão das amostras (Figura 14B) foram semelhantes aos formados na AG, com destaque para a amostra C3, que apresentou maior teor de ácido clorogênico, ácido cumárico e quercetina, variáveis altamente correlacionadas com CP1. A amostra com maior teor de kaempferol foi C10 e encontra-se separada das demais. Já as amostras C6 e C14 apresentam altos teores de kaempferol e catequina e encontram-se agrupadas. As demais amostras não apresentaram diferença significativa nos teores de fenólicos individuais a ponto de promover separação.

Na Figura 15 temos apresentado o gráfico de dispersão dos CPs das amostras de própolis vermelha do estado da Bahia de acordo com os dados do NIR da própolis bruta.

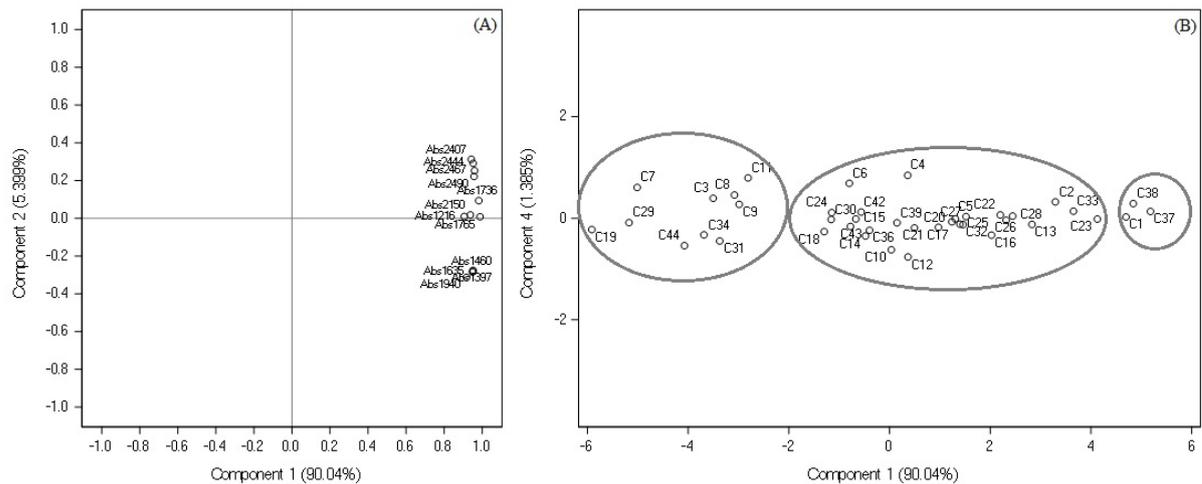


Figura 15 – Dispersão dos Componentes Principais 1 e 2 das variáveis (A) e das amostras (B) de própolis vermelha do estado da Bahia de acordo com os dados quantificados por NIR.

Para a análise de Componentes Principais com dados do NIR foram selecionadas as principais bandas do espectro, 15 no total, tendo posteriormente a remoção de três variáveis por apresentarem alta correlação com CP1 e CP2, o que dificultou a avaliação da dispersão dos dados. As doze variáveis restantes apresentaram alta correlação com CP1, que explicou 90,04% da variabilidade dos dados e é um descritor geral dos dados. A dispersão gráfica mostra a possibilidade de se dividir as amostras em três grupos distintos e que, em partes se assemelham aos grupos formados na AG, sendo o primeiro grupo, da esquerda para a direita, composto pelas amostras que apresentaram menores absorvâncias nas bandas selecionadas. Essas amostras apresentaram ainda baixa capacidade antioxidante primária. O segundo grupo contém amostras com elevada e baixa capacidade antioxidante mostrando uma limitação da ACP quando os dados do NIR são utilizados. O terceiro grupo é composto por amostras com capacidade antioxidante intermediária.

Na Figura 16 temos a dispersão das amostras de própolis vermelha do estado da Bahia pelos CPs de acordo com os dados do MIR. A partir das bandas selecionadas dos dados obtidos por MIR das amostras brutas de própolis vermelha (21 variáveis no total) a ACP foi realizada. Dessas variáveis iniciais, uma apresentou alta correlação com as duas CPs que explicavam a maior parte da variação dos dados, o que não é desejável, por dificultar a interpretação gráfica bem como dificultar a dispersão dos dados. Essa variável foi removida e a análise foi novamente realizada. Para os dados de MIR dos extratos secos, inicialmente foram utilizadas 22 variáveis, que eram os principais modos vibracionais identificados no espectro. Observou-se que 7 dessas variáveis se mostraram altamente correlacionadas com as duas CPs que explicavam a maior parte da variação dos dados, sendo então descartadas da análise.

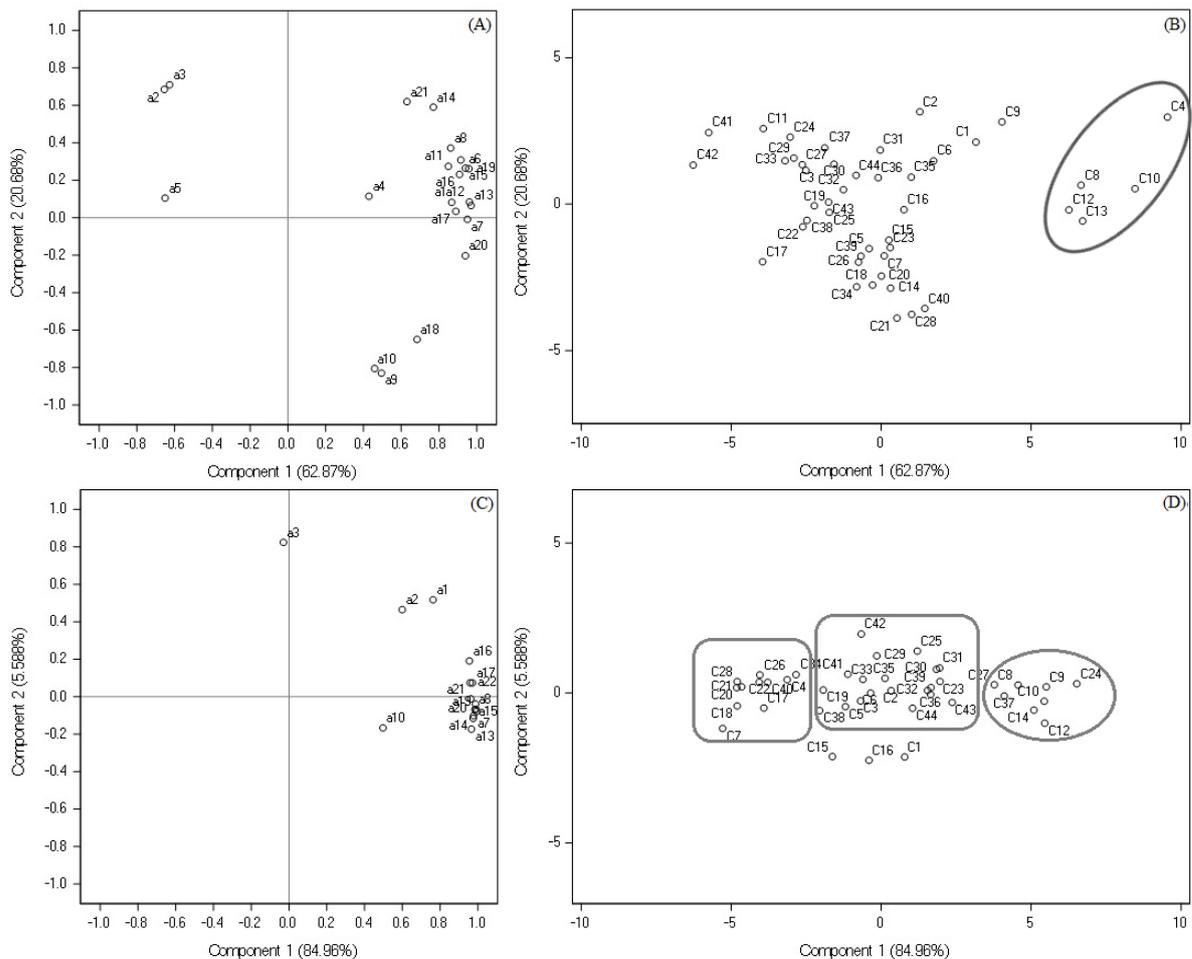


Figura 16 – Dispersão dos Componentes Principais 1 e 2 das variáveis (A e C) e das amostras de própolis vermelha do estado da Bahia de acordo com os dados quantificados por MIR para as amostras brutas (B) e extratos secos (D).

Analisando os resultados gerados com os dados do MIR das amostras brutas, a CP1 foi responsável por explicar 62,87% da variação dos dados, sendo um descritor da maioria das variáveis (Figura 16A). Apenas três bandas ($2916,95$; $2849,16$ e $1737,56$ cm^{-1}) apresentaram correlação negativa com a CP1, essas variáveis são bandas referentes a grupos funcionais presentes na cera, o que indica que amostras de própolis com valores negativos de CP1 apresentam maior quantidade desses compostos em relação as amostras com valores de CP1 positivos. A CP2 é responsável pela explicação de 20,68% da variação dos dados, estando negativamente relacionada com as bandas $1379,76$; $1287,28$ e $886,39$ cm^{-1} , as quais são associadas a bandas de máximas absorvâncias de grupos funcionais de aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres e anéis aromáticos, logo amostras com valores negativos para CP2 tendem a apresentar maior quantidade de compostos que possuam esses grupos funcionais como os constituintes fenólicos. Já para a análise realizada com dados do MIR dos extratos secos, a CP1 explicou 84,96% da variação dos dados e está positivamente correlacionado com a maioria das variáveis (Figura 16C). Já a CP2 explica 5,59% da variabilidade dos dados e está altamente

correlacionada com as bandas com comprimento de onda de 3330,42 e 2972,16 2916,95 cm^{-1} . Todas relacionadas a presença de grupos funcionais presentes na cera.

Na dispersão gráfica para dados do MIR das amostras brutas (Figura 16B) observou-se a formação de dois grupos distintos, sendo o primeiro formado pelas amostras presentes no primeiro grupo da AG e que apresentaram boa capacidade antioxidante diante dos métodos testados, além de apresentar os menores teores de cera, o que pode também ser um indicador de qualidade da própolis. As demais amostras encontram-se dispersas em um único grupo.

Uma pequena dispersão entre as amostras ocorreu em razão da variação do CP2 para dados do MIR dos extratos secos (Figura 16D), com apenas algumas amostras se localizando abaixo do agrupamento maior de amostras o que indica que possuam menor teor de cera entre as demais, no entanto a pouca dispersão devido a CP2 indica também que não há variação entre a maioria das amostras relativa a presença de cera, o que foi observado para a ACP com dados do MIR das amostras de própolis bruta. A CP1 promoveu a separação das amostras em três grupos, o primeiro grupo é composto pelas amostras que apresentaram maior capacidade antioxidante. O segundo grupo representa as amostras que apresentaram capacidade antioxidante média. Já o terceiro grupo, semelhante ao terceiro grupo da AG, é composto pelas amostras que apresentam capacidade antioxidante e conteúdo fenólico individual inferior.

