



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

Trabalho de Conclusão de Curso
Bacharelado em Química

**Classificação da própolis utilizando
espectrofluorimetria em conjunto com
análise multivariada**

Jeob de Castro Rezende

Belo Horizonte
Dezembro de 2010

JEOB DE CASTRO REZENDE

**Classificação da própolis utilizando espectrofluorimetria em conjunto
com análise multivariada**

**Monografia apresentada junto ao
Departamento de Química da
UFMG na área de Química Analítica
como requisito parcial para
obtenção de título de Bacharel**

Orientador: Prof. Dr. Paulo Jorge Sanches Barbeira

BELO HORIZONTE

2010

AGRADECIMENTOS

Agradeço à natureza por se apresentar da forma como é...

Aos meus pais José Júnior e Liz pela presença em minha vida e por me incentivarem a romper esta jornada rumo a um futuro melhor.

Aos meus irmãos Júnia e Marco Aurélio que mesmo distantes e em silêncio, acalmaram meu coração.

À minha namorada Ellen, que nos momentos de angústia e emoção, me tratou com carinho e serenidade além de ter por traduzir meus textos.

À Universidade Federal de Minas Gerais.

Ao meu professor e orientador Paulo Jorge Sanches Barbeira, pela dedicação prestada no desenvolvimento desta monografia, pela paciência e por me ensinar tantas coisas.

Às professoras Camila Nunes Costa Corgozinho e Letícia Malta Costa, pela leitura desta monografia.

Aos amigos e sobreviventes da turma de 2006 de Química pelos momentos de alegria, descontração e horas de bate papo

À Bia, Camila, Cony, Diego, Lívia, Maíra e Priscila por considerarem tantas brincadeiras.

À Helga, Gisele, Rosilene e Cristina por me ensinarem quimiometria.

À todos que contribuíram positivamente durante esta jornada.

**“A abelha por Deus foi amestrada
Sem haver um processo bioquímico
Até hoje não houve nenhum Químico
Pra fazer a ciência dizer nada
O buraco pequeno da entrada
Facilita a passagem com franqueza**

**Uma é sentinela de defesa
E as outras se espalham no vergel
Sem turbinas sem tacho fazem mel
Como é grande e bonita a natureza”**

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1. Própolis.....	1
1.2. Espectrometria de emissão molecular ou espectrofluorimetria.....	8
1.2.1. Espectrofluorimetria convencional.....	8
1.2.2. Espectrofluorimetria de varredura sincronizada.....	8
1.2.3. Própolis e espectrofluorimetria.....	9
1.3. Quimiometria.....	11
1.3.1. Organização dos dados.....	12
1.3.2. Pré-processamento.....	12
1.3.3. Análise exploratória.....	13
1.3.3.1. Análise da componente principal.....	13
1.3.3.2. Métodos de classificação.....	14
2. Objetivo.....	14
3. Parte Experimental.....	15
3.1. Amostras.....	15
3.2. Reagentes.....	15
3.3. Análise espectrofotométrica.....	17
3.4. Análise espectrofluorimétrica.....	18
3.5. Softwares.....	18
3.6. Pré-processamento utilizado.....	18
4. Resultados e discussão.....	19
4.1. Espectrofotometria de absorção molecular.....	19
4.2. Espectrofluorimetria de emissão molecular.....	26
4.2.1. Escolha do método.....	26
4.2.2. Condições Experimentais para espectrofluorimetria convencional.....	26
4.2.3. Análise dos espectros de fluorescência.....	27
4.2.4. Análise quimiométrica dos dados de emissão molecular.....	28
5. Conclusão.....	35
6. Perspectivas.....	36
7. Referencias bibliográficas.....	36

1. INTRODUÇÃO

1.1. PRÓPOLIS

A própolis é uma substância de complexa constituição produzida pelas abelhas, utilizada na proteção da colméia. O termo própolis é derivado do grego “*pro*” (em defesa de) e “*polis*” (cidade). As abelhas a empregam para assepsia do local de postura da abelha rainha, por possuir propriedades antifúngicas e bactericidas; no reparo de frestas e danos à colméia, evitando então a entrada de insetos e microorganismos, além de possibilitar o controle interno da temperatura, umidade e ventilação. A própolis também pode ser utilizada na mumificação de insetos, os quais as abelhas não conseguem retirar de dentro da colméia. [1,2]

