



UFOP

Universidade Federal
Ouro Preto

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
ESCOLA DE FARMÁCIA



**APLICAÇÃO DE ANÁLISE ESTATÍSTICA
MULTIVARIADA NO ESTUDO DE PROPRIEDADES
DA PRÓPOLIS**

Camila Soares Rocha

Ouro Preto, novembro de 2018.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
ESCOLA DE FARMÁCIA



APLICAÇÃO DE ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA NO ESTUDO DE PROPRIEDADES DA PRÓPOLIS

Camila Soares Rocha

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Bacharela em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Gilmare Antônia da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. André Talvani Pedrosa da Silva

Ouro Preto, novembro de 2018.

R672a Rocha, Camila Soares.
Aplicação de análise estatística multivariada no estudo de propriedades da própolis [manuscrito] / Camila Soares Rocha. - 2018.

46f.: il.: color; graf.; tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gilmare Antônia Silva.
Coorientador: Prof. Dr. André Talvani Pedrosa Silva.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia.

1. Própolis. 2. Flavonoides. 3. Espectrofotometria . I. Silva, Gilmare Antônia. II. Silva, André Talvani Pedrosa . III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 615.324

Catálogo: ficha.sisbin@ufop.edu.br




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia

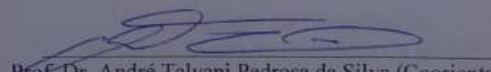
TERMO DE APROVAÇÃO


Aplicação de análise estatística multivariada no estudo de propriedades da própolis

Trabalho de Conclusão de Curso defendido por Camila Soares Rocha e aprovado com nota 9,00, em 28 de Novembro de 2018, pela comissão examinadora:


Prof. Dra. Viviane Martins Rebelo dos Santos
DEQUI-ICEB-UFOP


Doutoranda Grazielle Rocha dos Santos
PPG PROAMB-UFOP


Prof. Dr. André Talvani Pedrosa da Silva (Coorientador)
DECBI-ICEB-UFOP


Prof. Dra. Gilmar Antônia da Silva (Orientadora)
DEQUI-ICEB-UFOP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo apoio e incentivo
sempre proporcionados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo apoio, força, companheirismo e paciência.

À minha família pelo incentivo.

À minha orientadora Profa. Gilmare Antônia da Silva pelos ensinamentos, paciência, convivência, amizade e principalmente por acreditar e confiar na minha dedicação a este trabalho.

À Cooperativa Nacional de Apicultura Ltda (CONAP) pela parceria e fornecimento das amostras de própolis para a realização desse trabalho.

Ao Laboratório de Estudos em Quimiometria, ao Laboratório de Saneamento Ambiental e ao Laboratório de Imunologia da Inflamação pelo espaço concedido e aos companheiros de laboratório por todos os momentos.

A doutoranda Ana Menezes do Laboratório de Imunologia da Inflamação por toda ajuda na realização desse trabalho.

À UFOP e aos professores por todo o aprendizado.

A todos os amigos que ganhei nessa jornada pela convivência, aprendizado, colaboração e amizade; sem vocês a caminhada teria sido mais difícil.

À Grazi pela imensa ajuda nesse trabalho, pela amizade, alegria, companheirismo e convivência nesses anos.

EPÍGRAFE

“Quem acredita sempre alcança.” Renato Russo

RESUMO

A própolis é produzida por abelhas e é um composto natural utilizado na colmeia como uma barreira protetora contra infecções e ações da natureza. Esse material possui diversas atividades importantes, como ação antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória, sendo todas diretamente ligadas à sua composição química. Atualmente sabe-se que os flavonoides, presentes na própolis, são os principais compostos responsáveis pela atividade anti-inflamatória. Assim, várias amostras de própolis de diferentes produtores cedidas pela Cooperativa Nacional de Apicultura Ltda (CONAP) foram submetidas a um processo de extração etanólica a 80% e gerados seus respectivos espectros por espectrofotometria UV-Vis, sendo escolhida pela simplicidade da técnica e ineditismo na literatura; e foi realizada a determinação do teor de flavonoides nas amostras por meio de análise espectrofotométrica em leitor de microplacas para teste de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), em comprimento de onda fixo (425 nm). Foram realizados estudos a fim de correlacionar os resultados obtidos nesses ensaios por meio de calibração multivariada (quadrado mínimos parciais) às respostas das análises espectrofotométricas. Com os parâmetros utilizados não foi possível correlacionar os perfis espectrais das diferentes amostras de própolis analisadas e os respectivos teores dos flavonoides, mostrando um possível grau de maior complexidade entre estes parâmetros ou a necessidade de diferentes abordagens de análise química para esse fim, como a adição o íon metanólico de alumínio aos espectros para posterior obtenção dos espectros. A análise das componentes principais não evidenciou padrões evidentes dos sinais espectrais e dos teores de flavonoides das própolis investigadas, isto é, não houve diferença significativa dessas amostras em função da região de produção e tipo de própolis (green, ultragreen e brown), considerando as variáveis investigadas. Com base nos resultados obtidos necessita-se a continuidade dos estudos levando em consideração as informações obtidas com os resultados até então alcançados e a avaliação de maior número de amostras de própolis, a fim de se ter maior representatividade das possíveis variabilidades, incluindo o período sazonal.

Palavras-chave: Própolis, espectroscopia UV-Vis, flavonoides, análise exploratória, calibração multivariada.

ABSTRACT

Propolis is produced by bees and is a natural compound that is used as a protective barrier against infections and the actions of nature. This material is composed of several important actions, such as antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory action, all of them related to their chemical appearance. In this content is flavonoides, present in propolis, in the content is the presence of anti-inflammatory. Thus, the samples of propolis of different productivities were submitted to the Cooperativa Nacional de Apicultura Ltda. (CONAP) were submitted to an 80% ethanolic extraction process and generated their derivatives by UV-Vis spectrophotometry, being chosen by the literature technique. The determination of the flavonoid content in the analyzes was performed by means of spectrophotometric analysis in microplates for ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), at fixed wavelength (425 nm). Correlation studies were found between the results obtained by multivariate calibration (lower square) and the spectrophotometric responses. With the parameters, the specific profiles of the different propolis samples analyzed and the respective flavonoid contents were not compared, showing a certain degree of purity between these parameters and the main strategies of chemical analysis for this purpose, as an addition to methanolic spectra for further dosing of the spectra. The analysis of the main components did not show the evidence of the spectral profiles and the flavonoid content of the propolis investigated, that is to say, it was not less significant to the samples according to the region of production and type of propolis (green, ultragreen and brown), variables Investigated. Based on the results obtained, the results were analyzed based on the information obtained with the obtained results and an evaluation of a greater number of propolis samples, including the greater representativeness of the occurrences, including the seasonal period.

Keywords: Propolis, UV-Vis spectroscopy, flavonoids, chemometrics, multivariate calibration.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CONAP	Cooperativa Nacional de Apicultura Ltda
μL	Microlitros
mL	Militros
g	Gramas
μg	Microgramas
Nm	Nanômetros
Cm	Centímetros
Mg	Miligrama
Ng	Nanograma
Min	Minutos
PCA	Análise das componentes principais
PLS	Quadrados mínimos parciais

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas dos principais flavonoides	20
Figura 2 – Formação do complexo flavonoide-Al, em solução metanólica de $AlCl_3$	21
Figura 3 – Representação do procedimento de calibração multivariada	24
Figura 4 – Tipos de própolis cedidas pela CONAP para análise.....	28
Figura 5 - Amostras de própolis preparada e acondicionada em frascos âmbar vedados para a análise espectrofotométrica	31
Figura 6 – Espectros UV-Vis obtidos dos extratos da própolis estudados.....	34
Figura 7 – Curva analítica obtida a partir da quercetina para determinação do teor de flavonoides	35
Figura 8 - Distribuição dos extratos de própolis em função dos espectros e teor de flavonoides	39
Figura 9 – Gráfico representando a PC1 isoladamente	40
Figura 10 – Gráfico representando PC2 isoladamente	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Região de produção das própolis investigadas neste trabalho.....	29
Tabela 2 – Codificação dos tipos de própolis em relação à região de produção.....	29
Tabela 3 – Valores das absorbâncias obtidos na determinação da curva analítica.....	35
Tabela 4 – Absorbâncias obtidas a 425 nm de extratos etanólicos de própolis.....	36
Tabela 5 – Concentração de flavonoides nos extratos etanólicos de própolis.....	37
Tabela 6 – Pontos onde a concentração de flavonoides foi maior e a região e tipo de amostra.....	38

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	14
2- OBJETIVO GERAL	16
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	16
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3.1 PROPÓLIS	17
3.2 INFLAMAÇÃO.....	19
3.3 FLAVONOIDES	21
3.4 ESPECTROFOTOMETRIA UV-Vis.....	24
3.5 QUIMIOMETRIA	25
4 METODOLOGIA	30
4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS	30
4.2 DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS.....	31
4.3 EXTRAÇÃO DA PRÓPOLIS BRUTA	32
4.4 ANÁLISES ESPECTROFOTOMÉTRICAS DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS	33
4.5 DETERMINAÇÃO DOS FLAVONOIDES NOS EXTRATOS DE PROPÓLIS	33
4.6 TRATAMENTO QUIMIOMÉTRICO DOS DADOS	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.3 ANÁLISE MULTIVARIADA DOS DADOS	40
6 CONCLUSÕES.....	44
7 PERPECTIVAS FUTURAS	45

1- INTRODUÇÃO

A própolis é uma mistura complexa, formada por material resinoso e balsâmico coletado pelas abelhas dos ramos, flores, pólen, brotos e exsudatos de árvores; além desses, na colmeia, as abelhas adicionam secreções salivares e enzimas (LUSTOSA, 2008). A própolis tem sido objeto de estudos farmacológicos devido às suas propriedades antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antioxidante, antitumoral e imunomodulatória (BANKOVA, 2005; KOSALEC et al., 2005; ALENCAR et al., 2005; SIMÕES et al., 2008).

Como a própolis é uma mistura de várias substâncias, a mesma não é facilmente extraída ou fracionada; os constituintes do extrato da própolis variam, entre outros, de acordo com o método de extração. Mais notavelmente, a própolis obtida pela extração aquosa contém aminoácidos, matéria orgânica e carboidratos, os quais não estão presentes na extração etanólica. O extrato aquoso é amplamente usado como aditivo em alimentos e cosméticos, por outro lado, a extração com etanol fornece facilmente compostos lipofílicos, que estão em grandes quantidades (INOUE et al., 2008).

Os compostos fenólicos são os que mais são destacados dentre os componentes da própolis, uma vez que são considerados responsáveis pela grande parte das propriedades deste apiterápico. Isso se deve ao fato de que os compostos fenólicos exercem múltiplos efeitos como antioxidantes, antitumorais, anti-inflamatórios, anticancerígenos, dentre outros (COUTINHO, 2009).

Uma das propriedades biológicas da própolis que é popularmente mais conhecida é a sua atividade anti-inflamatória. Pesquisadores têm observado seu efeito imunorregulador frente à produção de fatores envolvidos no processo inflamatório como citocinas, quimiocinas, prostaglandina, dentre outros. Hu et al. (2005) observaram que extratos aquosos e etanólicos de própolis diminuíram a extensão da resposta inflamatória por meio da inibição da produção de prostaglandinas e de óxido nítrico (NO), além de um possível impedimento da ativação de macrófagos (PAGLIARONE, 2009).