De forma geral, a ACP se mostrou como uma ferramenta eficiente na triagem e classificação de amostras de própolis vermelha quanto à capacidade antioxidante. Através dela pode-se observar a dispersão e heterogeneidade entre as amostras, demonstrando diferentes perfis de composição e bioatividade. Assim, essa análise permite se tomar conclusões que somente por meio de análises univariadas não seria possível ou muito complexas de se realizar.

5.3. Análise de Correlações Canônicas

As análises de correlações canônicas foram realizadas com o intuito de verificar a existência de associação entre a composição dos fenólicos obtidos por CLAE e da capacidade antioxidante (compostos fenólicos e flavonoides totais, DPPH, poder redutor e proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico) com dados da espectroscopia NIR e MIR. A fim de verificar a possibilidade de uso do NIR e MIR como indicadores da qualidade antioxidante da própolis vermelha, e assim, estabelecer um índice capaz de classificar essas amostras de forma qualitativa por meio de equações matemáticas, além de indicar quais variáveis podem influenciar mais na capacidade antioxidante das amostras.

Na Figura 17 temos ilustrada a representação gráfica da correlação canônica obtida com dados de CLAE e dados de capacidade antioxidante.

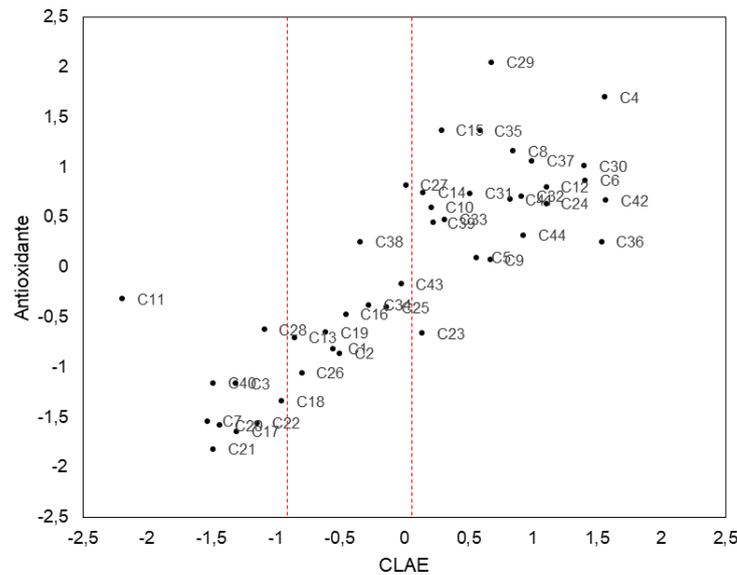


Figura 17 - Correlação canônica entre dados de CLAE e capacidade antioxidante de amostras de própolis do estado da Bahia.

Os resultados possibilitaram a obtenção de um par de correlações significativas a nível de 1% de significância pelo teste de Wilks' Lambda com uma correlação de 0,82. Nas Equações 21 e 22 temos os coeficientes responsáveis por gerar os resultados gráficos mostrados anteriormente.

$$Y_{\text{antioxidante}} = 2,7746 \times DPPH + 1,2091 \times PR - 0,0669 \times BCAL$$

Equação 21

$$Y_{CLAE} = 0,0551 \times ag + 0,0229 \times cat + 0,0365 \times caf - 0,0010 \times ka - 0,0406 \times acl - 0,1148 \times acu - 0,0215 \times pi + 0,0248 \times quer + 0,0786 \times fer$$

Equação 22

Onde: DPPH, representa o CE_{50} para a inibição do radical DPPH (mg. mL^{-1}); PR, representa o CE_{50} para inibição dos íons de ferro (mg. mL^{-1}); BCAL, o percentual de proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico; ag, o teor de ácido gálico ($\text{mg. } 100\text{g}^{-1}$ de amostra); cat, o teor de catequina ($\text{mg. } 100\text{g}^{-1}$ de amostra); caf, o teor de ácido cafeico ($\text{mg. } 100\text{g}^{-1}$ de amostra); ka, o teor de kaempferol ($\text{mg. } 100\text{g}^{-1}$ de amostra); acl, o teor de ácido clorogênico ($\text{mg. } 100\text{g}^{-1}$ de amostra); acu, o teor de ácido cumárico ($\text{mg. } 100\text{g}^{-1}$ de amostra); pi, o teor de pirocatequina ($\text{mg. } 100\text{g}^{-1}$ de amostra); quer, o teor de quercetina ($\text{mg. } 100\text{g}^{-1}$ de amostra) e; fer, o teor de ácido ferúlico ($\text{mg. } 100\text{g}^{-1}$ de amostra).

A alta correlação aponta que a composição dos fenólicos influenciam na capacidade antioxidante das amostras. A Equação 19 indica que é nos valores mais baixos do índice relativo à capacidade antioxidante onde podemos encontrar as melhores amostras, visto que a correlação dos coeficientes relativos ao DPPH e poder redutor com o índice são positivos e a correlação do coeficiente referente a proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico é negativo, logo valores mais baixos desse índice são referentes a amostras com menores CE_{50} para a inibição do radical DPPH e dos íons de ferro e maior percentual de proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico. As correlações entre as variáveis e o índice canônico relativo ao CLAE indicam que a alta capacidade antioxidante é observada, principalmente, quando as amostras de própolis vermelha apresentam alto teor de ácido clorogênico, ácido cumárico e pirocatequina, os quais possuem correlação negativa com o índice, sendo assim, os principais compostos quantificados relacionados a maior capacidade antioxidante das amostras de própolis vermelha. Em contrapartida, amostras de própolis vermelha com alto teor de kaempferol, catequina, ácido gálico, quercetina, ácido ferúlico, e/ou ácido cafeico tendem a apresentar diminuição na sua capacidade antioxidante. Embora esses constituintes fenólicos sejam frequentemente correlacionados a um alto potencial antioxidante em alimentos (SOARES, 2002), de forma geral são avaliados em sistemas com composição química mais simples e/ou através da aplicação de constituintes fenólicos individualmente. A própolis vermelha, por se tratar de um sistema de alta complexidade química, com uma vasta quantidade de fenólicos diferentes, torna-se possível que alguns constituintes apresentem essa bioatividade de forma mais acentuada, ou até atuem em sinergismo ou antagonismo entre eles.

Analisando os resultados mostrados na Figura 17, pode-se verificar que as amostras que apresentaram índice de dados obtidos por CLAE abaixo de -0,95 podem ser consideradas de qualidade antioxidante excelente; amostras que apresentaram índice obtido por CLAE acima de -0,95 e abaixo de 0,02, podem ser consideradas de qualidade antioxidante boa, e as amostras que apresentaram índice obtido por CLAE acima de 0,02 podem ser consideradas de qualidade antioxidante moderada a baixa entre as amostras testadas. Desta forma, conhecendo a composição fenólica da amostra será possível determinar, através da Equação 20, o índice de CLAE e prever a qualidade antioxidante da própolis vermelha sem que haja necessidade de se realizar os ensaios antioxidantes de DPPH, PR e BCAL.

Nas Equações 23 e 24 temos os coeficientes de correlação canônica obtidos com dados do NIR e dados de capacidade antioxidante.

$$Y_{antioxidante} = 0,0260 \times CFT + 0,0184 \times FT - 1,2873 \times DPPH + 6,4853 \times PR + 0,0173 \times BCAL$$

Equação 23

$$\begin{aligned}
 Y_{NIR} = & -30,8811 \times A1216 + 17,5051 \times A1339 - 27,0917 \times A1397 + 89,5001 \times \\
 & A1460 - 86,8898 \times A1635 - 121,0894 \times A1736 + 163,1239 \times A1765 - \\
 & 19,1884 \times A1940 + 29,8026 \times A2150 - 25,5743 \times A2315 + 0,9187 \times A2354 + \\
 & 14,1580 \times A2407 + 37,8921 \times A2444 - 32,5669 \times A2467 - 14,0527 \times A2490
 \end{aligned}$$

Equação 24

Onde as variáveis obtidas por NIR precedem a letra A seguida do número de onda associado as principais bandas vibracionais presentes nos espectros da própolis vermelha.

Os resultados da análise possibilitaram a obtenção de um par de correlações significativo a nível de 1% de significância para o teste de Wilks' Lambda com uma correlação de 0,94. Isso indica que a composição dos grupos funcionais expressa pelas máximas absorvâncias obtidas no NIR influenciam na capacidade antioxidante das amostras de própolis vermelha. A Equação 21 aponta que é nos valores mais elevados do índice onde encontramos as amostras com maior capacidade antioxidante, com coeficientes de CFT, FT e BCAL correlacionados positivamente, enquanto que os coeficientes de DPPH e PR estão negativamente correlacionados com o índice, embora o coeficiente de PR se encontre positivo e seja o principal responsável por gerar um índice positivo mais elevado entre as variáveis. Em relação a Equação 22, as variáveis que apresentaram maiores coeficientes positivos do índice são bandas de absorvância nos comprimentos de onda de 1460, 1765, 2150, 2354 e 2444 nm, essas bandas são associadas a vibrações de hidroxilas de grupos fenóis, combinações de CH/C=O de ácidos carboxílicos, e combinações de vibrações de CH, respectivamente (WORKMAN JUNIOR, 2000).

Analisando a correlação entre as bandas do NIR com o índice de capacidade antioxidante, observa-se que as variáveis com maior correlação positiva com o índice são 1397, 1460, 1635, 1940 e 2150 nm, que são referentes a vibrações de hidroxilas associadas a fenóis e ácidos carboxílicos. Esses grupos funcionais são frequentemente associados a compostos com atividade antioxidante. Na Figura 18 temos a representação gráfica da correlação canônica obtida com dados do NIR e dados de capacidade antioxidante.

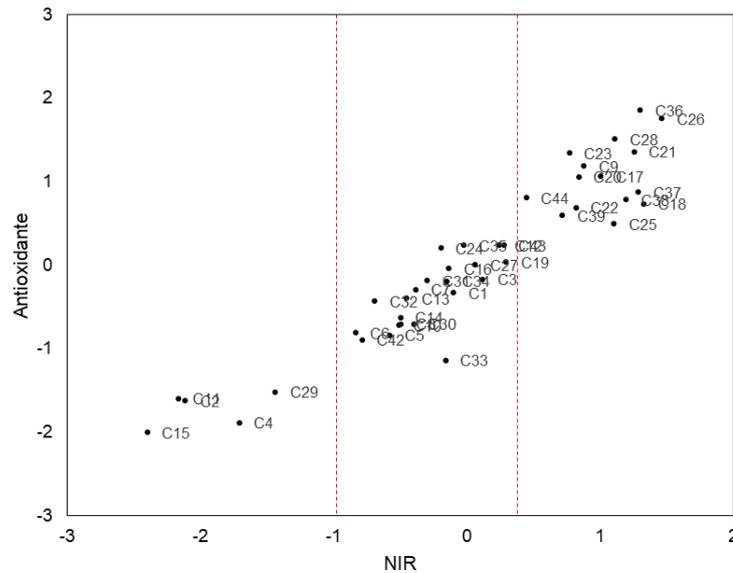


Figura 18 - Correlação canônica entre dados obtidos por NIR e capacidade antioxidante de amostras de própolis do estado da Bahia.

