



**UFOP**

Universidade Federal  
Ouro Preto

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**  
**DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**  
**ESCOLA DE FARMÁCIA**



**AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO DOS  
TEORES DE FENÓLICOS DE  
PRÓPOLIS UTILIZANDO  
ESPECTROSCOPIA UV-Vis**

Priscila Pires da Silva

**Ouro Preto, dezembro de 2019.**



UFOP

Universidade Federal  
Ouro Preto

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**  
**DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**  
**ESCOLA DE FARMÁCIA**



# **AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO DOS TEORES DE FENÓLICOS DE PRÓPOLIS UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA UV-Vis**

Priscila Pires da Silva

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 Bacharel em Farmácia.

**Orientadora:** Profa. Dra. Gilmare Antônia da Silva

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

**Ouro Preto, dezembro de 2019.**

## SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S586a Silva, Priscila Pires da .

Avaliação da correlação dos teores de fenólicos de própolis utilizando espectroscopia UV-Vis. [manuscrito] / Priscila Pires da Silva. - 2019.  
51 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Gilmare Antônia Da Silva.

Coorientador: Prof. Dr. André Talvani Pedrosa Da Silva.

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

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

CDU 543.392

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



## FOLHA DE APROVAÇÃO

Priscila Pires da Silva

Avaliação da correlação dos teores de fenólicos de própolis utilizando espectroscopia UV-Vis

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico Generalista

Aprovada em 12 de dezembro de 2019

### Membros da banca

Profa. Dra. Gilmare Antônia da Silva - Orientador(a) (Universidade Federal de Ouro Preto)  
Profa. Dra. Maria Elvira Poleti Martucci - (Universidade Federal de Ouro Preto)  
Doutoranda Grazielle Rocha dos Santos - (Universidade Federal de Ouro Preto)

Profa. Dra. Gilmare Antônia da Silva, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 12/12/2019



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Franco Campos, ASSISTENTE EM ADMINISTRACAO**, em 06/08/2021, às 17:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufop.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0203803** e o código CRC **C847FB1A**.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, a minha família e ao meu namorado, pelo apoio e incentivo sempre proporcionados durante esta jornada.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por nunca me desamparar e sempre me dar forças, sabedoria e paciência.

À minha família pelo incentivo, cuidado e amor.

Ao meu namorado por sempre estar ao meu lado me dando esperança, fé e amor.

À minha orientadora Profa. Gilmare Antônia da Silva e ao meu coorientador Prof. André Talvani Pedrosa da Silva pelos ensinamentos, paciência, convivência e, principalmente, por acreditarem e confiarem 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, em especial à Nayara Fernanda Abreu, que sempre foi muito prestativa, atenciosa e disponível no auxílio a este trabalho.

Ao Laboratório de Estudos em Quimiometria, ao Laboratório de Saneamento Ambiental e ao Laboratório de Imunologia da Inflamação pelo espaço concedido.

Aos companheiros de laboratório por todos os momentos e ajudas recebidas.

Às doutorandas Grazielle Rocha dos Santos e Amanda Silva Resende, o mestrando Vinícius Geraldo Almeida e a discente Íris Paula dos Santos Cruz do Laboratório de Estudos em Quimiometria por toda ajuda na realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), à Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB) e aos professores por todo o aprendizado.

A todos os amigos que ganhei nessa jornada desde Barreiras – BA até Ouro Preto – MG, pela convivência, aprendizado, colaboração e amizade; sem vocês a caminhada teria sido mais difícil.

## EPÍGRAFE

“Bem sei eu que tudo podes, e que nenhum dos teus propósitos  
pode ser impedido.” Jó 42:2

## 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 e os fenólicos totais, presentes na própolis, são os principais compostos responsáveis pela atividade anti-inflamatória, por isso, esses compostos foram dosados em diferentes amostras de própolis, cedidas pela Cooperativa Nacional de Apicultura Ltda (CONAP). Todas as amostras 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. Além disso foi feita 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). Ainda, foi realizada a determinação do teor de fenólicos totais nas amostras por meio de espectrofotometria UV-Vis utilizando o método de Folin-Ciocalteu com modificações, em comprimento de onda fixo (760 nm). Os valores de flavonoides variaram entre 27,97 ppm a 210,75 ppm e os teores de fenólicos totais de 58,18 ppm a 179,16 ppm. Os resultados obtidos foram tratados por abordagens multivariadas de análise exploratória de dados (PCA) e calibração multivariada (PLS). Com a PCA constatou-se que há um possível padrão de distribuição das amostras em função do tipo de própolis (green, ultragreen, black e brown) e que não há padrão em função da região de produção. Em relação à PLS, não foi possível gerar modelos preditivos dos teores de flavonoides e fenólicos totais considerando as abordagens químicas, tratamento multivariado e quantidade de dados utilizados sugerindo, principalmente, a necessidade de maior quantidade de amostras de própolis.

**Palavras-chave:** Própolis, espectrofotometria UV-Vis, flavonoides, fenólicos totais, quimiometria.



## ABSTRACT

Propolis is produced by bees and is a natural compound used in the hive as a protective barrier against infections and actions of nature. This material has several important activities, such as antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory action, all directly linked to its chemical composition. Currently it is known that flavonoids and total phenolics present in propolis are the main compounds responsible for anti-inflammatory activity, so these compounds were dosed in different propolis samples, provided by the National Cooperative of Apiculture Ltda (CONAP). All samples were subjected to an 80% ethanolic extraction process and their respective spectra were generated by UV-Vis spectrophotometry, being chosen for the simplicity of the technique and novelty in the literature. In addition, the flavonoid content of the samples was determined by spectrophotometric analysis in a fixed wavelength (425 nm) ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) reader. Furthermore, the determination of the total phenolic content in the samples was performed by UV-Vis spectrophotometry using the Folin-Ciocalteu method with modifications, at fixed wavelength (760 nm). Flavonoid values ranged from 27.97 ppm to 210.75 ppm and total phenolic contents from 58.18 ppm to 179.16 ppm. The results obtained were treated by multivariate exploratory data analysis (PCA) and multivariate calibration (PLS) approaches. With the PCA it was found that there is a possible pattern of distribution of the samples according to the type of propolis (green, ultragreen, black and brown) and that there is no pattern depending on the production of region. Regarding the PLS, it was not possible to generate predictive models of the flavonoid and total phenolic contents considering the chemical approaches, multivariate treatment and amount of data used, suggesting, mainly, the need for a larger amount of propolis.

**Keywords:** Propolis, UV-Vis spectroscopy, flavonoids, total phenolics, chemometrics.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CONAP	Cooperativa Nacional de Apicultura Ltda
$\mu\text{L}$	Microlitros
mL	Mililitros
g	Gramas
$\mu\text{g}$	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.....	22
Figura 2 – Formação do complexo flavonoide-Al, em solução me.....	24
Figura 3 – Representação do procedimento de calibração multivariada.....	28
Figura 4 – Espectros UV-Vis obtidos dos extratos da própolis estudados.....	36
Figura 5 – Curva analítica obtida a partir de uma solução padrão de quercetina para a determinação do teor dos flavonoides.....	38
Figura 6 – Curva analítica obtida a partir de uma solução padrão de quercetina para a determinação do teor dos fenólicos totais.....	41
Figura 7 – Gráfico biplot da PCA dos dados das amostras de própolis em função dos espectros UV-Vis e teores dos flavonoides, considerando o tipo de própolis (G – green, UG – ultragreen BL – black, BR – brown).....	43
Figura 8 – Gráfico biplot da PCA dos dados das amostras de própolis em função dos locais de coleta e teores dos flavonoides.....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Região de produção das própolis investigadas neste trabalho.....	31
Tabela 2 – Codificação dos tipos de própolis em relação à região de produção.....	32
Tabela 3 – Valores das absorvâncias obtidos na determinação da curva analítica; determinações  em duplicata .....	38
Tabela 4 – Absorvâncias obtidas a 425 nm dos extratos etanólicos de própolis para a determinação dos flavonoides. ....	38
Tabela 5 - Concentração (ppm) dos flavonoides nos extratos etanólicos das  própolis investigadas .....	39
Tabela 6 – Valores das absorvâncias obtidos na determinação da curva analítica; determinações  em duplicata. ....	41
Tabela 7 – Absorvâncias obtidas a 760 nm dos extratos etanólicos de própolis para a determinação dos fenólicos totais .....	41
Tabela 8 - Concentração (ppm) dos fenólicos totais nos extratos etanólicos das própolis investigadas. ....	42

## SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	12
2- OBJETIVO GERAL.....	14
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3- REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3.1 PROPÓLIS.....	15
3.2 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	17
3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	19
3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	20
3.5 FLAVONOIDES.....	20
3.6 FENÓLICOS TOTAIS.....	23
3.7 ESPECTROFOTOMETRIA UV-Vis.....	24
3.8 QUIMIOMETRIA.....	25
4- METODOLOGIA.....	30
4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS.....	30
4.2 EXTRAÇÃO DA PRÓPOLIS BRUTA.....	30
4.3 DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS.....	30
4.4 ANÁLISES ESPECTROFOTOMETRICAS DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS.....	32
4.5 DETERMINAÇÃO DOS FLAVONOIDES NOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS.....	32
4.6 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENOLICOS TOTAIS NOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS.....	32
4.7 TRATAMENTO QUIMIOMETRICO DOS DADOS.....	33
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1 ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-Vis DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS.....	34
5.2 DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES.....	35
5.3 DETERMINAÇÃO DE FENOLICOS TOTAIS.....	38
5.4 ANALISE MULTIVARIADA DOS DADOS.....	43
6- CONCLUSÃO.....	44
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

## 1- INTRODUÇÃO

A própolis vem sendo utilizada durante muitos anos; a priori os relatos de uso são do antigo Egito e também da Mesopotâmia. Sua utilização foi citada no papiro de Ebers, em 1700 a.C., e no antigo Egito teve serventia para o embalsamento dos falecidos durante a mumificação (PEREIRA AS et al., 2002).