Como um agente anti-inflamatório, a própolis tem demonstrado ser capaz de inibir a síntese de prostaglandinas, ativando a glândula timo, ajudando o sistema imunológico a promover a atividade fagocitária, induzindo a migração de células de defesa e aumentando os efeitos de cura dos tecidos epiteliais (RIBEIRO et al., 2015).

A composição química da própolis também inclui os chamados flavonoides, que são

considerados os principais compostos responsáveis pelos seus efeitos benéficos. O uso da própolis como anti-inflamatório e cicatrizante é atribuído ao alto teor dessas substâncias em sua composição (BARBOSA, 2009). Eles representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural (SIMÕES et al., 2004).

Os flavonoides, em relação à atividade anti-inflamatória, atuam modulando células envolvidas com a inflamação (por exemplo, inibindo a proliferação dos linfócitos T), inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- α e IL-1), modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como a fosfolipase A2, a ciclo-oxigenase e a lipooxigenase, além de modularem a enzima formadora de óxido nítrico, a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (COUTINHO, 2009).

A espectrofotometria UV-Vis tem sido uma técnica analítica utilizada para garantir o controle de qualidade de matrizes quimicamente complexas como os extratos de própolis, sendo largamente empregada para o doseamento de flavonoides em materiais vegetais, além de ser utilizada para a determinação de compostos orgânicos e inorgânicos (TOMAZZOLI et al., 2015). É uma boa alternativa, em função da sua robustez, custo relativamente baixo e grande número de aplicações desenvolvidas.

Os espectros de absorção desses extratos combinados com métodos que envolvem análise multivariada, por exemplo, análise exploratória de dados e calibração multivariada, podem ser usados para obter vários tipos de informações da matriz estudada.

Para o tratamento estatístico dos dados gerados nesse trabalho foram usadas ferramentas da chamada quimiometria, que pode ser definida como a área da química que utiliza métodos matemáticos e estatísticos a fim de planejar ou selecionar procedimentos de medidas e experimentos otimizados, disponibilizando ferramentas para o processamento dos dados químicos estudados, para que seja obtido o máximo de informação química (WINEFORDNER, 2004). O modelo estatístico dos métodos multivariados considera a correlação entre as amostras, entre as variáveis, e entre amostras e variáveis analisadas simultaneamente, possibilitando a obtenção de uma maior quantidade de informação (TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

Os estudos espectrofotométricos da própolis podem ser correlacionados aos teores de flavonoides nas amostras, fornecendo meios para avaliar se há uma relação entre essas informações. Sendo assim, a finalidade deste projeto é estudar por meio de metodologias de análise multivariada, calibração multivariada e análise exploratória, as análises espectrofotométricas e os resultados do doseamento de flavonoides a fim de obter informações sobre a correlação desses parâmetros.

2- OBJETIVO GERAL

Avaliar por meio de metodologias de análise multivariada os espectros UV-Vis e os resultados do doseamento de flavonoides de extratos etanólicos a 80%, a fim de estudar a correlação desses parâmetros.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Reestabelecer parceria com a CONAP para o fornecimento de amostras de própolis para a realização dos experimentos.
- Produzir os extratos da própolis bruta, de acordo com o resultado de trabalhos anteriores do grupo, em consonância com o que a CONAP realiza.
- Realizar análises espectrofotométricas na região do UV-Vis das amostras de propólis.
- Realizar a determinação do teor de flavonoides nas amostras por análise espectrofotométrica em leitor de microplacas para teste de ELISA, em comprimento de onda fixo.
- Analisar quimicamente e por meio de análise exploratória multivariada amostras de produtores diferentes, a fim de se verificar diferenças/semelhanças nas amostras.
- Avaliar, por meio de calibração multivariada, os resultados dos ensaios de flavonoides e as análises espectrofotométricas UV-Vis.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PROPÓLIS

Dentre os vários produtos naturais existentes a própolis é um dos mais utilizados pela humanidade. Os egípcios utilizavam a própolis para embalsamar cadáveres por conhecerem suas propriedades anti-putrefativas, além disso, médicos gregos e romanos como Aristóteles, Dioscorides, Plínio e Galeno reconheceram suas propriedades medicinais. O uso de extratos de própolis na medicina popular é documentado desde 300 a.C. (LUSTOSA et al., 2008).

Nos anos de 1950 e 1960 foi quando a própolis começou a ser considerada para o tratamento de problemas de saúde na ex-União Soviética e em vários países do leste europeu. Até 1980 a própolis não teve popularidade nos países do oeste europeu, na América do Sul e do Norte e no Japão, tornando-se apenas na metade dos anos 80 um produto importante na medicina alternativa e complementar. No Brasil, o interesse pela própolis também aconteceu na década de 80 com o trabalho pioneiro de Ernesto Ulrich Breyer, apresentando em seu livro, “Abelhas e saúde”, suas propriedades terapêuticas e sua utilização como antibiótico natural (LUSTOSA et al., 2008).

A palavra própolis é derivada do grego pro-, em defesa, e polis-, cidade ou comunidade, ou seja, em defesa da comunidade. É uma mistura complexa, formada por material resinoso e balsâmico coletado a partir dos ramos, flores, pólen, brotos e exsudatos de árvores; além desses, na colmeia são adicionadas secreções salivares e enzimas pelas abelhas (LUSTOSA et al., 2008).

Trata-se de uma substância resinosa, de aroma característico, e dependendo de sua origem botânica e idade sua cor pode variar de marrom-escuro a uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado (MARCUCCI, 1996). Tem cheiro característico, agradável ao olfato, e consistência terrosa ou pegajosa, também dependendo de sua origem botânica e idade (AZEVEDO et al., 1986; BANSKOTA et al., 2000). Fisicamente, a própolis é dura e quebradiça quando fria e maleável e muito pegajosa quando quente. Seu ponto de fusão é variável entre 60 °C a 70 °C atingindo até 100 °C em alguns casos (MARCUCCI, 1996).

A própolis é elaborada na colmeia por métodos, armadilhas ou raspagem, que apresentem melhor qualidade e menor contaminação. A retirada é realizada antes do inverno em regiões temperadas e, em climas tropicais, é no início da estação chuvosa, quando a própolis parece mais ativa. As abelhas utilizam a própolis para proteção contra insetos e microrganismos empregando-as em finas camadas nas paredes internas das colmeias, para

vedar buracos e rachaduras, reparar e fortalecer os favos de mel e proteger a entrada da colmeia de modo a manter um local asséptico para a postura da abelha rainha e na mumificação de insetos invasores (BASTOS, 2010).

Inúmeros estudos farmacológicos com a própolis têm sido propostos devido às suas propriedades antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antioxidante, antitumoral, imunomodulatória, etc. (BANKOVA, POPOVA e TRUSHEVA, 2006). Possui uma composição química bastante complexa e variada, estando diretamente relacionada com a ecologia da flora da região visitada pelas abelhas e com o período de coleta da resina. Além disso, a variabilidade genética das abelhas pode influenciar na sua composição química (LUSTOSA et al, 2008).

A origem geográfica, os recursos vegetais, a estação coletora, as espécies de abelhas e os solventes utilizados na extração influenciam a constituição química, física, biológica e a atividade farmacológica da própolis. No Brasil, a coleta da própolis acontece durante todo o ano o que leva a uma variação sazonal na sua composição. A diminuição em alguns componentes biologicamente ativos como os fenólicos são acompanhados pelo aumento de outros, por exemplo, ácidos diterpênicos. Deste modo, espera-se que algumas atividades biológicas relacionadas a estes compostos possam ser similares em diferentes estações do ano (BASTOS, 2010).

Em termos químicos foi revelada pioneiramente a complexidade composicional da própolis pela técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), o que permitiu a detecção de mais de 150 componentes. Dentre as fontes naturais é considerada uma das substâncias mais heterogêneas encontradas. Hoje mais de 300 constituintes já foram identificados e/ou caracterizados em diferentes amostras de própolis (BASTOS, 2010).

A composição química da própolis inclui flavonoides (como a galangina, quercetina, pinocembrina e kaempferol), ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos e cetonas, terpenoides e fenilpropanoides (como os ácidos cafeico e clorogênico), esteroides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos e inúmeros outros componentes em pequenas quantidades. Dentre todos esses grupos os flavonoides são os que vem mais chamando atenção dos pesquisadores (LUSTOSA et al., 2008).

A própolis é uma mistura de várias substâncias e não é facilmente extraída ou fracionada. O fracionamento da amostra torna-se necessário para determinar sua composição

química. Os constituintes do extrato da própolis variam de acordo com o método de extração. Mais notavelmente, a própolis obtida pela extração aquosa contém aminoácidos, matéria orgânica e carboidratos, os quais não estão presentes na extração etanólica. A extração aquosa é amplamente usada como aditivo em alimentos e cosméticos, devido às suas propriedades e por causar mínima estimulação olfatória. Por outro lado, a extração com etanol fornece facilmente compostos lipofílicos, que estão em grandes quantidades (INOUE et al., 2008).

Os compostos fenólicos são os que mais são destacados dentre os componentes da própolis, uma vez que são considerados responsáveis pela grande parte das propriedades deste apiterápico. Isso se deve ao fato de que os compostos fenólicos exercem múltiplos efeitos como antioxidantes, antitumorais, anti-inflamatórios, anticancerígenos, dentre outros (COUTINHO, MUZITANO e COSTA, 2009).

Uma das propriedades biológicas da própolis que é popularmente mais conhecida é a sua atividade anti-inflamatória. Pesquisadores têm observado seu efeito imunorregulador frente à produção de fatores envolvidos no processo inflamatório, como as citocinas, quimiocinas, prostaglandina, dentre outros. Hu e colaboradores (2005) observaram que extratos aquosos e etanólicos de própolis diminuíram a extensão da resposta inflamatória por meio da inibição da produção de prostaglandinas e de óxido nítrico (NO), além de um possível impedimento da ativação de macrófagos (PAGLIARONE et al., 2009).

3.2 INFLAMAÇÃO

A resposta inflamatória é a primeira defesa do organismo a um dano tecidual, sendo um processo biológico complexo que abrange componentes vasculares, celulares e várias substâncias solúveis. O objetivo desse processo é retirar o estímulo que levou a essa resposta e iniciar a recuperação do tecido local. Durante a inflamação, diversos sistemas bioquímicos, como a cascata do sistema do complemento e da coagulação, são ativados, ajudando no estabelecimento, evolução e resolução do processo. Além disso, substâncias solúveis de meia-vida curta são liberadas, desempenhando sua ação e são degradadas. Em geral, o sucesso na retirada do estímulo desencadeador leva ao término da resposta aguda e ao reparo completo do tecido (CRUVINEL et al., 2010).