A partir da Figura 18 verifica-se que as amostras com maior índice canônico antioxidante apresentam maior capacidade antioxidante. Verifica-se ainda a formação de três grupos de amostras. Com base nesses grupos formados e analisando o comportamento dessas amostras quanto a capacidade antioxidante, é possível realizar a classificação desses grupos quanto essa característica, onde: amostras de qualidade antioxidante excelente são as que apresentam valores no índice do NIR acima de 0,40; amostras que apresentam valores no índice do NIR menores que 0,40 e maiores que -1,00 podem ser consideradas de qualidade antioxidante boa a moderada e; as amostras que apresentam valores no índice do NIR menores que -1,00 podem ser consideradas de qualidade antioxidante inferior. Em razão do que foi observado, é possível indicar a utilização do índice gerado com absorbâncias do NIR como meio de classificar amostras de própolis vermelha de acordo com a capacidade antioxidante.

Nas Equações 25 e 26 temos os coeficientes de correlação canônica obtidos com dados do MIR das amostras brutas e dados de capacidade antioxidante.

$$Y_{antioxidante} = 0,0096 \times CFT + 0,0200 \times FT + 1,4342 \times DPPH - 3,1795 \times PR - 0,0011 \times BCAL \quad \text{Equação 25}$$

$$Y_{MIRa} = -64,7474 \times A1 - 135,2813 \times A2 + 105,4085 \times A3 + 26,3007 \times A4 - 8,4955 \times A5 - 27,6000 \times A6 - 59,6595 \times A7 + 96,9316 \times A8 - 9,1255 \times A9 + 40,9688 \times A10 - 13,1401 \times A11 + 54,9397 \times A12 - 43,2935 \times A13 + 35,6623 \times A14 + 52,7711 \times A15 - 6,7424 \times A16 + 44,6816 \times A17 - 47,4906 \times A18 - 93,2979 \times A19 + 11,7901 \times A20 + 20,3648 \times A21$$

Equação 26

Onde: A1, corresponde a absorvância no número de onda de 3332,51 cm⁻¹; A2 ao número de onda 2916,95 cm⁻¹; A3 ao número de onda 2849,16; A4 ao número de onda 2102,58 cm⁻¹; A5 ao número de onda 1737,56 cm⁻¹; A6 ao número de onda 1614,57 cm⁻¹; A7 ao número de onda 1509,51 cm⁻¹; A8 ao número de onda 1460,36 cm⁻¹; A9 ao número de onda 1379,76 cm⁻¹; A10 ao número de onda 1287,28 cm⁻¹; A11 ao número de onda 1243,96 cm⁻¹; A12 ao número de onda 1219,03 cm⁻¹; A13 ao número de onda 1200,63 cm⁻¹; A14 ao número de onda 1157,77 cm⁻¹; A15 ao número de onda 1114,44 cm⁻¹; A16 ao número de onda 1027,32 cm⁻¹; A17 ao número de onda 960,00 cm⁻¹; A18 ao número de onda 886,39 cm⁻¹; A19 ao número de onda 836,31 cm⁻¹; A20 ao número de onda 768,99 cm⁻¹; A21 ao número de onda 719,37 cm⁻¹.

Nas Equações 27 e 28 temos os coeficientes de correlação canônica obtidos com dados do FTIR dos extratos secos e dados de capacidade antioxidante.

$$Y_{antioxidante} = -0,0029 \times CFT + 0,0236 \times FT - 1,9559 \times DPPH + 2,6261 \times PR - 0,0032 \times BCAL$$

Equação 27

$$Y_{MIRe} = 34,0010 \times A1 + 25,5574 \times A2 + 17,6502 \times A3 - 99,2580 \times A4 - 0,1713 \times A5 + 123,6219 \times A6 - 39,5331 \times A7 - 39,6839 \times A8 + 29,0127 \times A9 + 178,9950 \times A10 - 148,3203 \times A11 + 13,6393 \times A12 - 120,9136 \times A13 + 25,6671 \times A14 - 40,7935 \times A15 + 28,6259 \times A16 - 26,8140 \times A17 + 30,7121 \times A18 + 249,1661 \times A19 - 197,9886 \times A20 + 82,9916 \times A21 - 79,8489 \times A22$$

Equação 28

Onde: A1, corresponde a absorvância no número de onda de 3330,42 cm⁻¹; A2 ao número de onda 2972,16 cm⁻¹; A3 ao número de onda 2916,95; A4 ao número de onda 2854,99 cm⁻¹; A5 ao número de onda 2095,36 cm⁻¹; A6 ao número de onda 1724,28 cm⁻¹; A7 ao número de onda 1620,16 cm⁻¹; A8 ao número de onda 1595,47 cm⁻¹; A9 ao número de onda 1509,28 cm⁻¹; A10 ao número de onda 1440,79 cm⁻¹; A11 ao número de onda 1379,06 cm⁻¹; A12 ao número de onda 1286,82 cm⁻¹; A13 ao número de onda 1200,63 cm⁻¹; A14 ao número de onda 1157,07 cm⁻¹; A15 ao número de onda 1113,74 cm⁻¹; A16 ao número de onda 1033,38 cm⁻¹; A17 ao número de onda 947,42 cm⁻¹; A18 ao número de onda 885,69 cm⁻¹; A19 ao número de onda 836,31 cm⁻¹; A20 ao número de onda 793,21 cm⁻¹; A21 ao número de onda 724,73 cm⁻¹; A22 ao número de onda 694,21 cm⁻¹.

Com a análise, obteve-se apenas um par de correlações canônicas significativo a nível de 1% de significância, com uma correlação de 0,95 entre os índices dos dados do MIR das amostras e 0,98 entre os índices dos dados do MIR dos extratos secos, indicando que a

composição de grupos funcionais expressa pelas máximas absorbâncias obtidas no MIR da própolis bruta influenciam nas suas respectivas capacidades antioxidantes. Para ambas as análises, valores mais elevados dos índices indicam amostras de maior qualidade antioxidante.

O índice canônico de capacidade antioxidante apresentou correlação positiva para as variáveis CFT, FT e BCAL e correlações negativas para DPPH e PR, tanto para o índice correlacionado com dados do MIR das amostras como para o índice correlacionado com dados do MIR dos extratos secos. Para o índice do MIR das amostras brutas, os coeficientes com maiores correlações positivas foram: A10, A9 e A18, os quais estão associados, respectivamente, a vibrações de C-H de alcanos, vibrações de C=O de aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos e ésteres e vibrações de anéis aromáticos. Comportamento contrário foi observado para as variáveis A1, A2, A3 e A21, associadas, respectivamente, a vibrações do grupo C-H e carbonilas de ésteres ligados à presença de cera e a vibrações associadas a anéis aromáticos (SKOONG; HOLLER; NIEMMAN, 2009; MAZUR et al., 2019). Para o índice gerado com dados do MIR dos extratos, os coeficientes de maior correlação positiva foram: A6, A11 e A12, os quais estão associados, respectivamente, a vibrações de C=O, C-H e C-O de aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos e ésteres e vibrações de CH₃ referentes a alcanos (SKOONG; HOLLER; NIEMMAN, 2009).

As bandas dos índices do MIR das amostras brutas e dos extratos secos que apresentaram maior correlação positiva foram as mesmas que apresentaram maior correlação com o índice de capacidade antioxidante, estando, portanto, diretamente relacionadas com uma maior qualidade antioxidante das amostras. Na Figura 19 está apresentada a representação gráfica da correlação canônica obtida com dados do MIR e dados de capacidade antioxidante.

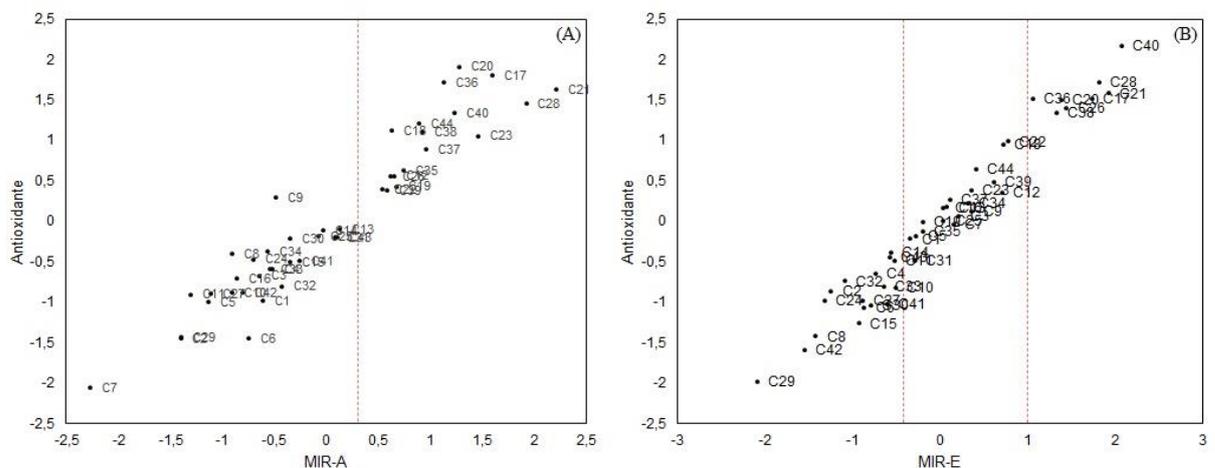


Figura 19 - Correlação canônica entre dados obtidos por MIR das amostras brutas (A) e extrato seco (B) e capacidade antioxidante de amostras de própolis do estado da Bahia.

A partir da Figura 19A pode-se observar a separação de duas classes de amostras através da formação de grupos, onde as amostras que apresentam maior valor do índice do MIR das amostras brutas (acima de 0,4) apresentam excelente capacidade antioxidante enquanto amostras que apresentam um menor valor no índice gerado com dados de MIR (abaixo de 0,4) podem ser classificadas como de qualidade antioxidante inferior. Já de acordo com a Figura 19B, para dados do MIR dos extratos podemos observar a formação de três grupos de amostras, possibilitando a separação de três classes de amostras de própolis vermelha, onde o primeiro grupo correspondeu às amostras com excelente capacidade antioxidante e compreende às amostras que apresentaram valores no índice do MIR maiores que 1. O segundo grupo, cujo os valores do índice do MIR foram menores que 1 e maiores que -0,5, composto pelas amostras com boa e/ou moderada qualidade antioxidante, já o terceiro grupo engloba as amostras com menor qualidade antioxidante e apresenta valores do índice de MIR menores que -0,5.

Os dados de correlações canônicas apontam a possibilidade de se classificar amostras de própolis vermelha quanto à qualidade antioxidante de forma eficiente por meio de métodos alternativos, em especial utilizando espectroscopia no infravermelho, análises não destrutivas e que demonstraram boa capacidade classificatória. Essa análise tem o diferencial de gerar índices capazes de classificar amostras por meio numérico, o que pode ser mais preciso em relação as análises de AG e ACP.

As análises multivariadas qualitativas da própolis vermelha do estado da Bahia demonstram que o conjunto de amostras apresenta variação de composição química, mostrada tanto pelas análises de composição fenólica, atividade antioxidante quanto pelas análises espectroscópicas por meio da dispersão indicando um perfil químico diversificado. Esses dados mostram também que embora possa haver diferenças entre fatores climáticos, florais, sazonais, de horário e método de coleta e armazenamento das amostras, o produto gerado no estado da Bahia apresenta alto potencial antioxidante. Demonstram ainda como a espectroscopia no infravermelho próximo e médio pode ser utilizada de forma eficiente como método indicativo de qualidade da própolis vermelha.