A própolis é definida como uma mistura complexa composta por substâncias resinosas, balsâmicas e gomas, de consistência, textura e coloração diversas. Ademais, ela é produzida por abelhas de diferentes partes de plantas, por exemplo, botões florais, exsudatos resinosos e brotos, os quais as abelhas acrescentam ainda secreções salivares, cera e pólen, que explicam a diferenciação em sua cor, consistência e textura (FUNARI CS et al., 2006).

Devido a própolis ser uma mistura de várias substâncias, a mesma não é extraída ou fracionada com facilidade. Os constituintes do extrato da própolis oscilam, geralmente, de acordo com o método de extração. É notório que a própolis obtida pela extração aquosa contém aminoácidos, matéria orgânica e carboidratos, os quais não estão presentes na extração etanólica. O extrato aquoso é vastamente utilizado como aditivo em alimentos e cosméticos, porém, a extração com etanol fornece prontamente compostos lipofílicos, que estão em abundância (INOUE et al., 2008).

As abelhas manuseiam a própolis com o intuito de vedar aberturas e reduzir o tamanho da entrada da colmeia, restringindo o ataque de corpos estranhos e protegendo as abelhas do frio. Serve ainda como antisséptico, envernizando o interior da colmeia para fins desinfetantes (MONJAYO LUJAN et al., 2018).

Além disso, a própolis é originada por tipos variados de abelhas, porém a atividade biológica das amostras da própolis advém de abelhas do grupo meliponídeos (*Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipeis*, *Nanotrigona sp.* e *Tetragonisca angustula*), conhecidas como abelhas nativas sem ferrão (MANRIQUE AJ et al., 2008).

Dentre as várias propriedades da própolis, a mais conhecida popularmente é a sua atividade anti-inflamatória atribuída pela presença de flavonoides, principalmente a galantina. Tal flavonoide demonstra atividade inibitória contra a ciclooxigenase e a lipoxigenase, com isso, atua reduzindo a produção de prostaglandinas, citocinas, quimiocinas e de óxido nítrico (NO), que são importantes mediadores na resposta inflamatória (BORRELLI F et al., 2002).

Os compostos fenólicos possuem um destaque especial dentre os componentes da própolis, pois são considerados responsáveis pela maior parte das propriedades deste apiterápico. Isso ocorre, pois, tais compostos exercem múltiplos efeitos como antioxidantes, antitumorais, anti-

inflamatórios, anticancerígenos, antibacterianos, antifúngicos e antivirais (COUTINHO, 2009). Uma técnica amplamente usada para dosagem de flavonoides e fenólicos totais em própolis é a espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV-Vis).

Para mais, a espectrofotometria (UV-Vis) é uma técnica analítica empregada para assegurar o controle de qualidade de matrizes quimicamente complexas como os extratos de própolis, sendo amplamente utilizada para o doseamento de flavonoides e fenólicos totais em materiais vegetais, além de ser empregada 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 resultados obtidos da dosagem de flavonoides e fenólicos totais juntamente com os espectros dos extratos de própolis constituem dados multivariados, sendo necessárias técnicas estatísticas apropriadas para o tratamento desses dados. Assim, neste trabalho, foram empregadas ferramentas da área do conhecimento denominada quimiometria, que é uma disciplina da química analítica que utiliza métodos matemáticos e estatísticos a fim de planejar ou selecionar procedimentos de medidas e experimentos otimizados, disponibilizando abordagens para o processamento dos dados químicos estudados, para que seja obtido o máximo de informação química (WINEFORDNER, 2004).

Os espectros de absorção dos extratos de própolis 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, se as própolis são agrupadas por tipos (green, ultragreen, brown, black) ou por região/cidade.

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).

O desenvolvimento das metodologias analíticas para a análise dos constituintes químicos da própolis e sua atividade anti-inflamatória é justificado pela vasta propriedade terapêutica da própolis e pelo fato de que são raras as suas contraindicações. Além de sua complementação terapêutica por meio do uso de produtos naturais de forma a ampliar o alcance social e reduzir a duração e os custos dos tratamentos;

## **2- OBJETIVO GERAL**

Os estudos espectrofotométricos da própolis podem ser correlacionados a estudos de doseamento de flavonoides e fenólicos totais, fornecendo meios para a avaliação experimental da quantidade da substância, previsão matemática desses valores e a atividade anti-inflamatória 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 e fenólicos totais 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 a relação estudada.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Reestabelecer parceria com a Cooperativa Nacional de Apicultura Ltda (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 varreduras espectrofotométricas na região do UV-Vis das amostras de propólis.
- Realizar a determinação do teor de flavonoides e compostos fenólicos totais nas amostras de própolis por análise espectrofotométrica em leitor de microplacas de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), em comprimento de onda fixo.
- Analisar por meio de análise exploratória multivariada os resultados gerados das diversas amostras de própolis, com o propósito de se avaliar diferenças/semelhanças nas amostras.
- Construir modelos de calibração multivariada com o intuito de prever os teores de flavonoides e fenólicos totais nas amostras de própolis.



### **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).

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 está 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, entre outros. (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 devido à sua potente atividade anti-inflamatória (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. Alguns pesquisadores isolaram determinados compostos da própolis que apresentam conhecida atividade antiinflamatória. MIRZOEVA & CALDER (1996) atribuíram esta propriedade à presença de compostos tais como o ácido cafeico, a quercetina, a narigenina e o Éster Fenílico do Ácido Cafeico (CAPE). 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 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA**

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, acontece a 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- $\alpha$  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, na qual 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 por causa do edema. A perda de função refere-se à simples perda de mobilidade em uma articulação, devido ao edema e à 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).

Em estudo realizado com dez pacientes de um Ambulatório de Cirurgia Vasculuar, portadores de lesões de pele dos tipos úlcera isquêmica, úlcera de estase, úlcera venosa, lesão iatrogênica e úlcera após infecção de ferimento corto-contuso, mostrou, na primeira semana de uso da solução aquosa da própolis com extrato a 30%, debridamento de todo exsudato aderido do leito da ferida, com presença de tecido de granulação. Já, após a primeira semana de uso, observou-se melhora do odor da lesão e da sensibilidade dolorosa do paciente. As autoras desse estudo ressaltaram que a eficácia da cicatrização está intimamente ligada à concentração da própolis na solução. Apesar das limitações desta pesquisa, os autores confirmam a eficácia antiinflamatória e analgésica da própolis, entre outras (BARBOSA, et al., 2009).

### **3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Diversos pesquisadores têm demonstrado a atividade antibacteriana em culturas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritides*, entre eles (BANKOVA et al., 1995; SERRA & ESCOLA.,1995; MAZZUCO et al., 1996; e PARK et al.,1998). Ensaio de antibiose com a própolis, frente a dez bactérias gram-positivas e vinte gram-negativas, constataram que a atividade antibacteriana da própolis é mais efetiva sobre as gram-positivas (ANTUNES et al., 1996). A maioria dos estudos não detecta a inibição no crescimento de *Candida albicans* em cultura, embora poucos estudos tenham constatado a inibição desta levedura pela própolis (SOSA et al., 1997; HEGAZI et al., 2000). A inibição de crescimento de *Helicobacter pylori* foi observada (OHSUGI et al., 1997; HASHIMOTO et al., 1998; BANSKOTA et al., 2001 e BOYANOVA et al., 2005). Desta forma, a inibição de úlceras gástricas através da ingestão de própolis, possivelmente, está relacionada com a atividade anti-helicobacter, já que esta bactéria é reconhecidamente associada a estas úlceras.

Não obstante, devido a toxicidade dos antifúngicos convencionais e ao aparecimento de cepas resistentes aos fármacos antifúngicos, pesquisas com produtos naturais em Odontologia

têm aumentado nos últimos anos. Busca-se por novos produtos com maior atividade farmacológica e biocompatibilidade, com menor toxicidade e custo acessível à maior parte da população (PEREIRA, et al., 2002; CASAROTO e LARA, 2010). Entre esses produtos destaca-se a própolis, que tem sido usada na medicina popular há séculos, e, mais recentemente, na fabricação de alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos. Ela é usada na odontologia como ingrediente ativo na lavagem bucal para controle de placa bacteriana, tratamento de várias lesões orais, medicamento intracanal, meio de armazenamento para dentes avulsionados e cicatrização de feridas (SCHMIDT et al., 2014; YUMNAM et al., 2017). Mais de 300 compostos foram identificados na própolis, como compostos fenólicos, óleos essenciais, ceras e aminoácidos (ANJUM et al., 2018).