A inflamação pode ser aguda ou crônica. A aguda é caracterizada pelo seu início rápido e de curta duração, progride a partir de uma fase vascular iniciada pelas células do próprio tecido imediatamente após o dano, pela exsudação de líquido e proteínas plasmáticas,

além do acúmulo de leucócitos, principalmente neutrófilos. Assim que ocorre uma agressão, ocorre vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar mediados por aminas vasoativas, histamina e serotonina, liberadas por mastócitos e monócitos poucos minutos depois da agressão. O endotélio local ativa-se o que ajuda a aderência dos leucócitos e sua migração para os tecidos. Macrófagos próprios do tecido lesado liberam citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α e quimiocinas, além de produzirem espécies reativas de oxigênio (EROs), e intermediários reativos do nitrogênio, como o óxido nítrico (NO). Já no tecido, as células procuram fagocitar o patógeno, levando ao reparo da lesão. Na inflamação aguda, destacam-se elementos da resposta imune inata e as principais células envolvidas são os neutrófilos e macrófagos (CRUVINEL et al., 2010).

Na inflamação crônica, onde ocorre a persistência do estímulo, o processo inflamatório se mantém e sofre alterações qualitativas, caracterizadas por mudança progressiva nos elementos celulares e solúveis que infiltram o tecido. A permanência do agente lesivo leva à cronificação do processo, havendo ao mesmo tempo destruição e reparo tecidual. Na inflamação crônica, o tecido apresenta um infiltrado constituído por células mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos), sinais de angiogênese e fibrose (CRUVINEL et al., 2010).

Diversas patologias levam ao processo inflamatório, tais como contusões, tendinites, infecções respiratórias, asma e doenças auto-imunes. É um mecanismo de defesa do organismo, em que o objetivo é a eliminação da causa inicial da lesão celular, que pode acontecer pela ação de patógenos ou de agentes físicos (CONTRAN, 2000). A área inflamada, em nível macroscópico, apresenta características marcantes, chamadas de sinais cardinais. A região atingida torna-se avermelhada, edemaciada, quente e dolorosa, havendo interferência ou alteração da sua função (COUTINHO, MUZITANO e COSTA, 2009).

A sensação de calor é causada pelo aumento da circulação de sangue através dos vasos dilatados, também resultando no rubor. O tumor ou inchaço é resultado do aumento da passagem de fluidos dos vasos sanguíneos dilatados para os tecidos circulantes e a infiltração de células na região danificada. A dor é devido a efeitos diretos de mediadores, causada pelo dano inicial ou resultante da resposta inflamatória em si e do alongamento das fibras sensoriais devido ao edema. A perda de função refere-se à simples perda de mobilidade em uma articulação, devido ao edema e a dor ou à substituição de células funcionais por tecido de cicatrização. Essa resposta promove proteção aos tecidos, restringindo os danos no local da

infecção ou injúria, mas podendo ter efeitos deletérios quando de forma exacerbada (PUNCHARD, WHELAN e ADCOCK, 2004).

O processo inflamatório tem como resultado final a cura ou a inflamação crônica se a resposta imune não for suficiente, ocorrendo quando o patógeno ou a substância nociva persistirem e acontecer a evolução do processo (COUTINHO, 2009). A resposta inflamatória é geralmente benéfica ao organismo, ou seja, não há a evolução do processo levando à inflamação crônica, resultando na eliminação de microrganismos por fagocitose ou lise, pelo sistema do complemento, diluição ou neutralização de substâncias irritantes ou tóxicas pelo extravasamento local de fluidos ricos em proteínas, e limitação da lesão inicial pela deposição de fibrina (CRUVINEL et al., 2010).

3.3 FLAVONOIDES

Os flavonoides são considerados os principais compostos responsáveis pelos efeitos benéficos da própolis. Pelo alto teor dessas substâncias em sua composição é atribuído o uso da própolis como anti-inflamatório e cicatrizante (BARBOSA et al., 2009). Representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. São encontrados em frutas, vegetais, sementes, cascas de árvores, raízes, talos, flores e em seus produtos de preparação, tais como os chás e vinhos. Apresentam um núcleo característico C6-C3-C6, sendo biossintetizados a partir das vias do ácido chiquímico e do ácido acético. (COUTINHO, MUZITANO e COSTA, 2009).

Já foram descritos mais de 6.000 tipos de flavonoides (MARCHAND, 2002; YANG et al., 2001), sendo suas principais classes os flavonóis, as flavonas, as flavanonas, as catequinas, as antocianidinas e as isoflavonas (COOK e SAMMAN, 1996). Eles representam um dos grupos mais importantes encontrados no reino vegetal (SIMÕES et al., 2004). Essas substâncias possuem núcleo fundamental com anel aromático e cada tipo pode apresentar modificações, como hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação ou ramnosilação, resultando numa enorme diversidade de flavonóides na natureza (OLIVEIRA et al., 2010).

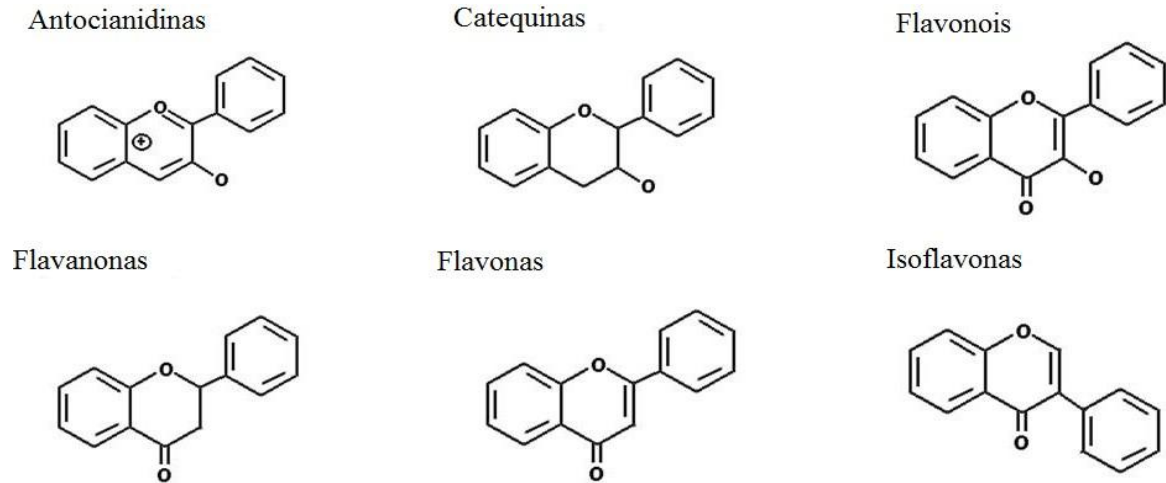


Figura 1 - Estruturas químicas dos principais flavonoides. Fonte: ROQUE (2013).

Combinações isoladas em ensaios biológicos revelam que essa classe de polifenóis possui uma grande ação sobre os sistemas biológicos demonstrando efeitos antimicrobiano, antiviral, antiulcerogênico, citotóxico, antineoplásico, antioxidante, antihepatotóxico, antihipertensivo, hipolipidêmico, anti-inflamatório e antiplaquetário. Também demonstrou aumento na permeabilidade capilar, inibição da exudação protéica e migração de leucócitos. Todos esses efeitos lhe conferem uma grande importância farmacológica e podem estar relacionados às propriedades inibitórias que os flavonóides desempenham nos vários sistemas enzimáticos incluindo hidrolases, isomerases, oxigenases, oxidoredutases, polimerases, fosfatases, proteínas fosfoquinases e aminoácidos oxidases (MACHADO et al., 2010).

O processo inflamatório é caracterizado pelo aumento da permeabilidade do endotélio e o influxo de leucócitos no interstício, resultando em edema. Uma variedade de fármacos anti-inflamatórios é usada para reduzir este processo e a utilização dos flavonoides tem sido bastante estudada tanto em testes *in vitro* como *in vivo* (BENAVENTE-GARCIA e CASTILLO, 2008). Os ensaios *in vitro* são realizados em culturas de células com indutores de inflamação. Em seguida, os flavonoides são avaliados em relação à sua capacidade de reduzir ou inibir a formação de mediadores; a produção de enzimas e citocinas envolvidas no processo inflamatório. Nos ensaios *in vivo*, os animais também são alvo de indutores de inflamação e os flavonoides podem ser capazes de reduzir ou inibir a formação de edema, migração das células de defesa, formação de mediadores e enzimas, dentre outros (SANTANGELO et al., 2007; YOON e BAEK, 2005).

Quanto à atividade anti-inflamatória, os flavonoides atuam modulando células envolvidas com a inflamação (por exemplo, inibindo a proliferação de linfócitos T), inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- α e IL-1), modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como a fosfolipase A2, ciclo-oxigenase e lipooxigenase, além de modularem a enzima formadora de óxido nítrico a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), dessa forma os flavonoides constituem uma alternativa potencial como agentes terapêuticos frente aos processos inflamatórios (COUTINHO, MUZITANO e COSTA, 2009).

Diversas técnicas são empregadas para o doseamento de flavonoides em materiais vegetais; uma delas, a espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) alcança grande destaque devido a sua simplicidade, rapidez, baixo custo de execução e ampla disponibilidade (KOMAROVA et al., 2009; ALVES et al., 2010).

Para obtenção dos espectros dos flavonoides sem a interferência de outros compostos fenólicos, geralmente se emprega o método colorimétrico com cloreto de alumínio (AlCl_3) para o tratamento das amostras a serem analisadas. Isto porque o cátion Al^{3+} forma complexos estáveis com as hidroxilas livres dos flavonoides (Figura 2), ocasionando extensão do sistema conjugado e um deslocamento dos seus máximos de absorção para regiões de maiores comprimentos de onda (MARCUCCI, WOISKY e SALATINO, 1998; BURIOL et al., 2009).

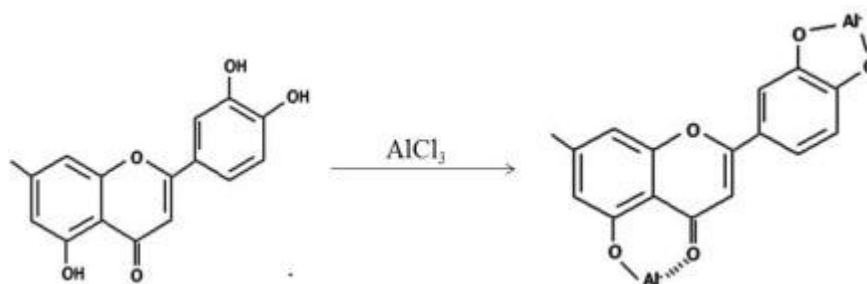


Figura 2 – Formação do complexo flavonoide-Al, em solução metanólica de AlCl_3 (ROQUE, 2013).

O tempo de reação necessário para formação do complexo exerce função importante na resposta de métodos espectrofotométricos e em estudo feito por MARQUES et al. (2012) demonstrou-se que o aumento da absorbância ocorre a partir de 30 minutos da adição do AlCl_3 . A cinética da complexação permanece estável até o fim do experimento, 60 minutos.

3.4 ESPECTROFOTOMETRIA UV-Vis

A espectrofotometria UV-Vis tem sido uma técnica analítica utilizada para garantir o controle de qualidade de matrizes quimicamente complexas como os extratos de própolis, sendo largamente empregada para o doseamento de flavonoides em materiais vegetais (TOMAZZOLI et al., 2015). De acordo com a literatura, os flavonoides possuem espectros de absorção característicos no ultravioleta-visível (UV-Vis), determinados pelo núcleo comum benzopirona, com dois máximos de absorção (240 nm a 285 nm e 300 nm a 400 nm) (FALCÃO et al., 2013).