5.4. Regressão Linear Múltipla

A análise de RLM foi realizada com o intuito de avaliar o poder preditivo dos dados obtidos por CLAE, NIR e MIR das amostras e dos extratos secos para a determinação do potencial antioxidante da própolis vermelha da Bahia. Na Tabela 6 estão apresentados os dados de ajustes dos modelos preditivos por RLM.

Para a predição do teor de constituintes fenólicos e flavonoides totais, os modelos que apresentaram melhor ajuste para dados da validação foram os obtidos com dados de MIR das

amostras brutas. Já para a predição dos valores de CE_{50} do DPPH e do poder redutor, os modelos melhor ajustados foram obtidos por NIR, enquanto que para a predição dos valores de proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico, o modelo com melhores parâmetros de ajuste para validação foi obtido por dados de MIR dos extratos.

Um dos parâmetros importantes para medir e avaliar esses ajustes é, segundo Williams & Sobering (1993), a relação entre o desempenho e o desvio (RPD), uma medida da capacidade de um modelo prever um constituinte. Chang et al. (2001) utilizaram RPD para avaliar a capacidade de predição dos espectros NIR e criaram um padrão de classificação onde: modelos com $RPD > 2$ podem ser considerados como excelentes; modelos razoáveis quando $1,4 < RPD < 2$; e modelos não confiáveis quando $RPD < 1,4$. Já de acordo com Williams & Sobering (1993), outro parâmetro de ajuste importante é o valor de RER, o qual é obtido calculando a divisão da amplitude de concentração de um analito pelo erro quadrático médio, onde um modelo com valores de intervalo de erros (RER) < 3 tem pequena capacidade preditiva, modelos com RER entre 3 e 10 têm utilidade prática moderada, e valores de $RER > 10$ indicam boa utilidade prática.

Quanto aos parâmetros abordados acima, os modelos ajustados para predição dos constituintes fenólicos e flavonoides totais, podem ser considerados razoáveis e de utilidade prática moderada. Já os modelos ajustados para prever o CE_{50} do DPPH e do poder redutor e os ajustados para prever o percentual de proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico, podem ser considerados como não confiáveis e com pequena capacidade preditiva, o que indica que o modelo deve ser utilizado com cautela.

Tabela 6 – Parâmetros de ajuste dos modelos preditivos de RLM.

Fenólicos totais										
Dados utilizados	Método	Número de variáveis	Treinamento				Validação			
			R	RMSE	RPD	RER	R	RMSE	RPD	RER
NIR	Backward	9	0,9190	7,9792	2,0509	10,1181	0,4636	23,2487	0,9211	2,9825
FTIR amostra	Stepwise	6	0,8616	9,1977	1,7460	7,5388	0,8401	10,0719	1,8373	5,2707
FTIR extrato	Forward	12	0,8973	7,1920	1,7126	8,1345	0,4784	40,5971	0,6169	1,7080
Flavonoides totais										
Dados utilizados	Método	Número de variáveis	Treinamento				Validação			
			R	RMSE	RPD	RER	R	RMSE	RPD	RER
NIR	Stepwise	4	0,8485	23,0223	1,7441	6,0851	0,8514	21,9620	1,4824	4,2887
FTIR amostra	Forward	7	0,9317	16,3405	2,3696	8,4347	0,8649	22,9617	1,8793	5,1364
FTIR extrato	Backward	12	0,9843	9,9131	4,1452	13,0128	0,13892	72,3845	0,3947	1,2458
CE₅₀ de DPPH										
Dados utilizados	Método	Número de variáveis	Treinamento				Validação			
			R	RMSE	RPD	RER	R	RMSE	RPD	RER
CLAE	Backward	3	0,8149	0,1464	1,6368	6,0204	0,7312	0,1965	0,8997	3,1762
NIR	Stepwise	4	0,8099	0,1282	1,5737	0,4910	0,8012	0,2196	0,9942	2,9375
FTIR amostra	Stepwise	2	0,8581	0,0967	1,8747	7,3615	0,2324	0,3530	0,7076	2,2353
FTIR extrato	Forward	5	0,9159	0,0803	2,2581	8,8471	0,3759	0,2423	0,9196	2,6930
CE₅₀ de Poder Redutor - PR										
Dados utilizados	Método	Número de variáveis	Treinamento				Validação			
			R	RMSE	RPD	RER	R	RMSE	RPD	RER
CLAE	Backward	3	0,6340	0,0715	1,2268	4,6668	0,4884	0,1569	0,2523	0,7436
NIR	Backward	7	0,8818	0,0390	1,8125	7,0449	0,5125	0,0938	0,5724	1,6787
FTIR amostra	Stepwise	3	0,6032	0,0551	1,1847	5,5550	0,4578	0,0789	1,0949	3,8223
FTIR extrato	Stepwise	3	0,7441	0,0528	1,4173	6,0144	0,5330	0,1407	0,5385	1,8123
Percentual de proteção do sistema β-caroteno/ácido linoleico										
Dados utilizados	Método	Número de variáveis	Treinamento				Validação			
			R	RMSE	RPD	RER	R	RMSE	RPD	RER
CLAE	Stepwise	3	0,7824	5,5130	1,5232	5,1970	0,5097	45,6249	0,1610	0,4375
NIR	Backward	5	0,8762	4,9331	1,8650	6,6647	0,5128	13,3922	0,6707	2,0265
FTIR amostra	Forward	3	0,5012	7,4512	1,0942	3,8766	0,6957	7,9195	1,3788	3,9306
FTIR extrato	Backward	10	0,9192	4,1757	2,0361	7,0442	0,6331	9,4438	0,9070	2,7213

Os coeficientes de regressão para predição do teor de constituintes fenólicos totais estão apresentados graficamente na Figura 20 onde pode-se ver as bandas consideradas significativas pelo modelo obtidas pela análise de MIR das amostras brutas.

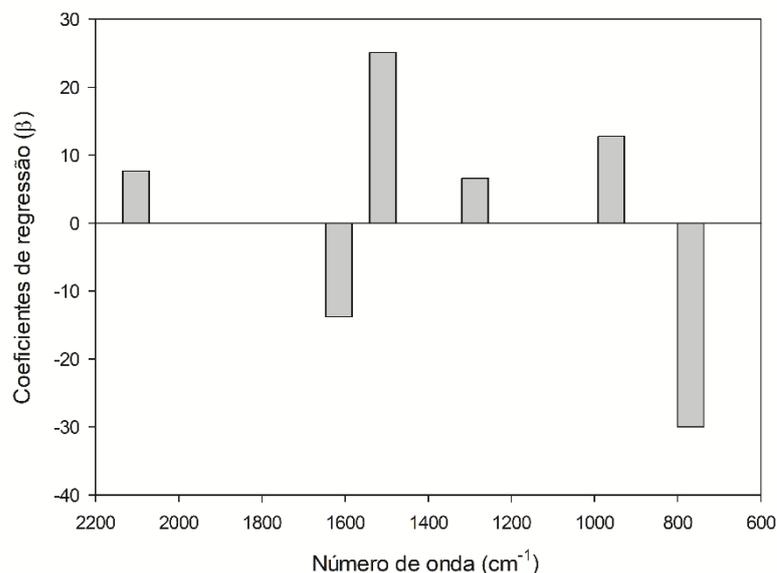


Figura 20 - Coeficientes de regressão em função do número de onda do modelo RLM construído para prever os constituintes fenólicos totais em amostras de própolis vermelha do estado da Bahia.

As variáveis com maiores coeficientes de regressão positivos estão associadas aos números de onda de 1509 e 960 cm^{-1} , o contrário foi observado para a absorção das bandas associadas aos números de onda 1614 e 768 cm^{-1} . Ao analisar os grupos funcionais que apresentam vibrações nesses intervalos de frequência observa-se que todas as variáveis selecionadas pelo modelo estão relacionadas a vibrações de anéis aromáticos (BARBOSA, 2007; SKOONG; HOLLER; NIEMMAN, 2009), logo o modelo conseguiu identificar e selecionar variáveis importantes para a predição dos constituintes fenólicos e fez um balanço entre essas variáveis para calibrar esses valores.

Na Figura 21 temos a representação gráfica dos coeficientes de regressão com as bandas consideradas significativas pelo modelo para a predição do teor de constituintes flavonoides totais obtida pela análise de MIR das amostras brutas. Analisando esta Figura, podemos observar que todos os coeficientes apresentam importância semelhante para predição do modelo, com valores elevados nos coeficientes negativos e positivos, logo, modelo também realizou um balanço desses valores para realizar uma predição eficiente. Esse balanço entre coeficientes negativos e positivos fica evidente ao analisar os grupos funcionais associados as bandas consideradas significativas pelo modelo de predição, onde temos bandas positivas e negativas associadas a presença de cera (2916, 2849 e 1379 cm^{-1}) além de bandas positivas e

negativas associadas a presença de fenóis e anéis aromáticos (1287, 1027, 960 e 768 cm^{-1}) (BARBOSA, 2007; SKOONG; HOLLER; NIEMMAN, 2009; MAZUR et al., 2019).

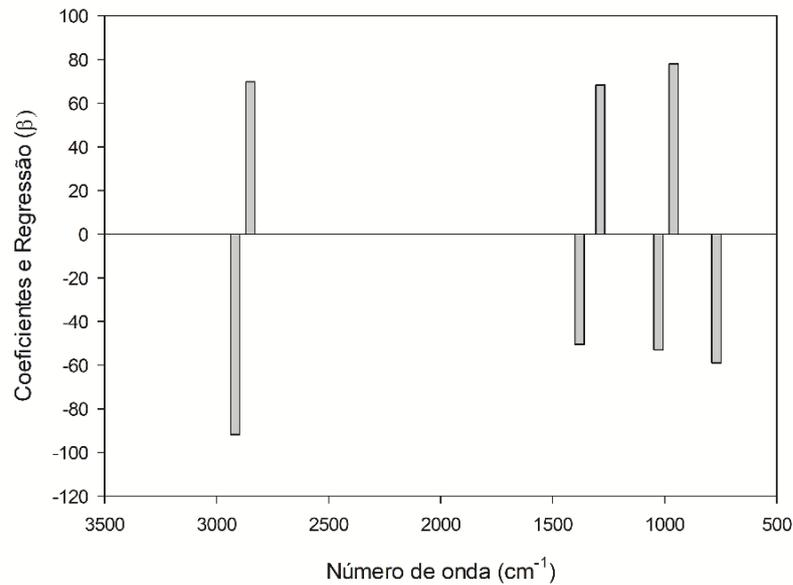


Figura 21 - Coeficientes de regressão em função do número de onda do modelo RLM construído para prever os constituintes flavonoides totais em amostras de própolis vermelha do estado da Bahia.

Na Figura 22 estão apresentados os coeficientes de regressão com as bandas consideradas significativas pelo modelo para a predição do CE_{50} de DPPH.