### **3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

A ocorrência de diversas doenças está relacionada a aumentos nos níveis de radicais livres em nosso organismo, entre elas: doenças cardiovasculares; doenças reumáticas; doenças neurológicas; doenças psiquiátricas; envelhecimento precoce; neoplasias; osteoporose; diabetes e inflamação (DEVASAGAVAN et al., 2004). Uma tendência que nos últimos anos vêm se encorpando é a possibilidade do emprego de plantas contendo conhecidos polifenóis com propriedades antioxidantes, para o controle e prevenção destas patologias acima citadas (URQUIAGA & LEIGHTON, 2000). Além dos polifenóis, a própolis contém uma extensa gama de outros compostos com a propriedade de remover esses radicais livres em excesso de nosso organismo (MARQUELE et al., 2005).

Diversos grupos de pesquisadores têm relatado essa propriedade da própolis, e muitos deles chegaram a isolar diversos compostos que seriam os responsáveis por essa propriedade antioxidativa. (MATSUSHIGE et al., 1995; BASNET et al., 1997; CLAUS et al., 2000; MIRZOEVA et al., 1995; OYAIZU et al., 1999; HAYASHI et al., 1999; BANSKOTA et al., 2000; MORENO et al., 2000; e SUN et al., 2000). Estes grupos de pesquisadores são unânimes em atribuir aos flavonoides, principalmente o CAPE, esta propriedade farmacológica. Entretanto, RUSSO et al. (2002) constataram que extratos de própolis onde houve a remoção do CAPE, continuaram a apresentar atividade antioxidante. O sequestro de radicais livres gerados por neutrófilos poderia ser um mecanismo antioxidante da própolis, que resultaria em uma atividade anti-inflamatória final, já que os radicais livres podem danificar células sadias do nosso corpo (MORENO et al., 2000). Em níveis considerados normais, os radicais livres não são prejudiciais à saúde. Em excesso, essas moléculas podem ser tóxicas ao nosso

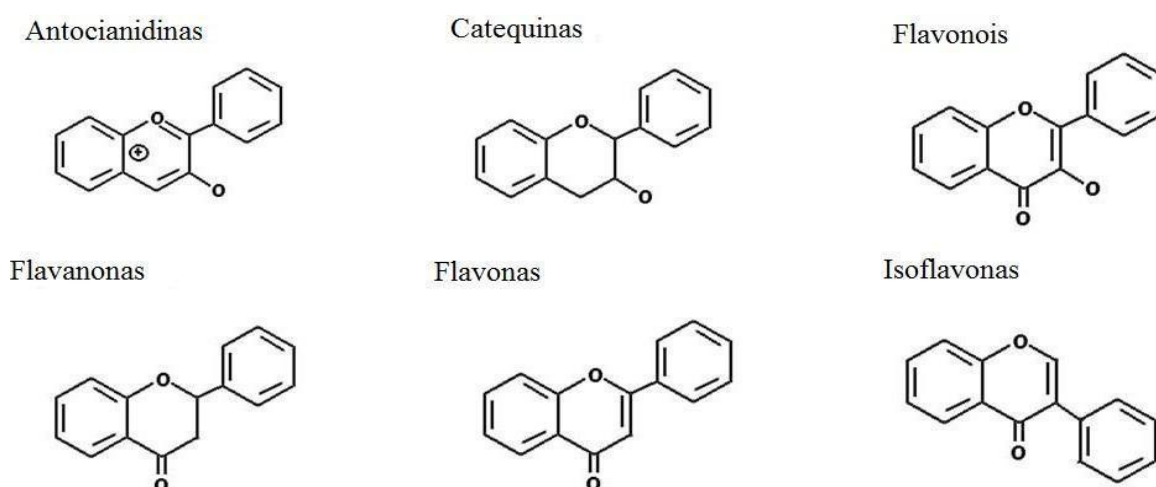
organismo, acarretando por exemplo em um processo inflamatório.

### 3.5 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-inflamatória 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 acetato (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 flavonois, 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 flavonoides 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 demonstraram aumento na permeabilidade capilar, inibição da exsudação 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).

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- $\alpha$  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).

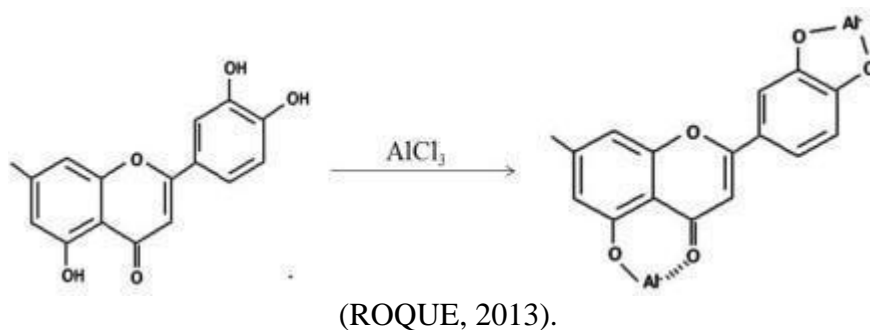
A atividade anti-inflamatória pode ser estudada tanto em testes *in vitro* como *in vivo* (BENAVENTE-GARCIA e CASTILLO, 2008). Os ensaios *in vitro* são realizados em culturas de células com indutores de inflamação. Em seguida, os flavonoides são avaliados em relação à sua capacidade de reduzir ou inibir 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).

Além da avaliação da bioatividade de flavonoides, também é importante quantificar estes compostos. Neste sentido, diversas técnicas são empregadas para o doseamento de flavonoides em materiais vegetais; com destaque para a espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) técnica muito usada devido a sua simplicidade, rapidez, baixo custo e popularidade. (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  $\text{AlCl}_3$



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 absorvância ocorre a partir de 30 minutos da adição do  $\text{AlCl}_3$ . A cinética da complexação permanece estável durante uma hora, tempo necessário para a realização do experimento.

### 3.6 FENÓLICOS TOTAIS

Em geral a própolis é composta de 50% de resina e bálsamo, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de várias outras substâncias (BURDOCK, 1998). Até o momento, já foram identificados e/ou caracterizados mais de 300 constituintes químicos, dentre os quais: ácidos graxos e fenólicos, ésteres, ésteres fenólicos, flavonoides (flavonas, flavononas, flavonóis, dihidroflavonoides, dentre outros.), terpenos, esteroides, aldeídos, ácidos aromáticos, sesquiterpenos e naftaleno (BURDOCK, 1998; MARCUCCI et al., 2001; PARK; ALENCAR; MASAHARU, 1999). Algumas vitaminas (B1, B2, B6, C, E) e minerais como manganês, ferro, cálcio e alumínio também já foram identificados em amostras de própolis (BURDOCK, 1998; MARCUCCI et al., 2001; PARK; ALENCAR; MASAHARU, 1999). Entre os compostos fenólicos presentes na própolis, destacam-se os flavonoides e os ácidos fenólicos.

Os compostos fenólicos de plantas enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzoico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas. Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase in vitro. A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na

neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (HASLAM et al., 1996; SOARES et al., 2002; CHUN, et al., 2005).

A quantificação espectrométrica de compostos fenólicos é realizada por meio da utilização do reagente de Folin-Ciocalteu figura entre as mais utilizadas (VALKO et al., 2004; NACZK et al., 2004; BONOLI et al., 2004; HOU et al., 2003; ROGINSKY et al., 2005). O reagente consiste de uma mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungústico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6+, porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras. (NACZK et al., 2004; IKAWA et al., 2003).

### **3.7 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. Sendo portanto, 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 absortividade molar ( $\epsilon$ ) 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, como amostras semelhantes, amostras destoantes ou apontar um padrão. 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).

### **3.8 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

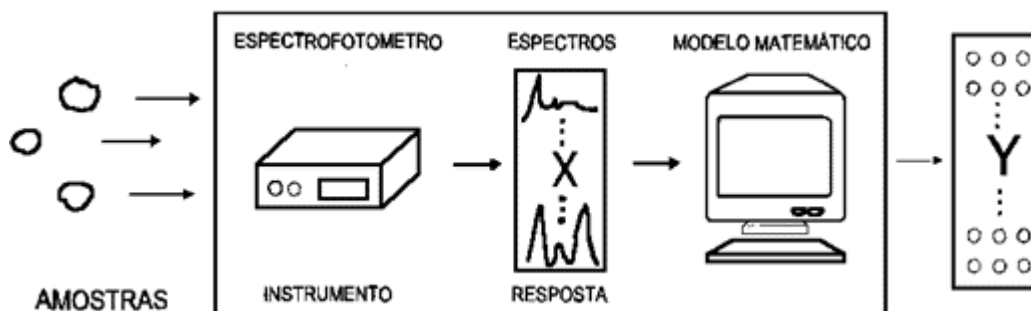
não é uma disciplina nem da matemática, nem da estatística, e sim da química, devido ao fato de que os problemas que ela se propõe a resolver são de interesse e originados na química, ainda que os instrumentos utilizados para o trabalho provenham principalmente da estatística, computação e matemática (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 e 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).

A calibração multivariada pode ser definida 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).