Espectrofotômetros são instrumentos capazes de registrar dados de absorbância ou transmitância em função do comprimento de onda. Este registro é chamado de espectro de absorção ou de espectro de transmissão, se o dado registrado for de absorbância ou transmitância, respectivamente. O espectro de absorção é característico para cada espécie química, sendo possível a sua identificação por seu “espectro de absorção” (LEMOS et al., 2009).

Quando a região espectral usada é a do UV-Vis são necessários componentes óticos de quartzo e detectores altamente sensíveis capazes de detectar radiações nessa extensa faixa espectral em que atua o instrumento. Os espectrofotômetros, em geral, contêm cinco componentes principais: fontes de radiação, monocromador, recipientes para conter as soluções, detectores e indicadores de sinal (LEMOS et al., 2009).

A espectrofotometria na região UV-Vis do espectro eletromagnético é uma das técnicas analíticas mais empregadas, em função da sua robustez, custo relativamente baixo e grande número de aplicações desenvolvidas. É usada para a determinação de compostos orgânicos e inorgânicos (ROCHA, 2004).

A absorção da radiação nas regiões visível e ultravioleta depende, em primeiro lugar, do número e do arranjo dos elétrons nas moléculas ou íons absorventes. Como consequência, o pico de absorção pode ser correlacionado com o tipo de ligação que existe na espécie que está sendo estudada (LEMOS et al., 2009).

A espectrofotometria de absorção é fundamentada na lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético. Para medidas de absorção de radiação em determinado comprimento de onda, tem-se: $A = \log(I_0/I) = \epsilon bc$, onde A é a absorbância, I_0 é a intensidade da radiação monocromática que

incide na amostra e I é a intensidade da radiação que emerge da amostra. A absorvidade molar (ϵ) é uma grandeza característica da espécie absorvente, cuja magnitude depende do comprimento de onda da radiação incidente. O termo c é a concentração da espécie absorvente e b , a distância percorrida pelo feixe através da amostra (ROCHA, 2004).

Os espectros de absorção dos extratos combinados com métodos que envolvem análise multivariada, por exemplo, análise exploratória de dados e calibração multivariada, podem ser usados para obter vários tipos de informações da matriz estudada. Nesse sentido, a análise envolvendo calibração multivariada pode determinar valores de uma dada propriedade, por meio de sinais analíticos instrumentais como os espectros de absorção na região UV-Vis, que estão diretamente ligados ao conteúdo de compostos bioativos que absorvem radiação nessa região (BARBEIRA, PAGANOTTI e ASSIMOS, 2013).

3.5 QUIMIOMETRIA

A geração de vetores de dados por amostra e a correlação dos mesmos com várias respostas exige o uso de métodos de análise multivariada de dados, como os providos pela área do conhecimento denominada quimiometria.

A quimiometria envolve a aplicação de métodos matemáticos, estatísticos e computacionais para investigar, interpretar, classificar e fazer previsão de conjuntos de dados de interesse químico (SOUZA e POPPI, 2012). Dessa forma, pode-se entender que a quimiometria não é uma disciplina nem da matemática, nem da estatística, e sim da química, devido ao fato de que os problemas que ela se propõe a resolver são de interesse e originados na química, ainda que os instrumentos utilizados para o trabalho provenham principalmente da estatística, computação e matemática (WINEFORDNER, 2004).

Assim vários procedimentos quimiométricos têm sido propostos para os mais diversos fins, como a otimização de experimentos, classificação e calibração de dados, análise exploratória, seleção de variáveis, entre outros (TEÓFILO e FERREIRA, 2006). Especificamente para a classificação e calibração o modelo estatístico multivariado considera a correlação entre as amostras, entre as variáveis, e entre amostras e variáveis analisadas simultaneamente, possibilitando a obtenção de uma maior quantidade de informação.

Na calibração multivariada, como representado na Figura 3, espera-se estabelecer um modelo que relacione uma série de medidas realizadas em amostras, como os sinais instrumentais, com determinadas propriedades de interesse (SOUZA e POPPI, 2012). Essa calibração tornou-se nas últimas décadas uma ferramenta analítica importante em diferentes

campos de aplicação, principalmente nas análises de alimentos, farmacêutica, ambiental, na agricultura e na química industrial. Para encontrar as variáveis minimamente correlacionadas que tenham informações relacionadas ao parâmetro de interesse são utilizados os métodos de seleção de variáveis, então, a construção do modelo pode ser realizada com base nessas variáveis a fim de alcançar modelos mais simples, robustos, eficientes e fáceis de interpretar (NUNES, 2008).

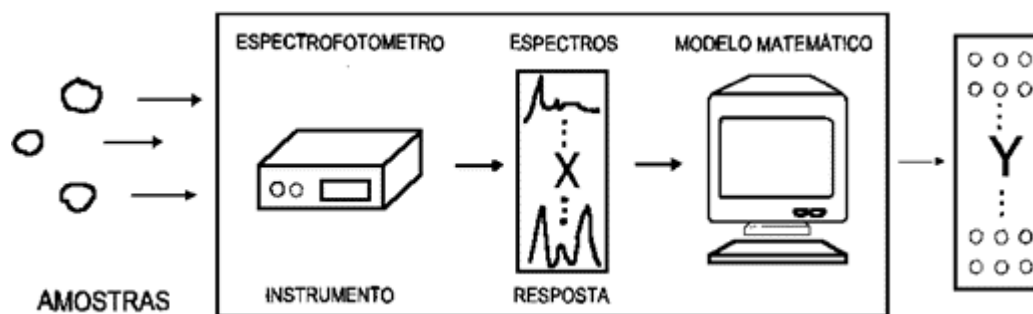


Figura 3 - Representação do procedimento de calibração multivariada.

Fonte: FERREIRA (1999).

A calibração multivariada pode ser definida então como o processo de construção de um modelo matemático para relacionar variáveis independentes às variáveis dependentes. Consideram-se como variáveis independentes os conjuntos de dados coletados por meio de instrumentos, neste trabalho, espectrofotômetro, utilizados para a construção de modelos de calibração multivariada (PAULA, 2014). Esses conjuntos podem ser organizados em uma matriz \mathbf{X} , denominada matriz de variáveis e amostras, onde as linhas dessa matriz representam o conjunto de amostras e as colunas as variáveis medidas. A matriz pode ser representada graficamente num espaço multidimensional, onde cada variável medida corresponde a uma dimensão do espaço e cada amostra um ponto no espaço (PEREIRA, 2012).

As variáveis dependentes são os conjuntos de valores de referência obtidos em laboratório, que servem como parâmetro para a calibração do modelo. Tais conjuntos podem ser representados por um vetor, denominado vetor de variáveis dependentes, ou valores de referência da propriedade de interesse (PAULA, 2014).

A calibração multivariada consiste em três etapas: calibração, validação e previsão. A partir do conjunto de variáveis independentes e dependentes é possível realizar a etapa de calibração onde é estabelecido um modelo matemático, obtido relacionando-se a matriz de dados das variáveis medidas, matriz \mathbf{X} , com a matriz de dados das propriedades de interesse determinados por um método de referência, matriz \mathbf{Y} (PEREIRA, 2012).

Na fase de calibração, "n" espectros para um conjunto de amostras com composição conhecida são obtidos em "p" valores de comprimento de onda diferentes, formando a matriz **X** com "n" linhas e "p" colunas, que contém as variáveis independentes. Também será formada uma matriz **Y** pelas variáveis dependentes, contendo "n" linhas, com os valores de concentração correspondendo às diferentes amostras, e "q" colunas, indicando o número de diferentes analitos presentes nas amostras (SANTOS, DEMIATE e NAGATA, 2010).

Na etapa de validação, o modelo é avaliado utilizando-se ferramentas estatísticas de diagnóstico (PEREIRA, 2012). Por fim, o modelo validado é aplicado para realizar a predição da(s) propriedade(s) de interesse. A predição é o processo de utilização do modelo para estimar, por exemplo, a concentração da propriedade de interesse de uma determinada amostra (PAULA, 2014). Como no caso a absorvância a um comprimento de onda pela amostra pode ser relacionada com a concentração do composto analisado, flavonoides.

Dessa forma, na calibração multivariada, ao contrário do que ocorre na univariada, utilizam-se múltiplas respostas para relacionar com as propriedades medidas das amostras (PARREIRA, 2003).

Este tipo de calibração tem como principais vantagens o fato de permitir determinações simultâneas de mais de um analito de interesse, possibilitando determinações mesmo na presença de interferentes além de apresentar uma diminuição do erro estimado no modelo devido ao fato de ser um método que utiliza múltiplas variáveis (PARREIRA, 2003).

Métodos de seleção de variáveis podem melhorar significativamente o desempenho dos modelos de calibração de espectros totais; esses métodos selecionam regiões específicas do espectro (um comprimento de onda ou um conjunto de comprimentos de onda) em que a colinearidade não é tão importante, enquanto gera modelos mais estáveis, robustos e mais simples de interpretar. Se baseiam na identificação de um subconjunto dos dados inteiros que produzirão erros de previsão mais baixos. Assim, informações irrelevantes ou não-linearidades podem ser eliminados (BORGES NETO, 2005). Um método que tem sido aplicado a um grande número de determinações para modelagem dos dados e que leva a bons resultados é o método dos quadrados mínimos parciais (Partial Least Squares - PLS).

O PLS baseia-se na montagem de uma matriz **X** a partir dos dados (variáveis independentes) e uma matriz **Y** a partir da propriedade de interesse (variáveis dependentes), posteriormente elimina-se as informações que não são importantes ao sistema utilizando-se o mesmo processamento da PCA e obtém-se a relação entre as matrizes **X** e **Y**. Nesse método são geralmente tratados os dados obtidos instrumentalmente, sendo muito empregado nas

análises de dados químicos por obter uma resposta rápida e possuir facilidade de entrada e processamento dos dados para atingir a resposta que se espera (SILVA, 2003).

O uso de espectroscopia combinada com métodos de calibração multivariada tornou-se tão popular na determinação de vários parâmetros analíticos, desde a determinação da concentração de analitos até a determinação das propriedades físico-químicas (BARBEIRA, PAGANOTTI e ASSIMOS, 2013).

Dessa forma, os estudos espectrofotométricos da própolis podem ser correlacionados a estudos de doseamento de flavonoides, fornecendo meios para a avaliação experimental da quantidade da substância, previsão matemática desses valores e o efeito anti-inflamatório da própolis, o que pode também ser usado para se inferir sobre a origem de produção. Sendo assim, a finalidade deste trabalho é correlacionar, por meio de análise multivariada, as análises espectrofotométricas e os resultados da determinação do teor de flavonoides a fim de obter informações sobre a quantidade dessa substância nos extratos de própolis, e a partir desses resultados, verificar a possibilidade de construção de modelos de calibração multivariada que descrevam da melhor maneira possível a relação estudada.