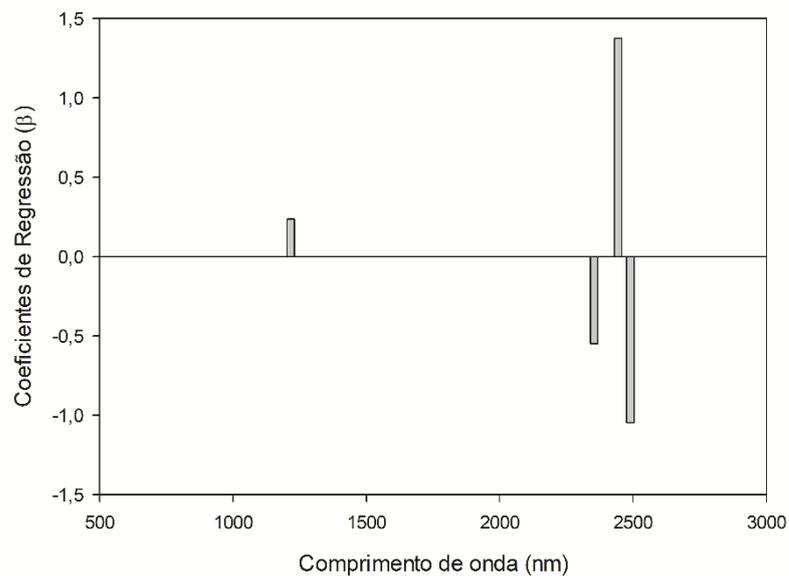


Figura 22 - Coeficientes de regressão em função do comprimento de onda do modelo RLM construído para prever o CE_{50} do DPPH em amostras de própolis vermelha do estado da Bahia.

As três primeiras variáveis do modelo (1216, 2354 e 2444 nm) são associadas a múltiplas ligações de sistemas aromáticos (WORKMAN JUNIOR, 2000), já a quarta variável (2490 nm) pode ser associada a vibrações de CH, possivelmente oriundas da cera e/ou resina.

Observando o comportamento dessas variáveis quanto aos coeficientes do modelo de predição, pode-se indicar que as variáveis utilizadas para gerar o modelo não foram capazes de detectar e explicar a variação entre os grupos funcionais presentes que podem ser responsáveis pela maior capacidade antioxidante medida pelo CE_{50} do DPPH. Isso gerou um modelo com parâmetros de ajuste que indicam uso limitado do modelo e sugerem que o RLM pode não ser a análise multivariada mais indicada para predição desses valores.

Na Figura 23 estão apresentados os coeficientes de regressão com as bandas consideradas significativas pelo modelo para a predição do CE_{50} do poder redutor.

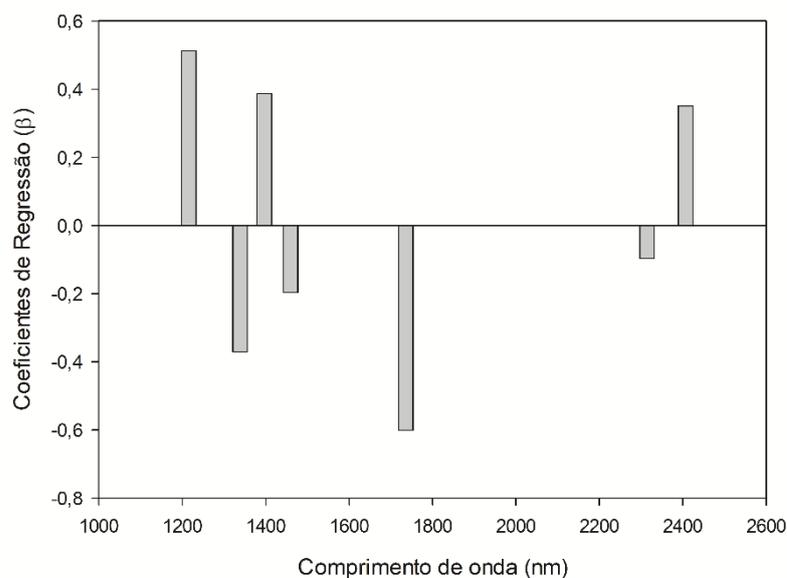


Figura 23 - Coeficientes de regressão em função do comprimento de onda do modelo RLM construído para prever o CE_{50} do PR em amostras de própolis vermelha do estado da Bahia.

O comportamento da predição do DPPH se repetiu para PR, onde algumas variáveis associadas a fenóis (1216 e 1397 nm) apresentaram coeficientes de regressão positivos, enquanto variáveis associadas a hidrocarbonetos ligados a presença e cera e resina (1736 e 2315 nm) apresentaram coeficientes de regressão negativos, o que não é desejável já que se espera que quanto maior o conteúdo fenólico em uma amostra maior sua atividade antioxidante e menor seria o C_{50} do PR. Então, assim como para DPPH, a RLM com dados do NIR pode não ser a análise multivariada mais indicada para realizar a predição desses valores.

Os coeficientes de regressão significativos para a predição do percentual de proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico podem ser observados na Figura 24. O modelo gerado para predição do percentual de proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico das amostras de própolis vermelha apresenta coeficientes de regressão provenientes de bandas de absorção de vibrações associadas a grupos funcionais de interesse na predição, onde todas as variáveis consideradas significativas pelo modelo absorvem vibrações de anéis aromáticos, aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos, tendo, portanto o modelo realizado um balanço dessas variáveis

(positivas e negativas) para prever de forma satisfatória os valores, embora deva-se ter cuidado ao se utilizar o modelo por ser considerado ainda de pouca aplicação prática.

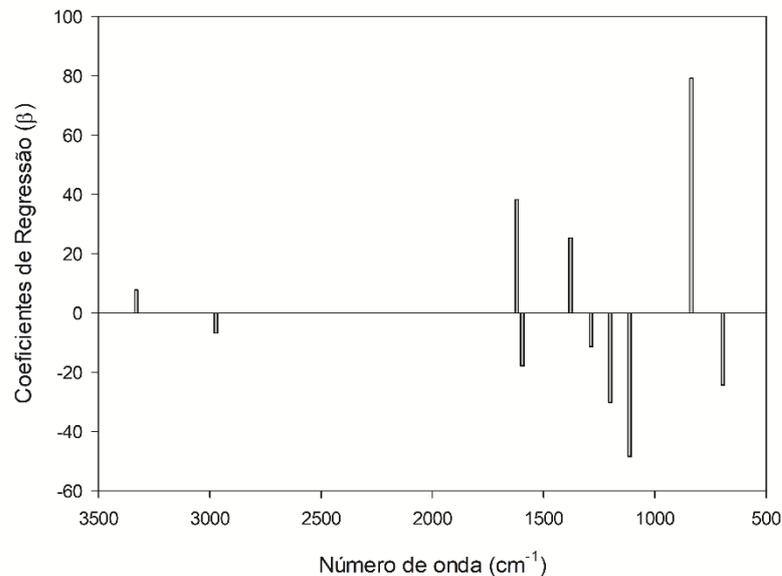


Figura 24 - Coeficientes de regressão em função do número de onda do modelo RLM construído para prever o percentual de proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico em amostras de própolis vermelha do estado da Bahia.

Os modelos ajustados para os constituintes fenólicos e flavonoides totais foram satisfatórios, no entanto os modelos ajustados para prever o CE_{50} do DPPH e do PR e o percentual de proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico devem ser utilizados de forma cautelosa, podendo realizar predição de valores que não correspondem à realidade.

Alguns dados não foram satisfatoriamente ajustados para a predição por RLM, a qual utiliza apenas as bandas de máximas absorvâncias do espectro para realizar o ajuste. Porém, pode acontecer das variações mais significativas não estarem presentes nessas regiões, e isso pode limitar essa análise. Para verificar a possibilidade de calibração em toda a amplitude do espectro pode-se realizar a calibração por regressão por mínimos quadrados parciais.

5.5. Regressão por mínimos quadrados parciais

A regressão por mínimos quadrados parciais (RMQP) é uma análise *full-spectrum* (utiliza todos os dados de absorvâncias para a calibração), não parte do pressuposto de que as variáveis são não correlacionadas e nem requer que os resíduos sigam uma distribuição normal e, por esta razão, é frequentemente utilizada para predição com dados de espectroscopia no infravermelho. A análise foi realizada com o intuito de avaliar o poder preditivo dos dados obtidos por NIR e MIR das amostras brutas e dos extratos secos para a determinação da capacidade antioxidante da própolis vermelha da Bahia. Na Tabela 7 estão apresentados os dados de ajustes dos modelos preditivos por RMQP.

Tabela 7 – Parâmetros de ajustes dos modelos preditivos de RMQP.

Fenólicos Totais									
Treinamento					Validação				
Dados utilizados	Número de fatores	R	RMSE	RPD	RER	R	RMSE	RPD	RER
NIR	4	0,7226	11,1115	1,4741	6,2403	0,9468	7,0473	3,1059	9,8391
FTIR amostra	4	0,8437	8,4710	1,8958	8,1855	0,7527	11,7359	1,5768	4,5234
FTIR extrato	3	0,7371	8,1789	1,5060	8,4778	0,2145	25,3560	0,9588	2,7346
Flavonoides totais									
Treinamento					Validação				
Dados utilizados	Número de fatores	R	RMSE	RPD	RER	R	RMSE	RPD	RER
NIR	6	0,4601	40,8465	1,0420	1,6976	0,5696	35,1840	0,9253	2,6770
FTIR amostra	9	0,9953	3,6792	10,5241	18,8463	0,7333	30,4407	1,4176	3,8745
FTIR extrato	3	0,8897	18,4310	2,2295	3,7621	0,0316	35,9476	0,7947	2,5086
CE₅₀ de DPPH									
Treinamento					Validação				
Dados utilizados	Número de fatores	R	RMSE	RPD	RER	R	RMSE	RPD	RER
NIR	6	0,7593	0,1383	1,5650	5,5869	0,6515	0,1898	1,1501	3,3981
FTIR amostra	2	0,6538	0,1346	1,3457	5,2842	0,8790	0,1432	1,7437	5,5084
FTIR extrato	9	0,9908	0,0241	7,5164	29,4492	0,2924	0,2242	0,9953	2,9112
CE₅₀ de Poder Redutor - PR									
Treinamento					Validação				
Dados utilizados	Número de fatores	R	RMSE	RPD	RER	R	RMSE	RPD	RER
NIR	20	0,9999	0,0006	119,5443	495,3781	0,2707	0,1097	0,4893	1,4350
FTIR amostra	3	0,6864	0,0466	1,3994	6,5617	0,7294	0,0589	1,4663	5,1187
FTIR extrato	8	0,9646	0,0206	3,6373	15,4351	0,2961	0,0803	0,9434	3,1752
Percentual de proteção do sistema β-caroteno/ácido linoleico									
Treinamento					Validação				
Dados utilizados	Número de fatores	R	RMSE	RPD	RER	R	RMSE	RPD	RER
NIR	20	0,9999	0,1095	80,9796	300,2800	0,2742	28,2590	0,3114	0,9604
FTIR amostra	2	0,4811	7,0270	1,1602	4,1106	0,7873	7,2434	1,5075	4,2974
FTIR extrato	20	1,0000	0,0026	3489,9611	11439,7137	0,0985	15,3295	0,5473	1,5084

Pôde-se observar que os modelos que utilizaram um número elevado de fatores para realizar o treinamento do modelo obtiveram parâmetros excelentes de ajuste, porém esse ajuste não foi confirmado ao submeter as amostras de validação ao modelo, onde se observou, de forma geral, falta de ajuste. Esse comportamento é devido ao número excessivo de fatores, que possivelmente levou à incorporação de ruídos dos dados nos modelos, impedindo o estabelecimento da relação funcional entre variável resposta e variável independente.