Figura 3 – Representação do procedimento de calibração multivariada.



Fonte: FERREIRA (1999).

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 na qual é estabelecido um modelo matemático, que relaciona 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  $\mathbf{X}$  com "n" linhas e "p" colunas, que contém as variáveis independentes. Também será formada uma matriz  $\mathbf{Y}$  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, por exemplo (SANTOS, DEMIATE e NAGATA, 2010).

Na etapa de validação, o modelo é validado 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 a concentração da propriedade de interesse de uma determinada amostra (PAULA, 2014). Como por exemplo, a absorvância a um comprimento de onda pela amostra pode ser relacionada à concentração da substância analisada, flavonoides e fenólicos totais.

Dessa forma, na calibração multivariada, ao contrário do que ocorre na univariada, utilizam-se múltiplas respostas correlacionadas 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 análises mesmo na presença de interferentes além de apresentar uma diminuição do erro estimado no modelo, uma vez que, é 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; selecionando 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. Além disso, se baseiam na identificação de um subconjunto dos dados inteiros que produzirá 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 Análise das Componentes Principais (PCA) e obtém-se a relação entre as matrizes **X** e **Y**. Nesse método, geralmente são tratados os dados obtidos instrumentalmente, sendo muito empregado nas análises de dados químicos por fornecer uma resposta rápida e por 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 muito popular na determinação de vários parâmetros analíticos, sendo usado desde a determinação da concentração de analitos até a determinação das propriedades físico-químicas (BARBEIRA, PAGANOTTI e ASSIMOS, 2013).

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 PCA, sendo principalmente utilizada pela sua capacidade de interpretar os dados em função da existência de possível correlação entre as diversas variáveis medidas.

Ademais, a PCA é um método exploratório porque auxilia na elaboração de hipóteses gerais a partir dos dados coletados, contrastando com estudos direcionados nos quais hipóteses

prévias são testadas. É também capaz de separar a informação importante da redundante e aleatória. Com o emprego da PCA a visualização de diversas variáveis em um determinado conjunto de dados torna-se mais produtiva, rápida, objetiva e eficiente.

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).

Em uma análise de componentes principais, o agrupamento das amostras define a estrutura dos dados através de gráficos de scores e loadings cujos eixos são componentes principais (PCs) nos quais os dados são projetados. Os scores fornecem a composição das PCs em relação às amostras, enquanto os loadings fornecem essa mesma composição em relação às variáveis. Como as PCs são ortogonais, é possível examinar as relações entre amostras e variáveis através dos gráficos dos scores e dos loadings. O estudo conjunto de scores e loadings ainda permite estimar a influência de cada variável em cada amostra.

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. Ela é um método que tem por finalidade básica a análise dos dados usados visando a redução da dimensionalidade, eliminação de sobreposições e a escolha das formas mais representativas a partir de combinações lineares das variáveis originais.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS

Mediante a parceria pré-estabelecida e retomada com a Cooperativa Nacional de Apicultura (CONAP), ocorreu o fornecimento de 57 amostras de própolis de produtores, locais e tipos diferentes (ultragreen, green, brown e resíduo black). As amostras de própolis ao serem recebidas foram armazenadas em refrigerador no Laboratório de Estudos em Quimiometria da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), a -20 °C, para preservação de suas propriedades até os posteriores ensaios de extração.

As diferentes amostras de própolis foram submetidas às condições otimizadas de extração para obtenção dos extratos alcoólicos, previamente definidas em estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa. Após a extração, estes foram analisados por espectroscopia UV-Vis, para varredura das amostras, e doseamentos dos teores de flavonoides e fenólicos totais, além da realização do tratamento quimiométrico dos dados, como apresentado nos itens a seguir.

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

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

<b>Região de cada produtor</b>	
A: Lamim	K: Ouro Branco
B: Piranga	L: Senhora de Oliveira
C: Entre Rios de Minas	M: Brumadinho
D: Betim	N: Contagem
E: Belo Vale	O: Itabirito
F: Barbacena	P: Piranga
G: Dom Joaquim	Q: Presidente Bernardes
I: Divinópolis	R: Formiga
J: Itaverava	S: Contagem
T: Jeceaba	



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	C	Green	P30	C	Green
P2	C	Green	P31	C	Brown
P3	C	Green	P32	C	Ultragreen
P4	C	Ultragreen	P33	C	Brown
P5	P	Ultragreen	P34	J	Green
P6	P	Green	P35	A	Green
P7	P	Brown	P36	C	Brown
P8	P	Resíduo black	P37	E	Brown
P9	P	Green	P38	C	Green
P10	P	Resíduo black	P39	A	Brown
P11	D	Brown	P40	K	Brown
P12	D	Ultragreen	P41	D	Green
P13	N	Ultragreen	P42	A	Resíduo black
P14	N	Brown	P43	P	Resíduo black
P15	L	Green	P44	M	Resíduo black
P16	L	Green	P45	F	Ultragreen
P17	R	Green	P46	D	Brown
P18	R	Ultragreen	P47	A	Ultragreen
P19	C	Green	P48	T	Ultragreen
P20	E	Green	P49	D	Resíduo black
P21	K	Brown	P50	I	Ultragreen
P22	A	Green	P51	C	Brown
P23	P	Resíduo black	P52	G	Brown
P24	C	Ultragreen	P53	D	Ultragreen
P25	F	Green	P54	A	Brown
P26	Q	Resíduo black	P55	D	Green
P27	O	Ultragreen	P56	P	Brown
P28	A	Brown	P57	L	Ultragreen
P29	C	Brown			

### 4.3 EXTRAÇÃO DA PRÓPOLIS BRUTA

As extrações foram feitas segundo procedimento otimizado anteriormente pelo grupo de pesquisa (ROQUE, 2013), baseado no método de preparo da CONAP, no qual: as amostras recebidas foram fragmentadas com o auxílio de uma espátula de aço inox e foram pesados 2,0000 g das própolis brutas em balança analítica. Após isso, com o auxílio de uma pipeta volumétrica foram adicionados 6 mL de solução hidroalcoólica composta por 80% de álcool etílico e por 20% de água destilada (Dinâmica,  $\geq 99,5\%$  UV/ HPLC), as amostras foram colocadas em frascos âmbar. Esses frascos foram identificados de acordo com do local de produção e o tipo de própolis e, em seguida, foram aquecidos por 2 h à temperatura de 70 °C em banho-maria. Durante quatro dias as amostras foram agitadas

manualmente duas vezes ao dia para a completa extração e posterior e análise química.

#### **4.4 ANÁLISES ESPECTROFOTOMÉTRICAS DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS**

Para a obtenção dos espectros, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 15 min e posteriormente os sobrenadantes foram diluídos 10.000 vezes. Desse modo, 2,5 µL dos sobrenadantes foram pipetados utilizando pipeta automática e transferidos para balões volumétricos de 25 mL e aferidos com solução de álcool etílico (Dinâmica, ≥ 99,5% UV/ HPLC) a 80%. Foi utilizado um par de cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico para 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 900 nm em espectrofotômetro Hach DRTM 6000 situado no Laboratório de Saneamento Ambiental da Universidade Federal de Ouro Preto.

#### **4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FLAVONOIDES NOS EXTRATO DE PROPÓLIS**

Para a obtenção da curva analítica (calibração externa) para a determinação dos flavonoides foi utilizada a quercetina (Sigma-Aldrich, ≥ 98%) como padrão. Assim, foram preparadas soluções etanólicas (Dinâmica, grau UV/HPLC) de quercetina nas concentrações de 20 µg/mL a 200 µg/mL. Em placa de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) foram adicionados 50 µL das soluções de cada ponto da curva em poços com 50 µL de solução metanólica de alumínio 5%. 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 50 µL foram pipetados e adicionados nos poços da microplaca de ELISA sendo acrescentados 50 µL de solução metanólica de cloreto de alumínio a 5%. Após repouso de 30 minutos em ambiente escuro foram medidas as absorbâncias das soluções por análise espectrofotométrica em leitor de microplacas (Epoch; BIOTEK) a 425 nm em placas de 96 poços. Para o branco foram utilizados 50 µL da solução metanólica de cloreto de alumínio 5% e 50 µL de álcool etílico 99,5%.(MARCUCCI, WOISKY e SALATINO, 1998).

#### **4.6 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS NOS EXTRATOS DE PROPÓLIS**

A determinação do teor de fenólicos totais, presentes nos extratos etanólicos das

amostras de própolis, foi feita por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin-Ciocalteu com modificações (ALVES E et al., 2013).

O extrato etanólico (100 mg) foi dissolvido em metanol (Dinâmica,  $\geq 98\%$ ), transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e o volume final foi completado com metanol. Uma alíquota de 7,5 mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e esta solução teve seu volume aferido com metanol. Após isso, uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  desta última foi agitada com 500  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada por 1 min; em seguida, 2 mL de uma solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 15% foram adicionados à mistura e se agitou por 30 s com o auxílio de um equipamento vórtex Móvel MX-F. Finalmente, a solução teve seu volume completado para 10 mL com água destilada em balão volumétrico. Após 2 h de incubação, a absorbância das amostras foi medida no comprimento de onda fixo de 760 nm, tendo como branco o metanol e todos os reagentes, menos o extrato, e foi comparada com a curva padrão de ácido gálico. Assim, o teor de fenólicos totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração externa construída com soluções padrão de ácido gálico nas concentrações de 10 a 350  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (ALVES E et al., 2013).