Ainda, os perfis espectrais das amostras de própolis podem ser estudados por abordagens de análise exploratória multivariada a fim de investigar os padrões de semelhança/dessemelhança das amostras. Um dos métodos mais comuns empregados com essa finalidade é a análise das componentes principais (PCA), sendo principalmente utilizada pela sua capacidade de interpretar os dados em função da existência de possível correlação entre as diversas variáveis medidas.

A análise das componentes principais se baseia essencialmente em reescrever as coordenadas das amostras em outro sistema de eixo mais conveniente para a análise dos dados. Em outras palavras, as n -variáveis originais geram, por meio de suas combinações lineares, n -componentes principais, sendo a principal característica a ortogonalidade (NETO e MOITA, 1998). Dessa forma, surge um novo conjunto de variáveis que irá concentrar a maior parte da informação (variância) em poucas variáveis, diminuindo assim a dimensionalidade dos dados, sem perder significativamente a informação química (SABIN, FERRÃO e FURTADO, 2004). A componente principal 1 detém mais informação estatística que a componente principal 2, que por sua vez tem mais informação estatística que a componente principal 3 e assim por diante (NETO e MOITA, 1998).

A PCA é vantajosa, pois permite encontrar semelhanças em amostras de origens desconhecidas e assim inferir sobre a formação de agrupamentos e a presença de padrões nos

dados, além de detectar amostras destoantes, o que confirma a ideia principal da PCA que é a de medir o quão determinada variável influencia na formação de determinado agrupamento.

4 METODOLOGIA

4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS

Em abril de 2018 a parceria com a Cooperativa Nacional de Apicultura (CONAP) foi retomada por meio de uma reunião conjuntamente com uma visita técnica, realizada nas instalações da fábrica, localizada em Nova Lima/MG. Com o reestabelecimento, a CONAP iniciou o fornecimento das amostras de própolis. Foram selecionadas ao todo 79 amostras de diferentes produtores, diferentes locais e de diferentes tipos (ultragreen, green, brown e resíduo black – Figura 4). As mesmas foram adequadamente armazenadas em refrigerador no Laboratório de Estudos em Quimiometria da UFOP, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para preservação de suas propriedades até os posteriores ensaios de extração

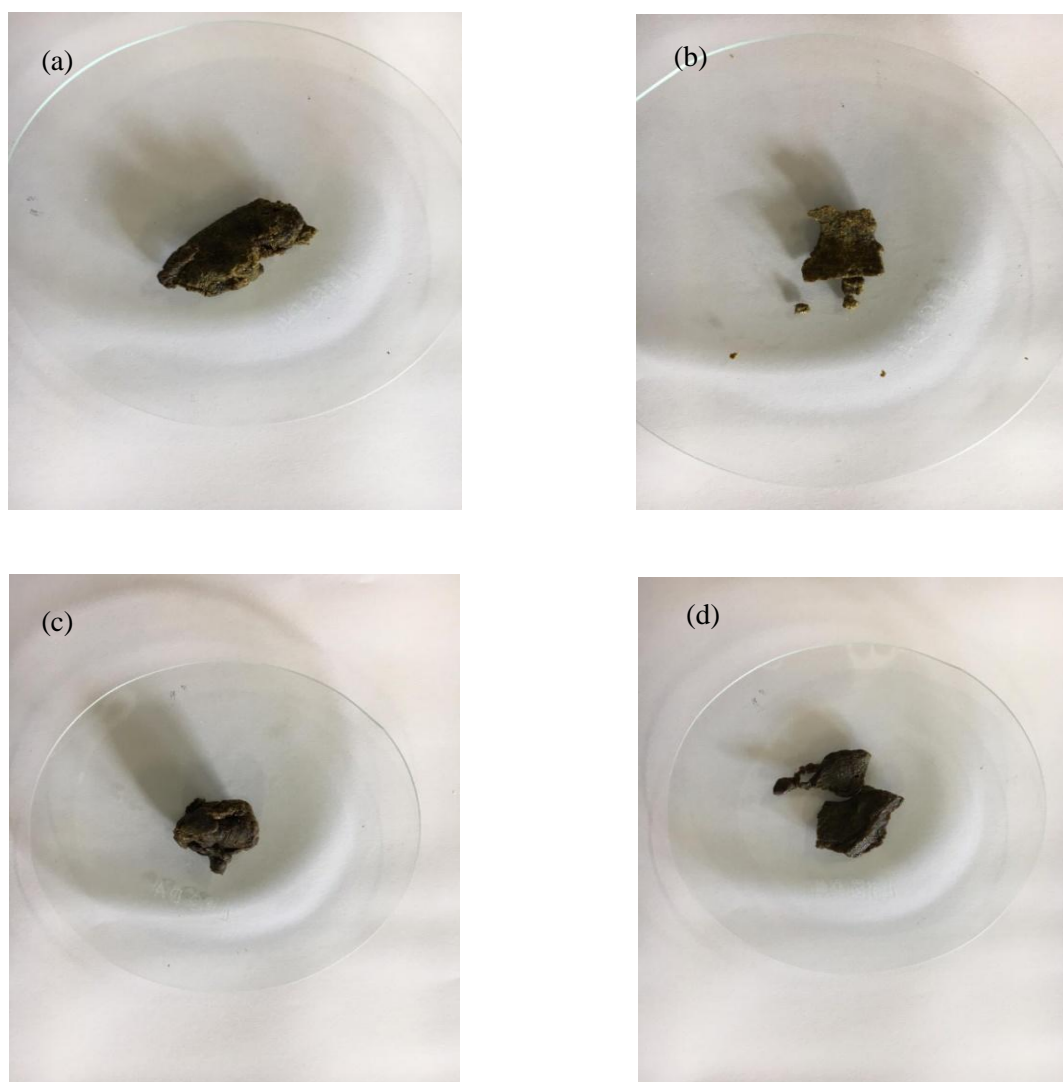


Figura 4 – Tipos de própolis cedidas pela CONAP para análise, brown (a), ultragreen (b), black (c) e green (d).

As diferentes amostras de própolis brutas foram submetidas à condição otimizada de extração para obtenção dos extratos alcoólicos, previamente definida em estudos anteriores do grupo de pesquisa. Estes por sua vez foram analisados por espectroscopia UV-Vis, determinado o doseamento dos flavonoides e realizado o tratamento quimiométrico dos dados.

4.2 DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS

A Tabela 1 apresenta as regiões amostradas neste trabalho, isto é, as áreas de produção das diferentes própolis cedidas pela CONAP.

Tabela 1 – Região de produção das própolis investigadas neste trabalho.

Região de cada produtor	
A: Formigas	K: Brumadinho
B: Formigas	L: Senhora de Oliveira
C: Entre Rios de Minas	M: Itapecerica
D: Dom Joaquim	N: Varginha
E: Jeceaba	O: Itaverava
F: Cruscilândia	P: Barbacena
G: Betim	Q: Mada
I: Divinópolis	R: Belo Vale
J: Pará de Minas	S: Piedade
T: Ouro Preto	

Na Tabela 2 estão listados os tipos de própolis analisados com as respectivas codificações e regiões de produção.

Tabela 2 – Codificação dos tipos de própolis em relação à região de produção.

Amostras de própolis (P)	Produtor de acordo com região	Tipo de própolis	Amostras de própolis (P)	Produtor de acordo com região	Tipo de própolis
P1	L	Brown	P41	S	Green
P2	O	Ultragreen	P42	C	Ultragreen
P3	K	Resíduo black	P43	S	Brown
P4	G	Green	P44	G	Green
P5	A	Resíduo black	P45	N	Ultragreen
P6	F	Ultragreen	P46	T	Green
P7	G	Resíduo black	P47	N	Resíduo black
P8	E	Resíduo black	P48	K	Resíduo black
P9	F	Resíduo black	P49	I	Green
P10	G	Green	P50	S	Resíduo black
P11	G	Brown	P51	C	Ultragreen
P12	B	Green	P52	G	Ultragreen
P13	O	Resíduo black	P53	D	Brown

P14	N	Brown	P54	O	Ultragreen
P15	O	Ultragreen	P55	F	Green
P16	B	Brown	P56	E	Resíduo black
P17	G	Brown	P57	N	Ultragreen
P18	K	Green	P58	N	Brown
P19	O	Brown	P59	Q	Brown
P20	E	Ultragreen	P60	J	Resíduo black
P21	O	Ultragreen	P61	P	Brown
P22	O	Green	P62	G	Brown
P23	E	Green	P63	G	Brown
P24	P	Ultragreen	P64	K	Brown
P25	R	Ultragreen	P65	N	Ultragreen
P26	G	Brown	P66	N	Green
P27	N	Ultragreen	P67	P	Green
P28	O	Ultragreen	P68	M	Ultragreen
P29	O	Green	P69	B	Brown
P30	K	Green	P70	G	Resíduo black
P31	L	Green	P71	M	Green
P32	B	Ultragreen	P72	G	Ultragreen
P33	I	Resíduo black	P73	K	Brown
P34	J	Brown	P74	O	Green
P35	S	Green	P75	C	Ultragreen
P36	C	Resíduo black	P76	L	Ultragreen
P37	R	Green	P77	I	Green
P38	N	Resíduo black	P78	I	Green
P39	C	Green	P79	B	Green

4.3 EXTRAÇÃO DA PRÓPOLIS BRUTA

As extrações foram realizadas segundo procedimento otimizado anteriormente pelo grupo de pesquisa (ROQUE, 2013), baseado no método de preparo da CONAP, no qual: as amostras recebidas foram cominuidas com o auxílio de uma espátula de aço inox e pesaram-se 2,0000 g das própolis brutas em balança analítica. Com o auxílio de uma pipeta volumétrica, 6 mL do solvente extrator, álcool etílico (Dinâmica, $\geq 99,5\%$ UV/ HPLC), previamente diluído a 80%, foram colocados em frascos âmbar previamente identificados com o produtor e tipo de própolis, sendo aquecidos por 2 h à temperatura de 70 °C em banho-maria. As amostras depois de preparadas foram devidamente identificadas e acondicionadas em frascos âmbar vedados por 4 dias e agitados duas vezes ao dia para a completa extração e posteriormente foi obtido os espectros.



Figura 5 – Amostras de própolis preparadas e acondicionadas para a análise espectrofotométrica.

4.4 ANÁLISES ESPECTROFOTOMÉTRICAS DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS

Para a obtenção dos espectros centrifugou-se as amostras a 5000 rpm por 10 min e diluiu-se 10.000 vezes os sobrenadantes obtidos. Desse modo, 2,5 μL do sobrenadantes foram pipetados e transferidos para balões volumétricos de 25 mL e aferidos com álcool etílico (Dinâmica, $\geq 99,5\%$ UV/ HPLC) 80%. Utilizando-se um par de cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico as amostras e o branco, constituído da solução etanólica a 80%, foram obtidos os espectros de varredura das amostras nas regiões UV-Vis, de 190 nm a 500 nm em espectrofotômetro Hack DRTM 6000 no Laboratório de Saneamento Ambiental da Universidade Federal de Ouro Preto.