A predição dos dados de constituintes fenólicos totais foi melhor ajustada utilizando dados do NIR, já todas as demais predições foram melhor ajustadas com dados do MIR das amostras brutas. Em relação aos parâmetros de ajuste RPD e RER, os modelos escolhidos para a predição de todas as análises podem ser considerados razoáveis e de utilidade prática moderada, com exceção do modelo ajustado para prever o teor de constituintes fenólicos, que segundo o RPD pode ser considerado excelente. Com base nesses parâmetros, seria preferível a utilização dos modelos preditos por RMQP em vez dos modelos preditos por RLM, porém, é necessário analisar ainda quais variáveis ou regiões espectrais mais importantes para a predição desses constituintes e avaliar a sua relevância em termos de grupos funcionais associados. Esses dados podem ser observados graficamente na Figura 25 para os constituintes fenólicos totais.

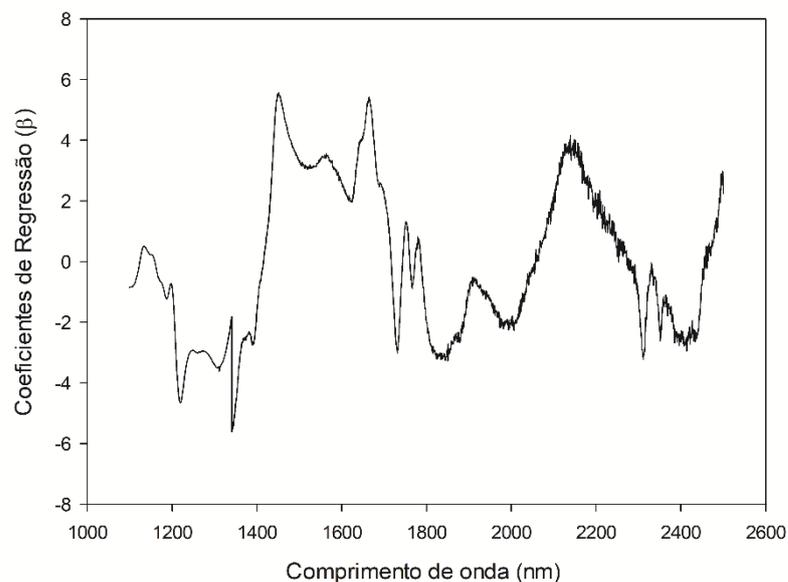


Figura 25 - Coeficientes de regressão em função do comprimento de onda do modelo RMQP construído para prever os constituintes fenólicos totais em amostras de própolis vermelha do estado da Bahia.

As principais bandas associadas a predição de maiores valores de constituintes fenólicos totais (Figura 25) são 1440, 1670 e a região de 2000 a 2300 nm. Essas bandas são associadas principalmente a vibração de hidroxilas e carboxilas de fenóis, ácidos carboxílicos e outros compostos aromáticos, respectivamente (WORKMAN JUNIOR, 2000).

Os coeficientes de regressão para a predição dos flavonoides totais com dados de MIR das amostras estão apresentados na Figura 26.

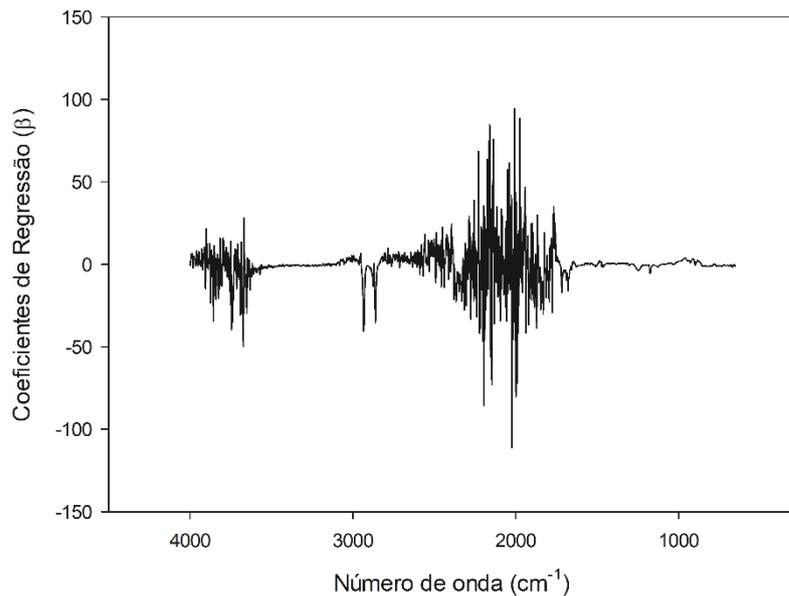


Figura 26 - Coeficientes de regressão em função do número de onda do modelo RMQP construído para prever os constituintes flavonoides totais em amostras de própolis vermelha do estado da Bahia.

De acordo com os coeficientes de regressão mostrados na Figura 26, podemos observar que há uma região espectral que merece destaque na importância da predição do conteúdo de flavonoides totais. Essa região compreende os números de onda de 2600 a 1700 cm^{-1} . O modelo provavelmente encontrou diferenças nas absorvâncias entre amostras que não foi percebido na observação gráfica dos espectros, pois nessa região não foram identificadas bandas significativas. Entretanto, de acordo com Barbosa (2007) e Skoong, Holler & Niemman (2009), nessa região temos vibrações de hidroxilas e carbonilas associadas a ácidos carboxílicos, aldeídos, cetonas e ésteres, que são grupos funcionais relacionados a presença de flavonoides, o que indica que o modelo foi bem ajustado.

Os coeficientes de regressão para a predição do CE_{50} do DPPH com dados de MIR das amostras estão apresentados na Figura 27. Analisando esses coeficientes, observa-se uma região espectral de maior importância na predição, com coeficientes negativos. Essa região está entre 2225 e 1800 cm^{-1} e é associada a absorvâncias de vibrações de alquinos. Para coeficientes com valores positivos, que podem ser relacionados a valores de CE_{50} do DPPH maiores, temos as bandas em 2850 e 1770 cm^{-1} que são associadas a presença de cera e resina nas amostras.

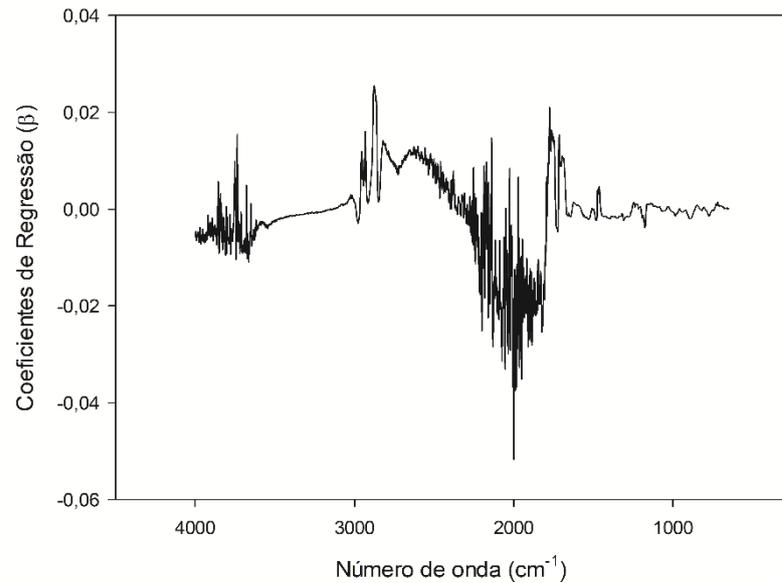


Figura 27 - Coeficientes de regressão em função do número de onda do modelo RMQP construído para prever o CE_{50} do DPPH em amostras de própolis vermelha do estado da Bahia.

O comportamento dos coeficientes de regressão no espectro para a predição do CE_{50} de poder redutor está mostrado na Figura 28, onde podemos observar região espectral que apresentou os principais coeficientes de regressão é a mesma identificada para a predição do CE_{50} do DPPH, porém com coeficientes positivos associados a presença de cera apenas na região de 2850 cm^{-1} .

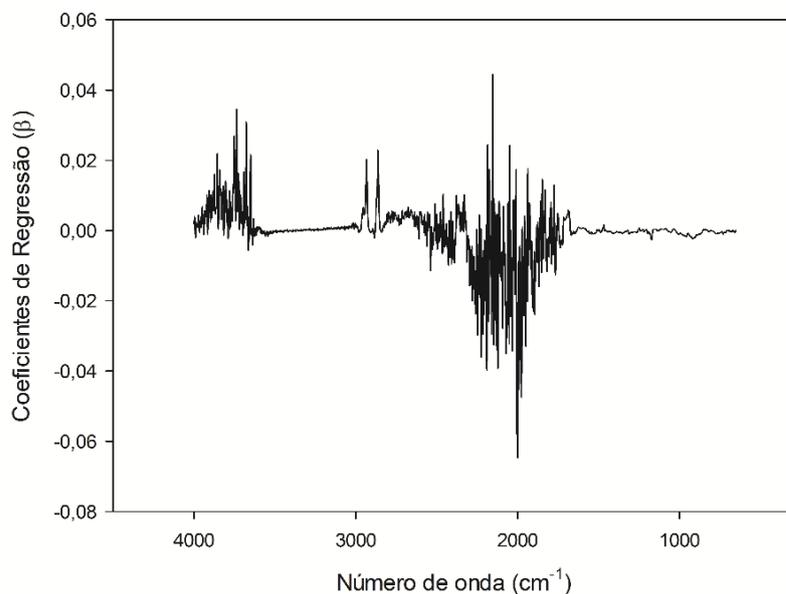


Figura 28 - Coeficientes de regressão em função do comprimento de onda do modelo RMQP construído para prever o CE_{50} do PR em amostras de própolis vermelha do estado da Bahia.

Os coeficientes de regressão para a predição do percentual de proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico com dados de MIR das amostras estão apresentados na Figura 29. Pode-se identificar nesta figura uma região espectral de maior importância na predição da proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico. Essa região está entre 2300 e 1700 cm^{-1} e é

associada a absorbâncias de vibrações de alquinos, aldeídos, cetonas, ésteres e ácidos carboxílicos. Além de duas bandas importantes em 2940 e 2865 cm^{-1} , as quais representam vibrações de grupos CH associados a presença de cera e resina.

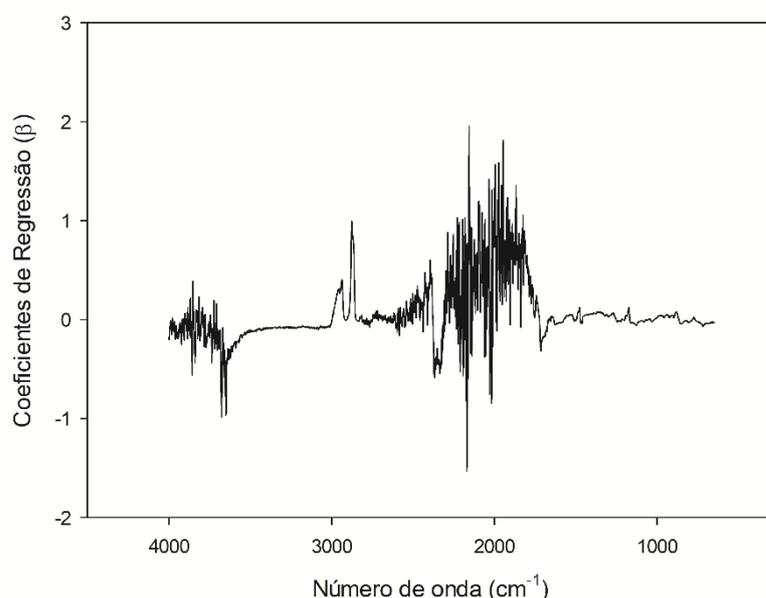


Figura 29 - Coeficientes de regressão em função do número de onda do modelo RMQP construído para prever o percentual de proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico em amostras de própolis vermelha do estado da Bahia.