#### **4.7 TRATAMENTO QUIMIOMÉTRICO DOS DADOS**

Os 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), PLSToobox 8.2 (Eigenvector Research, Inc., USA), SOFT max PRO 4.0.

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, na qual as linhas corresponderam às amostras de própolis e as colunas aos comprimentos de onda dos espectros. Os dados gerados do doseamento de flavonoides e de fenólicos totais 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 os vetores  $\mathbf{y}$  resposta, teor dos flavonoides e de fenólicos totais, foram centrados na média, auto-escalados e também linearizados por meio da aplicação de logaritmo na base 10. 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 três. O conjunto de calibração foi constituído de 50 amostras e o de validação por sete amostras, escolhidas utilizando o algoritmo Kennard-Stone (KENNARD e STONE, 1969).

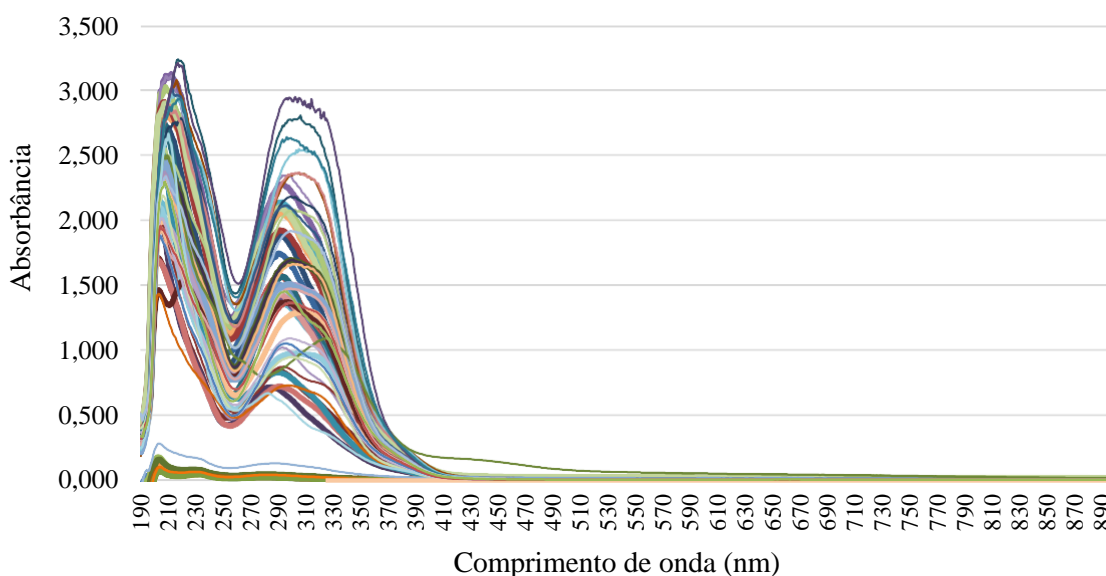
Para a realização da análise das componentes principais a matriz obtida (espectros dos extratos de própolis, teores dos flavonoides e teores dos fenólicos totais) foi centrada na média, utilizando o algoritmo SVD (Single Value Decomposition) do PLSToolbox. Após a inserção da matriz e a seleção do pré-processamento, a resposta do modelamento ocorreu por meio de um *output* indicando a variância explicada por cada componente gerada e na qual foi selecionado o menor número de componentes capazes de explicar o máximo da variância desejada. Após esse procedimento, obteve-se 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 4).

Figura 4 – Espectros UV-Vis obtidos dos extratos da própolis estudados.



Pode-se perceber pelos espectros (Figura 4), que as absorções se dão essencialmente na região do ultravioleta, tendo comportamento em geral similar, mas há diferenças nas intensidades das bandas, deslocamentos dos máximos de absorção e aparecimento de bandas com comportamentos diferentes. Tais perfis de absorção condizem com o esperado, uma vez que alguns componentes estão presentes em todas as amostras de própolis, como os flavonoides. 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).

Como encontrado na literatura, os flavonoides e os fenólicos totais possuem espectros de absorção característicos no ultravioleta, determinados pelo núcleo comum benzopirona e pelo grupo fenol, respectivamente. As amostras apresentaram espectros semelhantes, com absorções máximas entre 200 e 400 nm. O resultado é coerente com a absorção da maioria dos compostos fenólicos que é de 250 a 350 nm (MOURÃO, 2013).

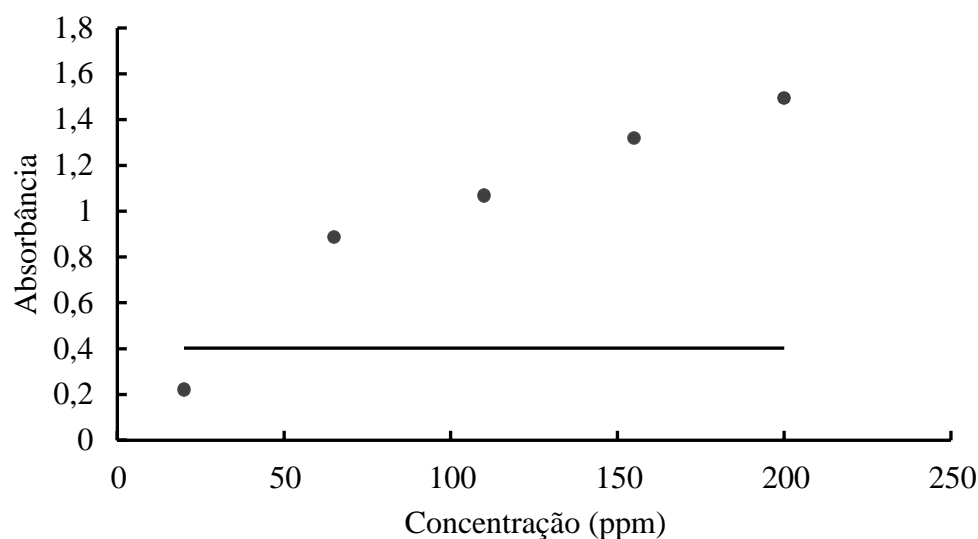
Os resultados encontrados estão de acordo à legislação brasileira para extratos de própolis, a qual define que o extrato de própolis deve apresentar bandas característicss das principais classes de flavonoides entre 200 nm e 400 nm (Ministério da Agricultura, 2001). Esta análise é um dos parâmetros físico- químicos utilizados para avaliar os extratos de própolis, uma vez que suas atividades farmacológicas estão relacionadas a presença de compostos fenólicos, tais como flavonoides e ácidos fenólicos.

## 5.2 DETERMINAÇÃO DOS FLAVONOIDES

O método para quantificação dos flavonoides baseia-se na propriedade do cátion alumínio formar complexos estáveis com os flavonoides. Este complexo promove um deslocamento da absorbância máxima para maiores comprimentos de onda e, assim, as absorções ficam intensificadas na região espectral do visível durante a análise espectrofotométrica. Desse modo, é possível determinar a concentração de flavonoides na amostra evitando a interferência de outras classes de substâncias fenólicas (MARCUCCI, WOISKY e SALATINO, 1998; BURIOL et al., 2009).

A curva analítica (Figura 5) foi obtida a partir de soluções de quercetina em 5 concentrações distintas: 20 µg/mL, 65 µg/mL, 110 µg/mL, 155 µg/mL e 200 µg/mL. Todas as soluções foram preparadas em duplicata e analisadas em espectrofotômetro à 425 nm, em seguida, foi calculada a média das absorbâncias de cada uma das concentrações. Por fim, a curva analítica correspondente foi obtida. A equação da curva e o valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foram, respectivamente,  $y = 0,0066x + 0,2708$  e  $R^2 = 0,9143$ .

Figura 5 – 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 (Figura 5) das amostras de própolis são apresentados nas Tabelas 3 e 4.

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

Pontos da curva (PC)	Absorbância (425 nm)	Pontos da curva (PC)	Absorbância (425 nm)
PC1	0,222	PC1	0,224
PC2	0,889	PC2	0,912
PC3	1,068	PC3	1,075
PC4	1,320	PC4	1,334
PC5	1,496	PC5	1,498

Tabela 4 – Absorbâncias obtidas a 425 nm dos extratos etanólicos de própolis para a determinação dos flavonoides.

Amostras de própolis (P)	Absorbância (425 nm)	Amostras de própolis (P)	Absorbância (425 nm)
P1	0,653	P30	0,795
P2	0,708	P31	1,332
P3	0,707	P32	0,709
P4	0,807	P33	0,735
P5	0,681	P34	1,283
P6	0,648	P35	1,478
P7	0,733	P36	0,879
P8	1,015	P37	2,281
P9	0,673	P38	1,805

P10	0,695	P39	0,821
P11	0,710	P40	1,395
P12	0,825	P41	1,368
P13	0,893	P42	1,405
P14	0,692	P43	1,194
P15	0,667	P44	1,251
P16	0,683	P45	0,254
P17	0,882	P46	1,524
P18	0,674	P47	0,655
P19	0,669	P48	1,914
P20	0,827	P49	0,634
P21	0,708	P50	2,143
P22	0,655	P51	0,807
P23	1,008	P52	0,514
P24	0,674	P53	1,085
P25	1,208	P54	1,231
P26	1,355	P55	1,621
P27	0,728	P56	1,825
P28	1,414	P57	1,363
P29	1,149		

Utilizando-se a equação da curva foram determinados os teores de flavonoides diluídos (em ppm),(Tabela 5).