4.5 DETERMINAÇÃO DOS FLAVONOIDES NOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS

Para a geração da curva analítica (calibração externa) para a determinação dos flavonoides foi utilizada a quercetina (Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$) como padrão. Assim, foram preparadas soluções etanólicas (Dinâmica, grau UV/HPLC) de quercetina nas concentrações de 20 $\mu\text{g/mL}$ a 200 $\mu\text{g/mL}$. Em placa de ELISA foram adicionados 100 μL das soluções de cada ponto da curva em poços adicionados de 100 μL da solução metanólica de alumínio 5%. Após 30 min em ambiente escuro foram medidas as absorvâncias das soluções por análise espectrofotométrica em leitor de microplacas para teste de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (Anthos 2010) a 425 nm em placas de 96 poços (MARCUCCI, WOISKY e SALATINO, 1998).

A determinação do teor dos flavonoides nos diferentes extratos de própolis foi feita pela leitura em leitor de ELISA a 425 nm, utilizando-se cloreto de alumínio a 5% em metanol. O cátion alumínio forma complexos estáveis com flavonoides em metanol, ocorrendo na

análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Nessas condições, o complexo flavonoide-alumínio absorve em comprimento de onda bem maior do que os flavonoides sem a presença do agente complexante. Os ácidos fenólicos, mesmo os que formam complexos com AlCl_3 , absorvem em comprimentos de onda muito inferiores, evitando-se dessa maneira interferências nas medidas de absorbância (MARCUCCI, WOISKY e SALATINO, 1998).

Para a determinação da concentração de flavonoides nas amostras foram adicionados 12 μL do sobrenadante dos extratos em tubos Eppendorf[®] de 1000 μL e completados seus volumes com álcool etílico 99,5%; destes 100 μL foram pipetados e adicionados nos poços da microplaca de ELISA e acrescentaram-se 100 μL de solução metanólica de cloreto de alumínio a 5%. Essa preparação ficou por 30 min em ambiente escuro para formação e estabilização do complexo e logo após foi medida a absorbância em 425 nm. Para o branco foram utilizados 100 μL da solução metanólica de cloreto de alumínio 5% e 100 μL de álcool etílico 99,5%.

4.6 TRATAMENTO QUIMIOMÉTRICO DOS DADOS

Os principais softwares e pacotes de algoritmos que foram empregados para a análise dos resultados foram: Excel (Microsoft, Co., USA), MatLab 9.1 (The MathWorks, Co., USA) e PLSToobox 8.2 (Eigenvector Research, Inc., USA).

Os espectros das diferentes amostras de própolis foram obtidos em formato digital e organizados em matrizes. Cada espectro foi devidamente identificado durante a organização da matriz, composta por linhas e colunas onde as linhas corresponderam às amostras de própolis e as colunas aos comprimentos de onda dos espectros. Os dados gerados do doseamento de flavonoides foram correlacionados a esses espectros por meio da construção de modelos de calibração multivariada utilizando-se o método dos quadrados mínimos parciais.

No método PLS a matriz \mathbf{X} dos espectros e o vetor \mathbf{y} resposta, teor dos flavonoides, foram centrados na média. Foi utilizado o método de validação-cruzada de blocos contínuos para a calibração e validação do modelo construído, com número máximo de variáveis latentes igual a 20 e divisão dos dados igual a sete. O conjunto de calibração foi constituído de 59 amostras e o de validação por 15 amostras, escolhidas utilizando o algoritmo Kennard-Stone (KENNARD e STONE, 1969).

Para a realização da análise das componentes principais a matriz obtida (espectros dos extratos de própolis e os teores dos flavonoides) foi centrada na média, utilizando o algoritmo

SVD (Single Value Decomposition) do PLSToolbox. Após a inserção da matriz e a seleção do pré-processamento adequado, a resposta do modelamento ocorre por meio de um output indicando a variância explicada por cada componente gerada e o operador seleciona o menor número de componentes que expliquem o máximo da variância desejada. Após esse procedimento é possível obter os gráficos que mostram o comportamento das amostras (gráficos de escores) e das variáveis (gráficos de pesos).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-Vis DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS

Após a obtenção dos extratos das amostras de própolis foram gerados os respectivos espectros (Figura 6).

De acordo com a literatura, os flavonoides possuem espectros de absorção característicos no UV-Vis, determinados pelo núcleo comum benzopirona, com dois máximos de absorção em 240 nm a 285 nm e 300 nm a 400 nm (FALCÃO et al., 2013).

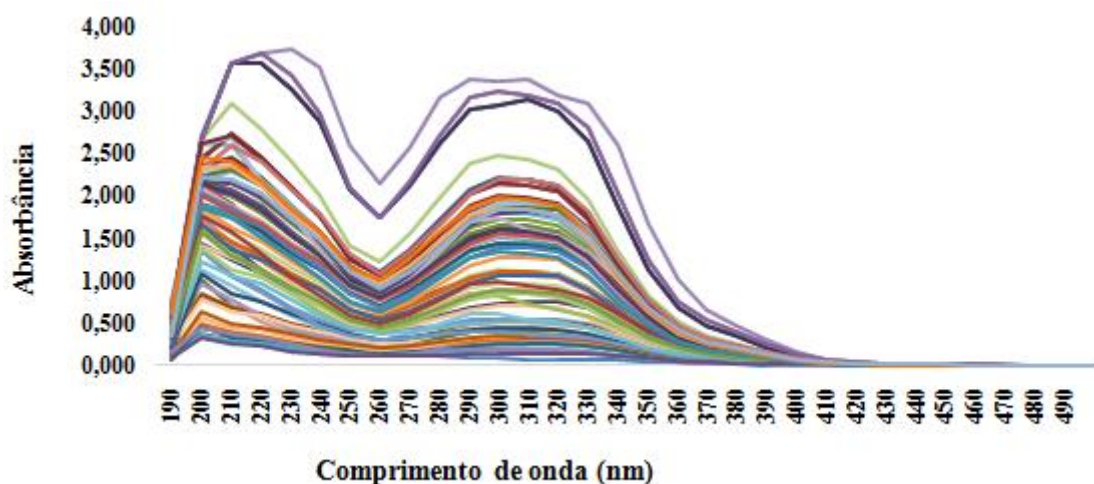


Figura 6 – Espectros UV-Vis obtidos dos extratos da própolis estudados.

As varreduras espectrais na região UV-Vis (Figura 6) apresentaram absorções máximas nos comprimentos de ondas próximos aos descritos por Falcão et al. (2013) e mostraram perfis de absorção semelhantes entre algumas amostras já que alguns componentes estão presentes em todas as amostras de própolis, enquanto outros ocorrem somente em própolis derivadas de espécies particulares de plantas, por exemplo. Tais diferenças estão relacionadas com a procedência das amostras que são de diferentes regiões de Minas Gerais, dependendo do local da coleta, da flora, da sazonalidade e do tipo de abelha (LUSTOSA et al, 2008).

5.2 DETERMINAÇÃO DOS FLAVONOIDES

O método para quantificação dos flavonoides totais baseia-se na propriedade do cátion alumínio formar complexos estáveis com os flavonoides, ocorrendo na análise espectrofotométrica um deslocamento da absorbância máxima para maiores comprimentos de

onda e, assim, as absorções ficam intensificadas na região espectral do visível. Desse modo, é possível determinar a quantidade de flavonoides na amostra evitando-se a interferência de outras classes de substâncias fenólicas (MARCUCCI, WOISKY e SALATINO, 1998; BURIOL et al., 2009).

A curva analítica (Figura 7) foi gerada a partir de cinco valores de concentração obtidos de uma solução padrão etanólica de quercetina a 400 ppm, com a faixa de valores entre 20 µg/mL a 200 µg/mL, todos feitos em duplicata e realizada a média para a obtenção das absorbâncias finais. Os níveis de concentração da curva analítica foram 20 µg/mL, 65 µg/mL, 110 µg/mL, 155 µg/mL e 200 µg/mL e, assim, obtidas as absorbâncias a 425 nm gerando-se a curva correspondente. A equação da curva e o valor do coeficiente de determinação (R^2) foram, respectivamente, $y = -5 \times 10^{-5}x^2 + 0,0211x + 0,4465$ e $R^2 = 0,9968$.

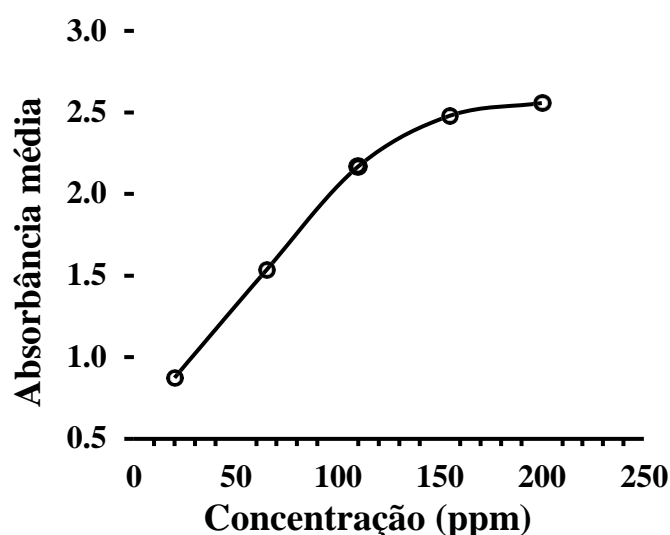


Figura 7 – Curva analítica obtida a partir de uma solução padrão de quercetina para a determinação do teor dos flavonoides.

Os valores das absorbâncias obtidos na construção da curva analítica e das amostras de própolis são apresentados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 – Valores das absorbâncias obtidos na determinação da curva analítica; determinações em duplicata.

Pontos da curva (CP)	Absorbância (425 nm)	Pontos da curva (CP)	Absorbância (425 nm)
CP1	0,839	CP1	0,910

CP2	1,535	CP2	1,534
CP3	2,140	CP3	2,198
CP4	2,442	CP4	2,519
CP5	2,533	CP5	2,583

Tabela 4 – Absorbâncias obtidas a 425 nm dos extratos etanólicos de própolis para a determinação dos flavonoides. Amostras excluídas representadas por traço (-).

Amostras de própolis (P)	Absorbância (425 nm)	Amostras de própolis (P)	Absorbância (425 nm)
P1	2,189	P41	2,237
P2	2,365	P42	2,170
P3	1,791	P43	1,491
P4	2,133	P44	2,583
P5	0,788	P45	2,588
P6	2,449	P46	1,641
P7	1,885	P47	2,318
P8	1,692	P48	1,405
P9	0,635	P49	2,104
P10	1,832	P50	1,367
P11	2,621	P51	0,688
P12	2,071	P52	-
P13	1,164	P53	1,908
P14	2,489	P54	-
P15	2,038	P55	1,936
P16	-	P56	1,601
P17	2,641	P57	2,122
P18	1,729	P58	1,664
P19	2,005	P59	2,034
P20	2,184	P60	0,742
P21	2,534	P61	1,791
P22	1,715	P62	-
P23	2,011	P63	2,143
P24	0,692	P64	2,326
P25	0,660	P65	2,641
P26	1,894	P66	2,263
P27	-	P67	2,133
P28	2,178	P68	2,318
P29	1,957	P69	0,869
P30	1,975	P70	0,741
P31	0,850	P71	2,564
P32	2,288	P72	2,569
P33	0,983	P73	1,952
P34	1,898	P74	2,044
P35	2,094	P75	2,462
P36	0,728	P76	2,101
P37	2,316	P77	0,756
P38	1,026	P78	0,682

P39	2,527	P79	2,592
P40	2,199		

Os valores de absorvância das amostras P16, P27, P52, P54 e P62 foram excluídos da determinação dos flavonoides e, consecutivamente, da análise multivariada, por ultrapassarem o limite máximo de absorvância da curva analítica. Utilizando-se a equação da curva foram determinados os teores dos flavonoides diluídos (em ppm), sendo os teores das amostras obtidos após a multiplicação pelo fator de diluição (Tabela 5).