As calibrações realizadas utilizando todo o espectro (RMQP) demonstraram melhores parâmetros de ajuste e maior precisão nas predições em relação a RLM. Um destaque deve ser dado as predições com dados de MIR das amostras de própolis vermelha bruta (tanto para RLM como para RMQP), os quais geraram os melhores modelos para a maioria dos parâmetros e, conseqüentemente, ajustaram melhor as variáveis de acordo com os grupos funcionais de interesse, mostrando maior sensibilidade. Esse comportamento pode ser devido à maior heterogeneidade e complexidade dos constituintes químicos das amostras em relação aos extratos, que pode ter refletido em pontos de diferenciação no espectro maiores entre elas. Esse dado é vantajoso visto que não se faz necessário a produção e secagem do extrato para se realizar a predição.

Os resultados de análise multivariada quantitativa mostraram a possibilidade de calibrar dados para prever capacidade antioxidante de amostras de própolis vermelha com uso da espectroscopia de infravermelho de forma confiável, o que é útil por se tratar de análises rápidas, precisas e que não demandam reagentes. E, uma vez o modelo já calibrado torna-se possível realizar a estimativa dos dados de capacidade antioxidante dessas amostras sem que seja necessária a realização das análises.

V. CONCLUSÕES

A própolis vermelha do estado da Bahia apresenta alta capacidade antioxidante primária e secundária e alta concentração de fenólicos e flavonoides individuais e totais, demonstrando que, embora possa existir diferenças de composição e bioatividade entre amostras de própolis de diferentes origens, as condições encontradas no ecossistema de mangue da Bahia são favoráveis à produção desse tipo de própolis.

As análises de espectroscopia no infravermelho (NIR e MIR) permitiram avaliar a composição química geral das amostras de acordo com os grupos funcionais, indicando alto teor de compostos aromáticos e insaturações, característicos dos compostos antioxidantes. A análise de correlações canônicas foi a análise qualitativa que mostrou de forma mais clara a formação e separação de grupos de amostras. Quanto à análise quantitativa, a regressão por mínimos quadrados parciais (RMQP) forneceu parâmetros de maior confiabilidade para os modelos em relação a regressão linear múltipla, sendo possível obtê-los com boa capacidade preditiva para as análises de capacidade antioxidante realizadas, com destaque para os modelos ajustados com dados de MIR das amostras brutas.

Os resultados desta pesquisa indicam a possibilidade de uso das tecnologias de espectroscopia no infravermelho associada a quimiometria como forma de prever a qualidade antioxidante de amostras de própolis vermelha de forma confiável sem a necessidade de realização de análises que demandam tempo, reagentes e trabalho, com rapidez e segurança. Além disso, os modelos calibrados tornam possível realização de estimativa dos dados de capacidade antioxidante de novas amostras de própolis vermelha da Bahia sem que seja necessária a realização das análises de bancada.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELMANN, J. **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana / antioxidante**. 2005. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, 2005.
- ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278–283, 2007.
- ALMEIDA, E. C.; MENEZES, H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: A review. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 8, n. 2, p. 1–11, 2002.
- AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B. Natural antioxidants of plant origin. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 90, v. 1, p. 1–81, 2019.
- ANDRADE, J. K. S.; DENADAI, M.; OLIVEIRA, C. S.; NUNES, M. L.; NARAIN, N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown , green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, p. 129–138, 2017.
- AZEVEDO, L. F.; SILVA, P. da F.; BRANDÃO, M. P.; ROCHA, L. G. Da; ARAGÃO, C. F. S.; SILVA, S. A. S. Da; PORTO, I. C. C. M.; JÚNIOR, I. D. B.-; FONSECA, E. J. da S.; MOURA, M. A. B. F. De; NASCIMENTO, T. G. Do. Polymeric nanoparticle systems loaded with red propolis extract: a comparative study of the encapsulating systems, PCL-Pluronic versus Eudragit®E100-Pluronic. **Journal of Apicultural Research**, v. 57, n. 2, p. 255–270, 2018.
- BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 114–117, 2005.
- BARBOSA, L. C. de A. **Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. 1ª Ed ed. Viçosa: Editora UFV, 2007.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25–30, 1995.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Instrução Normativa N° 3, de 19 de Janeiro de 2001. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geléia real, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis Brasília, 2001. p. 7–33.
- BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317–333, 1998.

- CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; DE ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Phenolic composition, antibacterial and antioxidant activities of brazilian red propolis. **Quimica Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523–1527, 2009.
- CALEGARI, M. A.; AYRES, B. B.; TONIAL, L. M. dos S.; ALENCAR, S. M. De; OLDONI, T. L. C. Fourier transform near infrared spectroscopy as a tool for predicting antioxidant activity of propolis. **Journal of King Saud University - Science**, 2019.
- CALEGARI, M. A.; PRASNIEWSKI, A.; SILVA, C. Da; SADO, R. Y.; MAIA, F. M. C.; TONIAL, L. M. S.; OLDONI, T. L. C. Propolis from Southwest of Parana produced by selected bees : Influence of seasonality and food supplementation on antioxidant activity and phenolic profile. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 1, p. 45–55, 2017.
- CARAVACA-GÓMEZ, A. M.; GÓMEZ-ROMERO, M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1220–1234, 2006.
- CHAKRAVARTULA, S. S. N.; CEVOLI, C.; BALESTRA, F.; FABBRIA, A.; ROSA, M. D. Evaluation of drying of edible coating on bread using NIR spectroscopy. **Journal of Food Engineering**, v. 240, p. 29–37, 2019.
- CHANG, C.-W.; LAIRD, D. A.; MAUSBACH, M. J.; HURBURGH JR, C. R. Analyses of Soil Properties. **Soil Science Society of America Journal**, p. 480–490, 2001.
- CHEN, H.; TAN, C.; LIN, Z. Quantitative determination of wool in textile by near-infrared spectroscopy and multivariate models. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 201, p. 229–235, 2018.
- CHENG, H.; QIN, Z. H.; GUO, X. F.; HU, X. S.; WU, J. H. Geographical origin identification of propolis using GC – MS and electronic nose combined with principal component analysis. **Food Research International**, v. 51, p. 813–822, 2013.
- CÖMERT, E. D.; GÖKMEN, V. Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. **Food Research International**, v. 105, p. 76–93, 2018.
- COSTA, A. S.; MACHADO, B. A. S.; UMSZA-GUEZ, M. A.; CIRQUEIRA, M. G.; NUNES, S. B.; PADILHA, F. F. Levantamento dos estudos com a própolis produzida no estado da Bahia. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 13, p. 1–7, 2014.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J. Dos; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446–452, 2006.
- FREIRES, I. A.; PINGUEIRO, J. M. S.; MIRANDA, S. L. F.; BUENO-SILVA, B. Red

- Propolis: Phenolics, Polyphenolics, and Applications to Microbiological Health and Disease. In: **Polyphenols: Prevention and Treatment of Human Disease**. Flórida: Academic Press, 2018. p. 293–300.
- FROZZA, C. O. da S.; GARCIA, C. S. C.; GAMBATO, G.; SOUZA, M. D. O. De; SALVADOR, M.; MOURA, S.; PADILHA, F. F.; SEIXAS, F. K.; COLLARES, T.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O. A.; HENRIQUES, J. A. P.; ROESCH-ELY, M. Chemical characterization , antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137–142, 2013.
- GARCIA, H.; FILZMOSE, P. **Multivariate Statistical Analysis using the R package chemometrics**. Austria. Disponível em: <<http://ftp.pregi.net/pub/R/web/packages/chemometrics/vignettes/chemometrics-vignette.pdf>>
- GHISALBERTI, E. L. Propolis : A Review. **Bee World**, v. 60, n. 2, p. 59–84, 1979.
- GONZÁLEZ-MARTIN, M. I.; REVILLA, I.; VIVAR-QUINTANA, A. M.; SALCEDO, E. V. B. Pesticide residues in propolis from Spain and Chile. An approach using near infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 165, 2017.
- GRANATO, D.; SHAHIDI, F.; WROLSTAD, R.; KILMARTIN, P.; MELTON, L. D.; HIDALGO, F. J.; MIYASHITA, K.; CAMP, J. Van; ALASALVAR, C.; ISMAIL, A. B.; ELMORE, S.; BIRCH, G. G.; CHARALAMPOPOULOS, D.; ASTLEY, S. B.; PEGG, R.; ZHOU, P.; FINGLAS, P. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? **Food Chemistry**, v. 264, n. October 2017, p. 471–475, 2018.
- GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: An overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 3, p. 345–391, 2012.
- HAIR JR., J. F.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E. **Multivariate Data Analysis**. 6ª ed. Porto Alegre.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 5. ed. Oxford. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=3DIKCgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=bonD4TBplR&sig=4ycV3GxDILXM AcXHbhokQPXZ0UY&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 13 jul. 2019.
- HATANO, A.; NONAKA, T.; YOSHINO, M.; AHN, M. R.; TAZAWA, S.; ARAKI, Y.; KUMAZAWA, S. Antioxidant activity and phenolic constituents of red propolis from Shandong, China. **Food Science and Technology Research**, v. 18, n. 4, p. 577–584, 2012.
- HONGYU, K.; SANDANIELO, V. L. M.; OLIVEIRA JÚNIOR, G. J. Análise de Componentes Principais: resumo teórico, aplicação e interpretação. **Engineering and**

Science, v. 1, n. 5, p. 83–90, 2015.

JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. **Applied multivariate statistical analysis**. New Jersey: Prentice-Hall, 1999.

KENNARD, R. W.; STONE, L. A. Computer Aided Design of Experiments. **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 137–148, 1969.

KUMAR, N.; BANSAL, A.; SARMA, G. S.; RAWAL, R. K. Chemometrics tools used in analytical chemistry : An overview. **Talanta**, v. 123, p. 186–199, 2014.

LIMA, A. B. S. De; BATISTA, A. S.; JESUS, J. C. De; SILVA, J. de J.; ARAÚJO, A. C. M. De; SANTOS, L. S. Fast quantitative detection of black pepper and cumin adulterations by near-infrared spectroscopy and multivariate modeling. **Food Control**, v. 107, p. 106802, 2020.

LOPES, M. T. do R. Própolis: Uma alternativa para diversificar a produção apícola. **Saúde Animal**, 2009.

LÓPEZ, B. G.-C.; SCHIMIDT, E. M.; EBERLIN, M. N.; SAWAYA, A. C. H. F. Phytochemical markers of different types of red propolis. **Food Chemistry**, v. 146, p. 174–180, 2014.