Tabela 5 – Concentração (ppm) dos flavonoides nos extratos etanólicos das própolis investigadas.

<b>Amostras de própolis (P)</b>	<b>Concentração de flavonoides (ppm)</b>	<b>Amostras de própolis (P)</b>	<b>Concentração de flavonoides (ppm)</b>
P1	71,90	P30	87,54
P2	77,96	P31	146,67
P3	77,85	P32	78,07
P4	88,86	P33	80,93
P5	74,984	P34	141,27
P6	71,35	P35	162,74
P7	80,71	P36	96,79
P8	111,76	P37	151,16
P9	74,10	P38	158,75
P10	76,53	P39	90,40
P11	78,18	P40	156,64
P12	90,84	P41	162,65
P13	98,33	P42	154,70
P14	76,20	P43	131,47
P15	73,44	P44	137,75

P16	75,20	P45	27,97
P17	97,12	P46	157,81
P18	74,21	P47	72,12
P19	73,66	P48	210,75
P20	91,06	P49	69,81
P21	77,96	P50	135,96
P22	72,12	P51	88,86
P23	110,99	P52	56,60
P24	74,21	P53	129,58
P25	110,09	P54	135,54
P26	139,20	P55	158,49
P27	80,16	P56	160,95
P28	156,71	P57	150,08
P29	126,52		

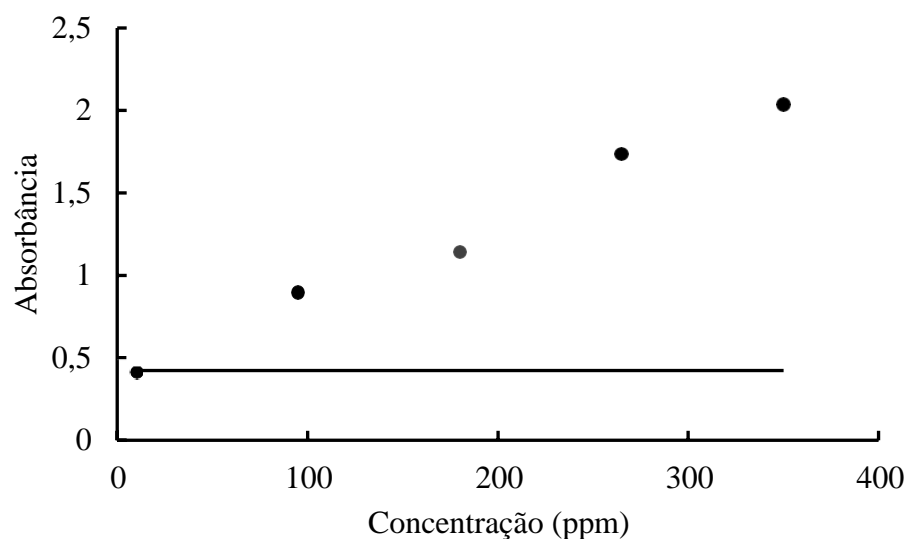
### 5.3 DETERMINAÇÃO DOS FENÓLICOS TOTAIS

O método de Folin-Ciocalteu é o mais utilizado para a determinação de fenólicos totais em própolis. Este método baseia-se na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico pelas hidroxilas fenólicas, produzindo um complexo de coloração azul que absorve entre 620 e 760 nm com um comprimento de onda máximo em 725 nm. A reação ocorre em meio alcalino e a solução saturada de carbonato de sódio é a base mais indicada. Este método, no entanto, não é específico, pois determina todos os fenólicos presentes, como a determinação dos teores fenólicos totais, além de substâncias redutoras adicionadas ou naturalmente presentes na própolis (SWAIN e HILLIS, 1959).

A curva analítica (Figura 6) foi obtida a partir de soluções de ácido gálico em 5 concentrações distintas: 10 µg/mL, 95 µg/mL, 180 µg/mL, 265 µg/mL e 350 µg/mL. Todas as soluções foram preparadas em duplicata e analisadas em espectrofotômetro à 760 nm, em seguida, foi calculada a média das absorbâncias de cada uma das concentrações. Por fim, a curva analítica correspondente foi obtida. A equação da curva e o valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foram, respectivamente,  $y = 0,0048x + 0,3762$  e  $R^2 = 0,9868$ .

Figura 6 – Curva analítica obtida para a determinação do teor dos fenólicos totais.





Os valores das absorbâncias obtidos na construção da curva analítica (Figura 6) das amostras de própolis são apresentados nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 – Valores das absorbâncias obtidos na determinação da curva analítica; determinações em duplicata.

Pontos da curva (PC)	Absorbância (760 nm)	Pontos da curva (PC)	Absorbância (760 nm)
PC1	0,409	PC1	0,415
PC2	0,896	PC2	0,886
PC3	1,140	PC3	1,150
PC4	1,737	PC4	1,743
PC5	2,037	PC5	2,022

Tabela 7 – Absorbâncias obtidas a 760 nm dos extratos etanólicos de própolis para a determinação dos fenólicos totais.

Amostras de própolis (P)	Absorbância (760 nm)	Amostras de própolis (P)	Absorbância (760 nm)
P1	0,772	P30	1,259
P2	0,900	P31	0,898
P3	1,226	P32	1,018
P4	0,788	P33	0,986
P5	0,791	P34	0,972
P6	0,588	P35	0,426
P7	1,016	P36	0,835
P8	0,427	P37	0,431
P9	0,793	P38	0,986

P10	0,446	P39	0,902
P11	0,792	P40	1,001
P12	0,914	P41	0,778
P13	0,938	P42	1,068
P14	0,813	P43	0,814
P15	1,063	P44	0,707
P16	1,221	P45	0,698
P17	0,992	P46	0,953
P18	1,340	P47	0,742
P19	0,950	P48	0,668
P20	0,741	P49	0,610
P21	0,672	P50	0,412
P22	0,616	P51	0,790
P23	0,412	P52	0,608
P24	0,790	P53	0,636
P25	0,881	P54	0,814
P26	0,616	P55	0,686
P27	0,891	P56	1,238
P28	0,638	P57	0,583
P29	0,859		

Utilizando-se a equação da curva foram determinados os teores dos fenólicos totais diluídos (em ppm), (Tabela 8).

Tabela 8 – Concentração (ppm) dos fenólicos totais nos extratos etanólicos das própolis investigadas.

<b>Amostras de própolis (P)</b>	<b>Concentração de fenólicos totais (ppm)</b>	<b>Amostras de própolis (P)</b>	<b>Concentração de fenólicos totais (ppm)</b>
P1	111,72	P30	182,20
P2	130,25	P31	129,96
P3	177,42	P32	147,32
P4	114,04	P33	142,69
P5	114,47	P34	140,66
P6	85,09	P35	61,65
P7	147,03	P36	120,84
P8	61,79	P37	62,37
P9	114,76	P38	142,69
P10	64,54	P39	130,53
P11	114,62	P40	144,86
P12	132,27	P41	112,59
P13	135,74	P42	154,56
P14	117,65	P43	117,80
P15	153,83	P44	102,31

P16	176,70	P45	101,01
P17	143,56	P46	137,92
P18	193,92	P47	107,38
P19	137,48	P48	96,67
P20	107,23	P49	88,28
P21	97,25	P50	59,62
P22	89,15	P51	114,33
P23	58,18	P52	87,99
P24	114,33	P53	92,04
P25	127,50	P54	117,80
P26	89,15	P55	99,28
P27	128,94	P56	179,16
P28	92,33	P57	84,37
P29	124,31		

#### 5.4 ANÁLISE MULTIVARIADA DOS DADOS

Analisando-se as Tabelas 5 e 8 pode-se sugerir que os teores de flavonoides e fenólicos totais não estão relacionados 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 e em distintas regiões de produção.

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 composições 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).

A Figura 7 mostra o gráfico biplot da PCA, na qual observa-se 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, 93,49%, e a PC2 explica cerca de 4,87% da informação totalizando, então, somente com essas duas componentes, 98,36% da variância original dos dados. Pode ser constatado que as amostras não mostram perfis de distribuição em função do tipo de própolis, isto é, green, ultragreen, brown e black.

Figura 7 – Gráfico biplot da PCA dos dados das amostras de própolis em função dos espectros UV-Vis e teores dos flavonoides, considerando o tipo de própolis (G – green, UG – ultragreen, BL – black, BR – brown).