Tabela 5 - Concentração (ppm) dos flavonoides nos extratos etanólicos das própolis investigadas. Amostras excluídas representadas por traço (-).

Amostras de própolis (P)	Concentração de flavonoides (ppm)	Amostras de própolis (P)	Concentração de flavonoides (ppm)
P1	9387,85	P41	9805,21
P2	11047,20	P42	9228,41
P3	6517,92	P43	4772,83
P4	8926,33	P44	14056,09
P5	1404,80	P45	14155,95
P6	12010,72	P46	5613,53
P7	7124,47	P47	10565,57
P8	5913,16	P48	4314,83
P9	760,91	P49	8696,74
P10	6778,29	P50	4117,42
P11	14906,97	P51	981,13
P12	8442,50	P52	-
P13	3108,37	P53	7278,31
P14	12533,77	P54	-
P15	8195,14	P55	7468,76
P16	-	P56	5383,68
P17	15489,40	P57	8838,54
P18	6135,44	P58	5747,72
P19	7954,14	P59	8165,60
P20	9345,60	P60	1208,55
P21	13196,11	P61	6517,92
P22	6050,83	P62	-
P23	7997,51	P63	9006,92
P24	997,87	P64	10645,19
P25	864,42	P65	15489,40
P26	7184,39	P66	10040,92
P27	-	P67	8926,33
P28	9295,17	P68	10565,57
P29	7613,98	P69	1756,29
P30	7740,16	P70	1204,31
P31	1673,15	P71	13699,95

P32	10274,73	P72	13790,43
P33	2264,64	P73	7579,21
P34	7211,14	P74	8239,63
P35	8618,94	P75	12175,16
P36	1149,29	P76	8673,33
P37	10545,81	P77	1268,03
P38	2460,82	P78	956,05
P39	13086,67	P79	14237,99
P40	9473,03		

5.3 ANÁLISE MULTIVARIADA DOS DADOS

Analisando-se na Tabela 6 as dez amostras com as maiores concentrações de flavonoides pode-se sugerir que o teor dessa substância não está relacionado com um tipo específico de própolis ou com um tipo de produtor e região, visto que os maiores teores foram encontrados em diferentes tipos de própolis (brown, ultragreen e green) e em distintas regiões de produção (Betim, Formigas, Itaverava, Entre Rios de Minas, Varginha, Itapecerica e Brumadinho).

Segundo Bontempo (2008), em média, uma abelha voa 500 m de distância da colmeia podendo visitar quase 200 flores por viagem. Além disso, os enxames podem recolher néctar e resinas em um raio de até 10 km, certamente refletindo numa composição variada da própolis. Desse modo, as diferenças entre as amostras podem então estar relacionadas tanto ao local de coleta, quanto com os recursos vegetais, com o período sazonal da produção e as espécies de abelhas. Isso influencia diretamente as constituições química, física, biológica e a atividade farmacológica da própolis. Como no Brasil a coleta da própolis acontece durante todo o ano é provável que a variação sazonal seja fator determinante na composição do produto final (BASTOS, 2010).

Tabela 6 – Amostras com as maiores concentrações dos flavonoides e as respectivas regiões e tipo de amostra.

Amostras	Concentração de flavonoide (ppm)	Região/Tipo de própolis
P11	14906,97	Betim/Brown
P17	15489,40	Formigas/Brown
P21	13196,11	Itaverava/Ultragreen
P39	13086,67	Entre Rios de Minas/Green
P44	14056,09	Betim/Green
P45	14155,95	Varginha/Ultragreen
P65	15489,40	Varginha/Ultragreen
P71	13699,95	Itapecerica/Green
P73	13790,43	Brumadinho/Brown
P79	14237,99	Formigas/Green

A Figura 8 mostra o gráfico de escores da PCA, aonde se tem a distribuição das amostras de própolis em função dos perfis espectrais e teores de flavonoides. A PC1 é a primeira componente principal e explica a maior variabilidade dos dados (98,25%) e a PC2 explica cerca de 1,03% da informação totalizando, então, somente com essas duas componentes, 99,28% da variância original dos dados. Pode ser constatado que as amostras não mostram perfis de distribuição em função da região de coleta, isto é, a região de produção não infere características específicas nas amostras a fim de se ter um padrão de comportamento, mas também nem o tipo de própolis (green, ultragreen e brown).

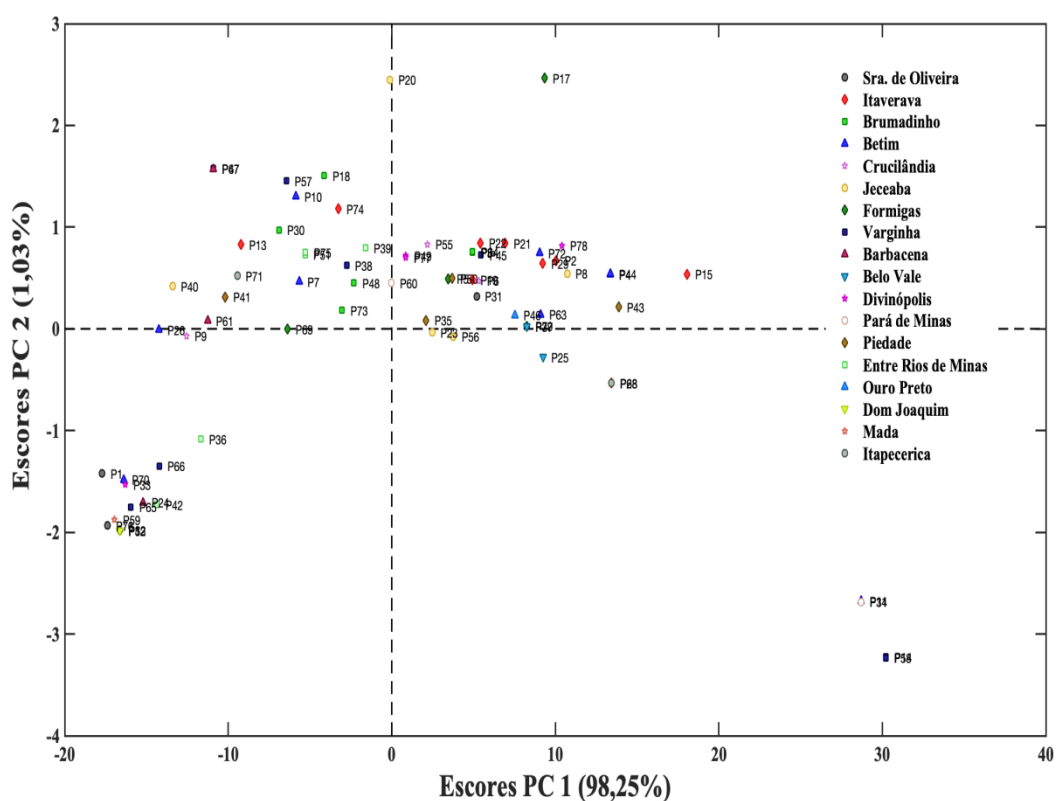


Figura 8 - Distribuição das amostras de própolis em função dos espectros UV-Vis e teores dos flavonoides.

A Figura 9 mostra o gráfico de pesos para a PC1, aonde se pode identificar que as regiões espectrais que influenciaram a distribuição das amostras em função desta componente se dão nos comprimentos de onda dos máximos de absorbância relacionados aos núcleos benzopirona constituintes da própolis. Ainda, na Figura 10, a última variável (de número 500) corresponde aos teores de flavonoides sendo estes de baixa magnitude quando comparados aos máximos de absorbância, mostrando que essas concentrações não permitem a

diferenciação das amostras.

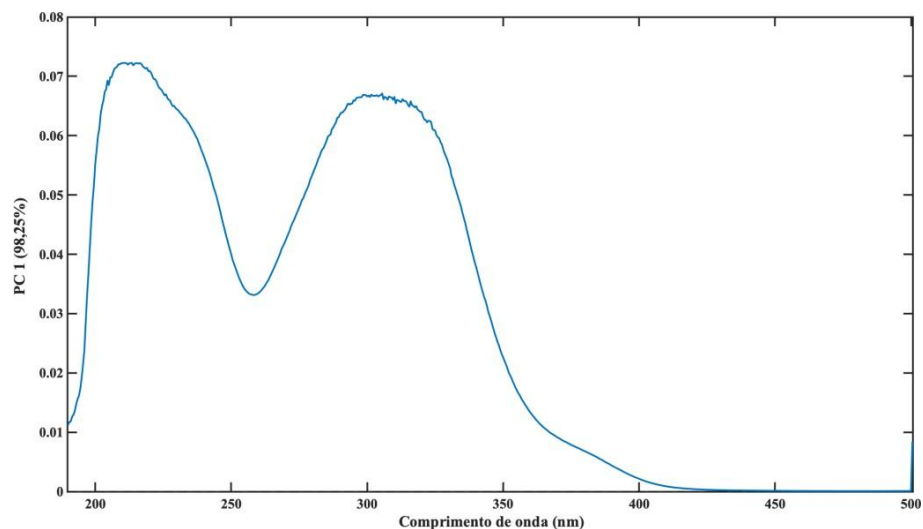


Figura 9 – Gráfico de pesos para a componente 1 em função das variáveis comprimentos de onda e teor de flavonoides (variável 500).

Observando o gráfico de pesos apenas para a PC2 (Figura 10) pode-se notar que para esta componente somente a região espectral em torno de 200 nm contribui para a sua formação, inclusive, com um valor de peso consideravelmente maior ($\cong 0,20$) quando comparado ao alcançado na formação da PC1 ($\cong 0,07$), informando que faixa do espectro tem maior importância para a PC2 do que para a PC1.

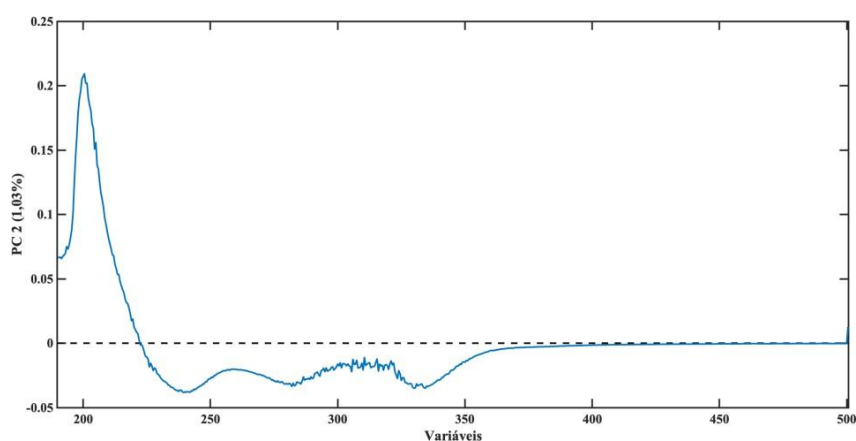


Figura 10 – Gráfico de pesos para a componente 2 em função das variáveis comprimentos de onda e teor de flavonoides (variável 500).