LÓPEZ, G. **Análise da composição de amostras de própolis vermelha do Brasil por espectrometria de massas com ionização por eletrospray e cromatografia líquida de ultra-eficiência (UHPLC-ESI-MS) e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana**. 2014. Dissertação de Mestrado em Ciências, Universidade Estadual de Campinas, 2014.

MACHADO, B. A. S.; SILVA, R. P. D.; BARRETO, G. de A.; COSTA, S. S.; SILVA, D. F. Da; BRANDÃO, H. N.; ROCHA, J. L. C. Da; DELLAGOSTIN, O. A.; HENRIQUES, J. A. P.; UMSZA-GUEZ, M. A.; PADILHA, F. F. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown , Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–26, 2016.

MALDONADO, L.; MARCINKEVICIUS, K.; BORELLI, R.; GENNARI, G.; SALOMÓN, V.; ISLA, M. I.; VERA, N.; BORELLI, V. Differentiation of argentine propolis from different species of bees and geographical origins by UV spectroscopy and chemometric analysis. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, p. 1–7, 2018.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química nova**, v. 19, n. 5, p. 529–536, 1996.

MAZUR, K. L.; FEUSER, P. E.; VALÉRIO, A.; POESTER CORDEIRO, A.; DE OLIVEIRA, C. I.; ASSOLINI, J. P.; PAVANELLI, W. R.; SAYER, C.; ARAÚJO, P. H. H.

Diethyldithiocarbamate loaded in beeswax-copaiba oil nanoparticles obtained by solventless double emulsion technique promote promastigote death in vitro. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 176, p. 507–512, 2019.

MEHROTRA, R. Infrared Spectroscopy, Gas Chromatography/Infrared in Food Analysis. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, p. 1–18, 2006.

MELO, A. A. M. De; MATSUDA, A. H.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. De. Identidade e qualidade da própolis proveniente de quatro regiões do Brasil Identity and quality of propolis from four regions of Brazil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 540–548, 2012.

MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. J. K. **Vogel: Análise química quantitativa**. 6^a ed. Rio de Janeiro.

MENDONÇA, I. C. G. De; PORTO, I. C. C. de M.; NASCIMENTO, T. G. Do; SOUZA, N. S. De; OLIVEIRA, J. M. dos S.; ARRUDA, R. E. dos S.; MOUSINHO, K. C.; SANTOS, A. F. Dos; BASÍLIO-JÚNIOR, I. D.; PAROLIA, A.; BARRETO, F. S. Brazilian red propolis : phytochemical screening , antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 357, p. 1–12, 2015.

MENDONÇA, L. S. **Aspectos ambientais , químicos e biológicos relacionados à própolis vermelha**. 2011. Dissertação de Mestrado em Saúde e Ambiente, Universidade Tiradentes, 2011.

MILLER, H. E. A Simplified Method for the Evaluation of Antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 48, n. 2, p. 91, 1971.

MINGOTI, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: Uma abordagem aplicada**. Belo Horizonte.

MOLYNEUX, P. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211–219, 2004.

MORELLATO, S. A. **Modelos de regressão PLS com erros heteroscedásticos**. 2010. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

NAMIKI, M. Antioxidants / Antimutagens in Food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 29, n. 4, p. 273–300, 1990.

NUNES, L. C. C.; GALINDO, A. B.; DEUS, A. da S. O. De; RUFINO, D. A.; RANDAU, K. P.; XAVIER, H. S.; CITÓ, A. M. das G. L.; NETO, P. J. R. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 524–529, 2009. a.

NUNES, L. C. C.; GALINDO, A. B.; DEUS, A. da S. O. De; RUFINO, D. A.; RANDAU, K. P.; XAVIER, H. S.; CITÓ, M. A. das G. L.; NETO, P. J. R. Variabilidade sazonal dos

- constituintes da própolis vermelha e bioatividade Artigo Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artermia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 524–529, 2009. b.
- OLDONI, T. L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***. 2007. Dissertação de Mestrado em Ciências, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
- OLDONI, T. L. C.; CABRAL, I. S. R.; D'ARCE, M. A. B. R.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M.; NASCIMENTO, A. M.; ALENCAR, S. M. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, v. 77, n. 2, p. 208–213, 2011.
- ORŠOLIC, N.; KNEŽEVIC, A. H.; ŠVER, L.; TERZIC, S.; BAŠIC, I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 307–315, 2004.
- OYAIZU, M. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics**, v. 44, n. 6, p. 307–315, 1986.
- PAGANOTTI, R. S. N. **Desenvolvimento de métodos analíticos para a análise de própolis utilizando técnicas espectrométricas e análise multivariada**. 2013. Tese de Doutorado em Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.
- PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; AGUIAR, C. L. PRÓPOLIS PRODUZIDA NO SUL DO BRASIL, ARGENTINA E URUGUAI: EVIDÊNCIAS FITOQUÍMICAS DE SUA ORIGEM VEGETAL PROPOLIS. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 997–1003, 2002.
- PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; MOURA, F. F. De. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybee Science**, v. 21, n. 2, p. 85–90, 2000.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. 4^a ed. São Paulo.
- PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.
- RAMOS-DIAZ, J. M.; RINNAN, Å.; JOUPPIA, K. Application of NIR imaging to the study of expanded snacks containing amaranth, quinoa and kañiwa. **Lwt**, v. 102, n. November 2018, p. 8–14, 2019.
- REGUEIRA-NETO, M. S.; TINTINO, S. R.; ROLÓN, M.; VEGA, M. C.; BALBINO, V. D.

- Q.; MELO, H. D. De. Antitrypanosomal, antileishmanial and cytotoxic activities of Brazilian red propolis and plant resin of *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. **Food and Chemical Toxicology**, v. 119, p. 215–221, 2018.
- REGUEIRA-NETO, M. S.; TINTINO, S. R.; SILVA, A. R. P. Da; COSTA, M. do S.; BOLIGON, A. A.; MATIAS, E. F. F.; BALBINO, V. de Q.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M. Seasonal variation of Brazilian red propolis : Antibacterial activity , synergistic effect and phytochemical screening. **Food and Chemical Toxicology**, p. 1–9, 2017.
- REVILLA, I.; VIVAR-QUINTANA, A. M.; GONZÁLEZ-MARTÍN, I.; ESCUREDO, O.; SEIJO, C. The potential of near infrared spectroscopy for determining the phenolic, antioxidant, color and bactericide characteristics of raw propolis. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 211–217, 2017.
- RIGHI, A. A.; ALVES, T. R.; NEGRI, G.; MARQUES, L. M.; BREYER, H.; SALATINO, A. Brazilian red propolis: Unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2363–2370, 2011.
- RUFATTO, L. C.; LUCHTENBERG, P.; GARCIA, C.; THOMASSIGNY, C.; BOUTTIER, S.; DUMAS, F.; HENRIQUES, J. A. P.; ROESCH-ELY, M.; MOURA, S. Brazilian red propolis: Chemical composition and antibacterial activity determined using bioguided fractionation Short. **Microbiological Research**, v. 214, p. 74–82, 2018.
- SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y.; OKADA, Y. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). **Food Chemistry**, v. 89, n. 4, p. 569–575, 2005.
- SALGUEIRO, F. B.; CASTRO, R. N. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química nova**, v. 39, n. 10, p. 1192–1199, 2016.
- SANTOS, M. de F. da P. **Desenvolvimento e Validação de Métodos de Espectroscopia no Infravermelho Próximo e Médio para Caracterização de Lamas de ETAR para Uso Agrícola**. 2007. Dissertação de Mestrado em Engenharia Biológica, Universidade Técnica de Lisboa, 2007.
- SEBRAE, S. B. D. A. À. M. E. P. E. Própolis vermelha como um novo nicho de mercado. **APACAME**, p. 1–3, 2014. a.
- SEBRAE, S. B. D. A. À. M. E. P. E. O mercado da própolis. 2014. b.
- SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic Antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67–103, 1992.
- SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional**

Foods, v. 18, p. 757–781, 2015.

SHAWKY, E.; IBRAHIM, R. S. Bioprofiling for the quality control of Egyptian propolis using an integrated NIR-HPTLC-image analysis strategy. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1095, n. June, p. 75–86, 2018.

SILVA, B. B.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S. M. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis , a New Type of Brazilian Propolis. **eCAM**, v. 5, n. 3, p. 313–316, 2008.

SILVA, C.; PRASNIEWSKI, A.; CALEGARI, M. A.; LIMA, V. A. De; OLDONI, T. L. C. Determination of Total Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Ethanolic Extracts of Propolis Using ATR – FT-IR Spectroscopy and Chemometrics. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 7, p. 2013–2021, 2018.

SILVA, R. A. Da; RODRIGUES, A. E.; RIBEIRO, M. C. M.; CUSTÓDIO, Â. R.; ANDRADE, N. E. D.; PEREIRA, W. E. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba , Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1842–1848, 2006.

SILVA, R. P. D.; MACHADO, B. A. S.; DE ABREU BARRETO, G.; COSTA, S. S.; ANDRADE, L. N.; AMARAL, R. G.; CARVALHO, A. A.; PADILHA, F. F.; BARBOSA, J. D. V.; UMSZA-GUEZ, M. A. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–18, 2017.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7th. ed. California: John Wiley & Sons, 2005.

SIMIC, M. G.; JOVANOVIĆ, S. V. Inactivation of Oxygen Radicals by Dietary Phenolic Compounds in Anticarcinogenesis. In: **Food phytochemicals for cancer prevention II**. Washington: American Chemical Society, 1994. v. 547p. 20–33.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, n. 1974, p. 152–178, 1998.

SINGLETON, V. L.; ROSSI-JR, J. A. COLORIMETRY OF TOTAL PHENOLICS WITH PHOSPHOMOLYBDIC-PHOSPHOTUNGSTIC ACID REAGENTS. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.

SKOONG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMMAN. **Princípios de Análise Instrumental**. 6^a ed. [s.l.] : Bookman, 2009.

SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutricao**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

- SOUZA, A. M. De; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: Um tutorial, parte I. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 223–229, 2012.
- TABACHNICK, B. G.; FIDELL, L. S. **Using Multivariate Statistics**. 5. ed. MA: Inc. Needham Heights, 2006.
- TEIXEIRA, É. W.; MESSAGE, D.; MEIRA, R. M. S. A.; SALATINO, A. Indicadores da origem botânica da própolis: importância e perspectivas. **Nova Odessa**, v. 60, n. 1, p. 83–106, 2003.
- TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; CRISTINA, M.; MIORIN, P. L.; PASIN, R.; TSVETKOVA, I. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. **eCAM**, v. 3, n. 2, p. 249–254, 2006.
- VIUDA-MARTOZ, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LOPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 9, p. 117–124, 2008.
- WILLIAMS, P. C.; SOBERING, D. C. Comparison of Commercial near Infrared Transmittance and Reflectance Instruments for Analysis of Whole Grains and Seeds. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 1, n. 1, p. 25–32, 1993.
- WORKMAN JUNIOR, J. **The Handbook of Organic Compounds, Three-Volume Set**. [s.l.] : Academic Press, 2000.
- XU, L.; YAN, S.; CAI, C.; YU, X. Untargeted detection and quantitative analysis of poplar balata (PB) in Chinese propolis by FT-NIR spectroscopy and chemometrics. **Food Chemistry**, v. 141, p. 4132–4137, 2013.