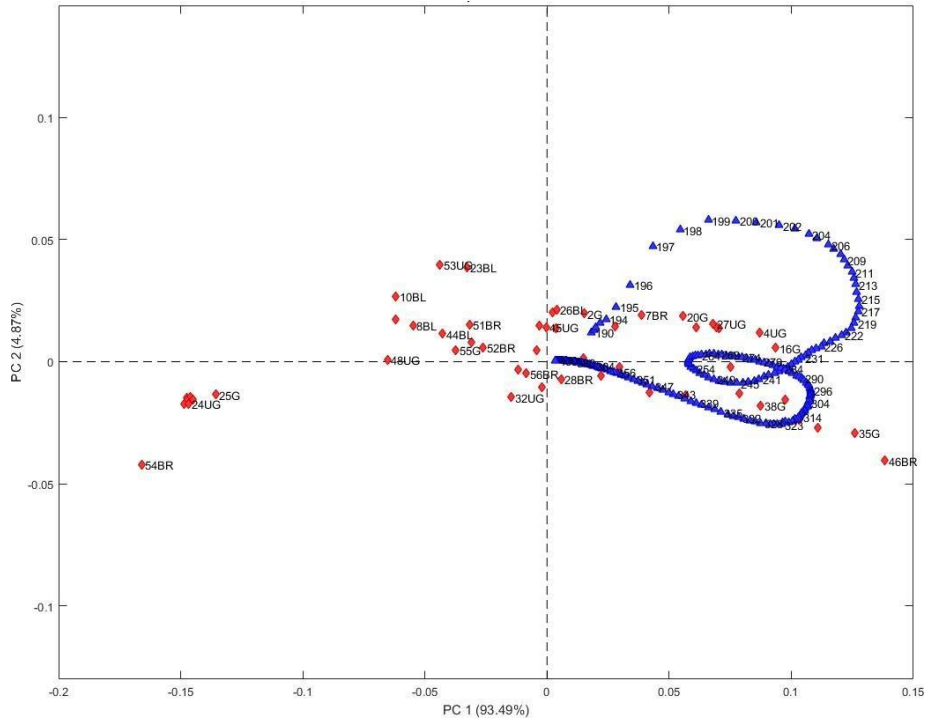
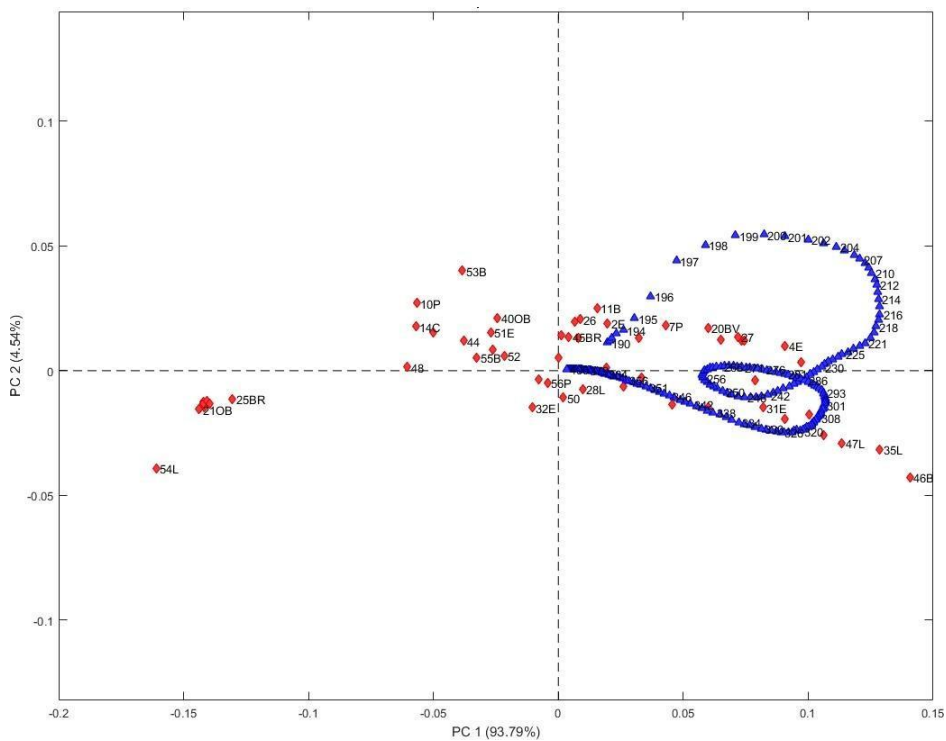


Figura 8 – Gráfico biplot da PCA dos dados das amostras de própolis em função dos locais de coleta e teores dos flavonoides.



A Figura 8 mostra o gráfico biplot da PCA, aonde se tem a distribuição das amostras de própolis em função dos perfis espectrais e teores de flavonoides, representando o local de coleta. Pode ser constatado que as amostras não mostram perfis de distribuição em função do local de coleta de própolis, isto é, a região de produção não infere nas características específicas das amostras a fim de se ter um padrão de comportamento.

A calibração multivariada por meio dos quadrados mínimos parciais foi realizada porém não foi possível correlacionar os espectros com os respectivos teores de flavonoides e de fenólicos totais 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 utilização de espectrometria de massas nas análises. Entretanto, o que é mais provável no caso deste trabalho, é que seja necessária uma quantidade maior de amostras de cada tipo de própolis podendo-se tentar uma correlação entre o mesmo tipo.

## **6- CONCLUSÃO**

Avaliando-se a possível relação entre os perfis espectrais e os teores de flavonoides e fenólicos totais dos extratos de própolis de diferentes tipos e regiões de Minas Gerais, não foi possível, correlacionar tais parâmetros, considerando as abordagens químicas, tratamento multivariado de dados e quantidade de dados utilizados.

Os fatores que contribuíram para esse resultado podem ter sido oriundos do fato de que as amostras não possuíram diferença de sazonalidade, ou seja, todas foram colhidas na mesma época do ano 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 apontou diferenciação das amostras em função dos tipos de própolis, mostrando no gráfico biplot que no quadrante direito superior há predomínio do tipo ultragreen e green, e no quadrante direito inferior há predomínio do tipo brown e black. Essa resposta pode sugerir que os parâmetros investigados (perfil espectral na região do UV-Vis e teores de flavonoides e fenólicos totais) apontam uma possível diferença das própolis na macro-região do estado de Minas Gerais investigada. É importante ressaltar que o resultado não é conclusivo e que precisam ser realizadas novas análises para concretizar um modelo de calibração.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, E. e Kubota, E. H. (2013) “Conteúdo de Fenólicos, Flavonoides Totais e Atividade Antioxidante de Amostras de Própolis Comerciais”. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, [S.l.], v. 34, n. 1, p. 37-41.
- ANJUM, S.I. et al. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2018. Antimicrobial activity of propolis. *Revista Brasileira de Farmácia*, v.77, p.15-18, 1996.
- AZEVEDO, I.B.S. et al. Tratamento das escaras de decúbito com própolis. *Rev. Bras. Enferm.*, v.39, n.2-3, p.33-7, 1986.
- BANKOVA, V. et al. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Z Naturforsch C*, Tubingen, v.50, n.3-4, p.167–172, 1995
- BANKOVA, POPOVA, TRUSHEVA, (2006). Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 3, p. 249-254.
- BANSKOTA, A.H.; T EZUKA, Y.; M IDORIKAWA , K.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. Two novel cytotoxic benzofuran derivatives from Brazilian propolis. *Journal of Natural Products*, v.63, p.1277-1279, 2000.
- BANSKOTA, A.H.; T EZUKA, Y.; ADNYANA, I.K. Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine*, v.8, p.16-23, 2001
- 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, Maria Helena et al. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. *Acta Paulista de Enfermagem*, v. 22, n. 3, p. 318-322, 2009.
- BASNET, P.; MATSUNO, M.; NEIDLEIN, R. Potent free radical scavenging activity of propolis isolated from Brazilian propolis. *Zeitschrift fur Naturforschung*, v.52c, p.828- 833, 1997.
- BASTOS, IBN. PRÓPOLIS: revisão bibliográfica. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 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.
- BONOLI, M. et al. Antioxidant Phenols in Barley (*Hordeum vulgare* L.) Flour: Comparative Spectrophotometric Study among Extraction Methods of Free and Bound Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, n.16, p. 5195- 2000, 2004.
- BONTEMPO, Marcio. *Mel: uma vida doce e saudável*. São Paulo: Alaúde Editorial. 2008.
- BORGES NETO, W. Parametros de qualidade de lubrificantes e oleo de oliva atraves de espectroscopia vibracional , calibração multivariada e seleção de variáveis, 2005. (Doutorado)

.Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.

BORRELLI F, MAFFI AP, PINTO L, IANARO A, RUSSO A, CAPASSO F, et al. Phytochemical compounds involved in the an ammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia*. 2002; 73(7): S53-S63.

BOYANOVA, L.; GERGOVA, G.; NIKOLOV, R.; DEREJIAN, S.; LAZAROVA, E.; KATSAROV, N.; MITOV, I.; KRASSTEV, Z. Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. *Journal of Medical Microbiology*, v.54, n.5, p.481-483, 2005.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties antitoxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, v. 36, p. 347-363, 1998.

BURIOL, Lilian et al. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. *Quím. Nova* [online]. Vol.32, n.2, pp.296-302, 2009.

CASAROTO, A.R.; LARA, V.S. Phytomedicines for Candida-associated denture stomatitis. *Fitoterapia*. v. 81. p. 81. 2010.

CHUN CHOU, et al. Antibacterial activity od propolis against *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbioly*, Vol.102, p.213-220, 2005.