A calibração multivariada por meio dos quadrados mínimos parciais foi realizada porém não foi possível correlacionar os espectros com os respectivos teores dos flavonoides

das diversas amostras investigadas, mostrando um possível grau de maior complexidade entre estes parâmetros ou a necessidade de diferentes abordagens de análise química para esse fim, como a adição o íon metanólico de alumínio aos espectros para posterior obtenção dos espectros ou seja necessário uma quantidade maior de amostras de cada tipo de própolis podendo-se tentar uma correlação entre o mesmo tipo.

6 CONCLUSÕES

Avaliando-se a possível correlação entre perfis espectrais e os teores de flavonoides nos extratos de própolis de diferentes tipos e de regiões distintas pôde-se observar que não houve correlação entre os parâmetros com as abordagens químicas e de tratamento multivariado de dados utilizadas.

Os fatores que contribuíram para esse resultado podem ter sido oriundos do fato de que as amostras não possuíram diferença de sazonalidade e, talvez, do tipo de material vegetal coletado pelas abelhas para obtenção das amostras de própolis estudadas, ou pela variabilidade genética das abelhas não existir nesse caso, já que todas as amostras cedidas foram de uma macro-região do estado de Minas Gerais podendo todos os produtores utilizarem o mesmo tipo de abelha.

A análise das componentes principais também não apontou diferenciação das amostras em função dos parâmetros investigados (perfil espectral na região do UV-Vis e teor de flavonoides) apontando uma possível similaridade das própolis na macro-região do estado de Minas Gerais investigada.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Construir e validar um modelo para previsão das propriedades biológicas de novas amostras de própolis que refletirão nas propriedades terapêuticas (potencialidade das amostras desconhecidas) para o tratamento do processo inflamatório utilizando outras abordagens quimiométricas com os quadrados mínimos parciais com seleção de variáveis e rede neural artificial, além de estratégias de análise com a complexação dos extratos previamente à análise espectrofotométrica.

- Utilizar um número maior de amostras de própolis e verificar a possibilidade de realizar a calibração por tipo de própolis em função da sazonalidade.

- Realizar ensaios biológicos utilizando células humanas com marcadores inflamatórios para analisar o efeito anti-inflamatório dos diferentes extratos de própolis.

8 REFERÊNCIAS

AZEVEDO, I. B. S.; Sampaio, R. F.; Montes, J. C.; Contrera, R. L. L. Tratamento das escaras de decúbito de própolis. *Rev. Bras. Enf.*; vol. 39, n 2/3, p. 33-7, 1986.

BANKOVA, V.; Popova, M.; Trusheva, B. Plant sources of propolis: An update from a chemist's point of view. *Nat. Prod. Commun.*; vol. 1, n. 11, p. 1023, 2006.

BARBEIRA, P. J. S.; Paganotti, R. S. N.; Ássimos, A. A. Development of a multivariate calibration model for the determination of dry extract content in Brazilian commercial bee propolis extracts through UV–Vis spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 114, p. 441-448, 2013.

BARBOSA M. H.; Zuffi F. B.; Maruxo H. B.; Jorge, L. L. R. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. *Acta Paulista de Enfermagem.*; vol. 22, n 3, p. 318-22, 2009.

BASTOS, I. B. N. *Própolis: revisão bibliográfica*. Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

BENAVENTE-GARCIA, O.; Castillo, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J. Agric. Food Chem. Washington*, vol. 56, p. 6185-6205, 2008.

COTRAN, R. S.; Kumar, V.; Collins, T. (Trad. Barbosa, J. B.; De Vasconcelos, M. M.; Voeux, P. J.); Robbins – *Patologia Estrutural e Funcional*, 6ª ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2000.

COUTINHO, M. A. S; Muzitano, M. F.; Costa, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista Virtual de Química*, vol. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

CRUVINEL, W. D. M.; Mesquita Júnior, D.; Araújo, J. A. P.; Catelan, T. T. T.; Souza, A. W. S. D.; Silva, N. P. D.; & Andrade, L. E. C. *Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória*. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 2010.

FALCÃO, A. L. B.; Falcão, M. A.; Cassel, E.; & Milão, D. Determinação da atividade antimicrobiana e teor de polifenóis totais de extratos etanólicos de própolis das abelhas sem ferrão *Tetragonisca angustula* (Jataí) e *Scaptotrigona bipunctata* (Tubuna). *Revista Liberato*, vol. 14, n. 21, p. 21-28, 2013.

FERREIRA, M. M., Antunes, A. M., Melgo, M. S., & Volpe, P. L. *Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial*. *Química Nova*, vol. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.

HU, F.; et al. 2005. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *J Ethnopharmacol* 100: 276-283.

INOUE, K.; Saito M.; Kanai T.; Kawata T.; Shigematsu N.; Uno T.; Isobe K.; Liu C. H.; Ito H. Anti-tumor effects of water-soluble propolis on a mouse sarcoma cell line in vivo and in vitro. *The Amer. Journ. of Chin. MED.*; vol. 36, n. 3, p. 625-34, 2008.

- KOMAROVA, N. I. et al. Quantitative HPLC determination of main flavonoid content of *Rhododendron adamsii* leaves and stems. *Chemistry of natural compounds*, vol. 45, n. 1, p. 27-31, 2009.
- LEMOS, A. M.; Noble, A. P.; Segat, H. J.; Alexandre, I. D; Pappis, L.; Nunes, L. T.; Neves, L. V. Espectroscopia visível e ultravioleta. Universidade Federal de Santa Maria, Centro de ciências naturais e exatas, 2009.
- LUSTOSA, S. R.; Galindo, A. B.; Nunes, L. C. C.; Randau, K. P.; Neto, P. J. R. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 18, n. 3, p. 447-454, 2008.
- MACHADO, H.; Nagem, T. J.; Peters, V. M.; Fonseca, C. S.; & de Oliveira, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução*, vol. 27, n. 1/2, 2010.
- MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Química Nova*; vol. 19, n. 5, p. 529-35, 1996.
- MARCHAND, L. L. Cancer preventive effects of flavonoids – a review. *Biomed Pharmacother.* vol. 56, p. 296-301, 2002.
- MARQUES, G. S. et al. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata*. *Quím. Nova.* vol.35, n.3, p. 517-522; 2012.
- NETO, J. M. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. *Química nova*, v. 21, n. 4, p. 467-469, 1998.
- NUNES, P. G. A. Uma nova técnica para seleção de variáveis em calibração multivariada aplicada às espectrometrias UV-VIS e NIR. Pedro Germano Antonino Nunes–João Pessoa, 2008.
- OLIVEIRA, T. T. D., Silva, R. R. D., Dornas, W. C. A., & Nagem, T. J. Flavonóides e aterosclerose. 2010.
- PAGLIARONE A. C.; Orsatti C. L.; Búfalo M. C.; Missima F.; Bachiega T.F.; Júnior J. P.; Sforcin J. M. Propolis effects on pro-inflammatory cytokine production and Toll-like receptor 2 and 4 expression in stressed mice. *Int. Immunopharmacol.*; vol.11 p. 1352-6, 2009.
- PAULA, L. C. M. Paralelização de algoritmos APS e Firefly para seleção de variáveis em problemas de calibração multivariada. Dissertação de Pós-Graduação. Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2014.
- PARREIRA, T. F. Utilização de métodos quimiométricos em dados de natureza multivariada. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2003.
- PEREIRA, W. D. A. Calibração multivariada de misturas de óleos vegetais utilizando espectroscopia no infravermelho médio. Dissertação de Pós-Graduação. Universidade Estadual da Paraíba, Paraíba, 2012.
- PUNCHARD, N. A.; Whelan, C. J.; Adcock, J. *The Journal of Inflammation. Journal of inflammation*; vol. 1 n.1, p. 1-4, 2004.

RIBEIRO, M. R. G.; Gualberto, A. M.; Silva, M. A. S.; Souza, S. F. C.; Souza, E. M.; Silva, V. C.; Results of topical application of propolis extracts in reducing progression of periodontal disease. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, vol. 17, n. 4, p. 915-921, 2015.

ROCHA, Fábio R. P.; TEIXEIRA, Leonardo SG. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. *Química nova*, vol. 27, p. 807-812, 2004.

ROQUE, J. V.; Otimização da extração da própolis bruta no estudo da atividade anti-inflamatória. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

SABIN, J. G.; FERRÃO, M. F.; FURTADO, J. C. Análise multivariada aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. Parte II: Análise por componentes principais (PCA) e o método de classificação SIMCA. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 40, n. 3, p. 387-396, 2004.

SANTANGELO, C.; Vari, R.; Scazzocchio, B.; Di Benedetto, R.; Filesi, C.; Masella, R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Annaliistituto superiore di sanita*, vol. 43, n. 4, p. 394, 2007.

SANTOS, G. R. Técnicas de reconhecimento de padrões para a avaliação de corpos hídricos afetados por rejeitos do rompimento da Barragem de Fundão. 155 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.

SANTOS, M. E. D.; Demiate, I. M.; Nagata, N. Simultaneous determination of tartrazine and sunset yellow in food by spectrophotometry UV-VIS and multivariate calibration methodology. *Food Science and Technology*, vol. 30, n. 4, p. 903-909, 2010.

DA SILVA, G. A. Determinação potenciométrica simultânea de espécies aniônicas em água, empregando redes neurais artificiais. 2003. 63f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2003.

SIMÕES, C.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P.R. *Farmacognosia – da Planta ao Medicamento*, 5 Ed., Editora da UFSC: Santa Catarina, 2004.

SOUZA, A. M. D.; 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*, 2012.

TEÓFILO, R. F.; Ferreira, M. M. C. *Chemometrics II: Spreadsheets for experimental design calculations*, a tutorial. *Química Nova*, 2006.

TOMAZZOLI, M. M.; Neto, R. D. P.; Moresco, R.; Westphal, L.; Zeggio, A. R.; Specht, L.; Costa, C.; Rocha, M.; Maraschin, M. Discrimination of Brazilian propolis according to the seasoning using chemometrics and machine learning based on UV-Vis scanning data. *Journal of integrative bioinformatics*, vol. 12, n. 4, p. 15-26, 2015.

WINEFORDNER, J. D. *Chemometrics: From basics to wavelet transform*. John Wiley & Sons Inc: New Jersey; vol. 164, p. 292, 2004.



ESCOLA DE FARMÁCIA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

Escola de Farmácia

CERTIFICADO DE CORREÇÃO

Certifico que a discente Camila Soares Rocha, número de matrícula 13.2.2279, defendeu a Monografia intitulada "Aplicação de análise estatística multivariada no estudo de propriedades da própolis", em 28 de Novembro de 2018 e REALIZOU TODAS AS CORREÇÕES REQUERIDAS PELA COMISSÃO AVALIADORA.

Ouro Preto, 28 / 11 /2018

Prof. Dra. Gilmare Antônia da Silva
(Orientadora)
DEQUI-ICEB-UFOP