CLAUS, R.; KINSCHERF, R.; GEHRKE, C. Antiapoptotic effects of propolis extract and propol on human macrophages exposed to minimally modified low density lipoprotein. *Arzneimittelforschung*, v.50, p.373-379, 2000.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources – review. *The Journal of Nutrition Biochemistry*. v. 7, n. 1, p. 66-76, 1996.

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.

DEVASAGAVAN, T.P.; TILAK, J.C.; BOLOOR, K.K.; SANE, K.S.; GHASKADBI, S.S.; LELE, R.D. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Journal of the Association of Physicians of India*, v.52, p.794-804, 2004

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.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. Análise de Própolis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 26, p. 171-178, 2006.

HASHIMOTO, T.; AGA, H.; T ABUCHI, A. Anti-Helicobacter pylori compounds in Brazilian propolis. *Nature Medicine*, v.52, p.518-520, 1998.

HASLAM E. Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action, *Journal of Natural Products*, 1996; 59(2): 205–215.

HAYASHI, K.; K OMURA, S.; ISAJI, N.; OHISHI, N.; YSGI, K. Isolation of antioxidative compounds from Brazilian propolis: 3,4dihydroxy-5-prenylcinnamic acid, a novel potent antioxidant. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v.47, p.1521-1524, 1999.

HEGAZI, A.G.; ABD, E.I.; HADY, F.K.; ALLAH, F.A. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Zeitschrift für Naturforschung*, v.55c, p.70-75, 2000.

HOU, W. C. et al. Free radical-scavenging activity of Taiwanese native plants. *Phytomedicine: international Journal of Phytoterapy and Phytopharmacology*, v.10, n. 2-3, p. 170- 175, 2003.

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.

IKAWA, M. et al. Utilization of Folin- Ciocalteu Phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n.7, p. 1811- 1815, 2003.

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.

KENNARD, R. W.; Stone, L. A.; *Technometrics*. **1969**, 11.

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, Sarah R.; GALINDO; Alexandre B.; NUNES, Lívio C.C.; RANDAU, KARINA, P.; NETO, Pedro J. Rolim. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Revista Brasileira de Framacologia*, v. 18, n. 3, 2008, p. 447-454.

MACHADO, B. A. S. Estudo prospectivo da própolis e tecnologias correlatas sob o enfoque em documentos patentes depositadas no Brasil. *Revista GEINTEC – Gestão, Inovação e Tecnologias*.

ISSN 2237-0722. São Cristóvão – SE, n. 3, vol. 2, p. 221 – 235, 2012. Disponível em: <http://www.google.com.br/#sclient=psy-=1280&bih=574> . Acesso em 01 de abril de 2019.

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.

MANRIQUE AJ, SANTANA WC. Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona* sp. (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) de Brasil y Venezuela. *Zootec Trop.* 2008;26(2):157.

MARCHAND, L. L. Cancer preventive effects of flavonóides – a review. *Biomed Pharmacother.* v. 56, p. 296-301, 2002.

MARCUCCI 1996. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Quim Nova* 19: 529-536.

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCÍA VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; DANTAS, A. P.; VALENTE, P. H. M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v. 74, p. 105-112, 2001.

MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Uso do cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis, 1998.

MARQUELE, F.D.; DI MAMBRO, V.M.; GEORGETTI, S.R.; CASAGRANDE, R.; VALIM, Y.M.; Fonseca, M.J. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.39, n.3/4, p.455-462, 2005.

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.

MATSUSHIGE, K.; KUSUMOTO, I.T.; YAMAMOTO, Y.; KADOTA, S.; NAMBA, T. Quality evaluation of propolis. 1 A comparative study on radical scavenging effects of propolis and *vespae nidus*. *Journal of Traditional Medicines*, v.12, p.45-53, 1995.

MAZZUCO, H.; DE ME SILVA, R.D.; BERCHIERI, A.; DE MATSUSHIGE, K.; KUSUMOTO, I.T.; YAMAMOTO, Y.; KADOTA, S.; NAMBA, T. Quality evaluation of propolis. 1. A comparative study on radical scavenging effects of propolis and *vespae nidus*. *Journal of Traditional Medicines*, v.12, p.0liveira, E. Use of propolis and ethyl alcohol in the control of *Salmonella* in poultry rations. *Scientia Agricola*, v.53, p.1-5, 1996

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO, Brasil, (2001). Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta (Instrução Normativa Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001). *Diário Oficial da União*.

MIRZOEVA, O.K. & CALDER, P.C. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during inflammatory response. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty*

Acids, v.55, p.441-449, 1995.

MONJAYO LUJAN, María del Rosario e outros. Atividade antibacteriana e conteúdo fenólico de extratos de própolis obtidos por diferentes métodos de extração. *Nova scientia*, León, v. 10, n. 20, p. 397-412, 2018.

MORENO, M.I.N.; ISLA, M.I.; SAMPIETRO, A.R.; VATTUONE, M.A. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, v.71, p.109-114, 2000.

MOURÃO, L. R. M. B. Estudo in vivo da atividade antioxidante da própolis vermelha brasileira. Tese de Doutorado (Núcleo de Energia Nuclear na Agricultura e no Meio Ambiente), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

NAK CZ, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatog. A*, v 1054, n. 1-2, p.95- 111, 2004.

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.

OHSUGI M.; BASNET P.; KADOTA S. Antibacterial activity of traditional medicines and an active constituent lupulone from *Humulus lupulus* against *Helicobacter pylori*. *Journal of Traditional Medicines*, v.14, p.186-191, 1997.

OLIVEIRA, T. T. D., Silva, R. R. D., Dornas, W. C. A., & Nagem, T. J. Flavonóides e aterosclerose. 2010.

OYAIZU, M.; Ogihara, H.; Fujimoto, Y. Antioxidative activity of extracts from propolis. *Journal of Japan Oil Chemists' Society*, v.48, p.135-138, 1999.

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.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; MASAHARU, F. F. A origem do conhecimento do homem sobre as virtudes alimentícias, curativas e profiláticas dos produtos das abelhas é bastante curiosa e interessante. *Revista OESP – Alimentação*, São Paulo, v. 27, p. 110-115, 1999

PARK, Y.K.; KOO, M.H.; ABREU, J.A.S.; IKEGAKI, M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L. Antimicrobial activity of propolis on oral micro organisms. *Current Microbiology*, v.36, p.24-28, 1998

PARREIRA, T. F. Utilização de métodos quimiométricos em dados de natureza multivariada. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2003.

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.

PEREIRA, AS, SEIXAS FRMS, AQUINO NETO FR. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quim Nova* 25: 321-326, 2002.

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.

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

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, v. 92, n. 2, p. 235- 254, 2005.

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.

RUSSO, A.; LONGO, R, VANELLA A. The role of the phenethyl ester of caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis. *Fitoterapia*, v.73, p.S30-S37, 2002.

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, 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.

SCHMIDT, E.M. et al. A Comparison between Characterization and Biological Properties of Brazilian Fresh and Aged Propolis. *BioMed Research International*. p. 01-10. 2014.

SERRA, J. & ESCOLA, R. A study on the bacteriostatic activity of propolis. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, v.91, p.242-246, 1995.

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 LMC, Gregorio LE, Da Silva Filho AA, De Souza ML, Azzolini AECS, Bastos JK,

Lucisano-Valin YM. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. *J Ethnopharmacol* 94:59-65, 2004.

SOARES, Sergio Eduardo. Ácidos Fenólicos como antioxidantes. *Rev. Nutr.*, v. 15, n 1, 2002, p. 71-81.

SOSA, S.; B ARICEVIC, D.; CINCO, M.; P ADOVAN, D.; T UBARO, A.; DELLA, L.R. Preliminary investigation on the antiinflammatory and anti-microbial activities of propolis. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, v.7, p.168- 171, 1997.

SOUZA, André Marcelo, POPPI, Ronei Jesus. 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. *Quím. Nova* [online]. 2012, vol.35, n.1, pp.223-229.

SUN, F.; H AYAMI, S.; HARUNA, S. In vivo antioxidative activity of propolis evaluated by the interaction with vitamins C and E and the level of lipid hydroperoxides in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, p.1462- 1465, 2000.

SWAIN T, HILLIS WE. The phenolics constituents of *prunus domestica*: the quantitative analysis of phenolic constituents. *J Sci Food Agric* 1959; 10 (1): 63-8.

TEOFILO, Reinaldo F., FERREIRA, Márcia M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Quím. Nova* [online]. 2006, vol.29, n.2, pp.338-350. ISSN 0100-4042.

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.

URQUIAGA, I. & LEIGHTON, F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*, v.33, n.2, p.55- 64, 2000.

VALKO M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. (2004). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The Intern J Biochem. and Cell Biol.* 39, 44-84.

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

YANG, C. S., et al. Inhibition of carcinogenesis by Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.* v. 21, p. 381-406, 2001.

YOON, J.H., BAEK, S.J., and Yonsei, 2005, *Med. J.*, 465, 585-96.

YUMNAM, R. et al. Effect of Propolis in Oral Health. *Journal of Ayurveda and Integrated Medical Sciences.* v. 02, n. 01, p. 186-192. 2017.