A própolis é o produto da mistura de secreções salivares e cera produzidos pelas abelhas, com substâncias resinosas, adesivas e balsâmicas colhidas de partes de plantas como brotos, flores, pólen e exsudados. [3] Sua coloração é dependente de sua constituição e idade. Pode variar de marrom escura passando por verde até marrom avermelhado. Possui odor agradável que varia de amostra para amostra. Seu ponto de fusão está entre 60-70 °C, podendo atingir, em alguns casos, 100 °C. É uma substância dura e quebradiça a 15 °C, tornando-se maleável e pegajosa a partir dos 30 °C. Sua dissolução pode ser realizada com solventes orgânicos como acetona, éter, etanol, tolueno e tricloroetileno, obtendo-se assim, uma parte insolúvel e outra solúvel. A parte insolúvel é constituída por matéria orgânica, tecidos vegetais e pólen. Já a parte solúvel pode ser dividida em duas frações, com uma contendo materiais cerosos (em média 30%) e a outra contendo materiais balsâmicos, óleos essenciais e derivados fenólicos (em média 60%). [2,4]

Relatos históricos de 300 a.C. já mencionavam a utilização da própolis na medicina popular. [5] Há algum tempo, a literatura científica tem citado algumas propriedades farmacológicas da própolis, como antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, anestésica, antitripanossomal, anticariogênica, antiviral, anticarcinogênica, antioxidante, imunomodulatória, hipotensiva e anti-HIV. [2,6] Hoje a própolis continua sendo largamente utilizada na área médica popular em cosméticos e dermocosméticos. [7]

Como dito anteriormente, a própolis possui complexa constituição, sendo que a proporção de substâncias encontradas é variável e dependente da flora da região, da época de colheita, assim como da espécie da abelha que a produz. Essa variável composição da própolis é o principal fator de sua difícil utilização como fitoterápico, pois suas propriedades biológicas estão intimamente ligadas a sua constituição química. Atualmente, mais de 300 compostos já foram identificados na própolis. [7] Dentre eles encontram-se ácidos fenólicos; flavonóides; ésteres; diterpenos; sesquiterpenos; lignanas; aldeídos aromáticos; álcoois; aminoácidos; ácidos graxos; vitaminas do tipo A, B1, B2, B6, C, E e PP; além de

elementos como prata, céσιο, mercúrio, lantânio, antimônio, cobre, manganês, ferro, cálcio, alumínio, vanádio e silício. [2,4,8] Dentre essas substâncias destacam-se os flavonóides e ácidos fenólicos, isso por ser atribuída a essas duas classes de compostos grande parte das atividades biológicas da própolis. [8]

Os flavonóides podem ser definidos como uma classe de metabólitos secundários produzidos pelas plantas que desempenham um papel fundamental de proteção contra agentes oxidantes. Como pode ser observado na Figura 1, são compostos que contêm em sua estrutura dois anéis fenil (A e B) ligados através de um anel pirano (C). [9]

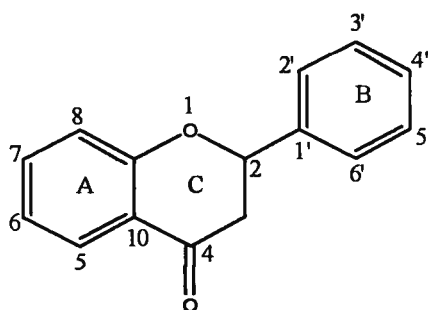


Figura 1. Estrutura química geral dos flavonóides e sua numeração convencional.

Espectros de flavonóides (Figura 2), obtidos de irradiação da região do ultravioleta visível (UV-Vis), são usualmente determinados em metanol. Tais espectros possuem duas bandas de absorção que possuem seus máximos localizados entre as faixas de 300-550 nm (banda I) e entre 240-285 nm (banda II), sendo que estas duas bandas são formadas pela presença de duplas ligações presentes nos anéis A e B dos flavonóides (Figura 1). A posição exata dos máximos destas bandas e suas intensidades relativas fornecem informações a respeito da natureza do flavonóide e de seu padrão de substituição. [10]

Os ácidos fenólicos pertencem ao grupo dos compostos fenólicos e caracterizam-se por ter um anel benzênico, um grupamento carboxílico e uma ou mais hidroxila ou metoxila na molécula. A presença dos grupos citados na estrutura dos ácidos fenólicos (Figura 3) confere propriedades antioxidantes a essa classe de compostos. [11]

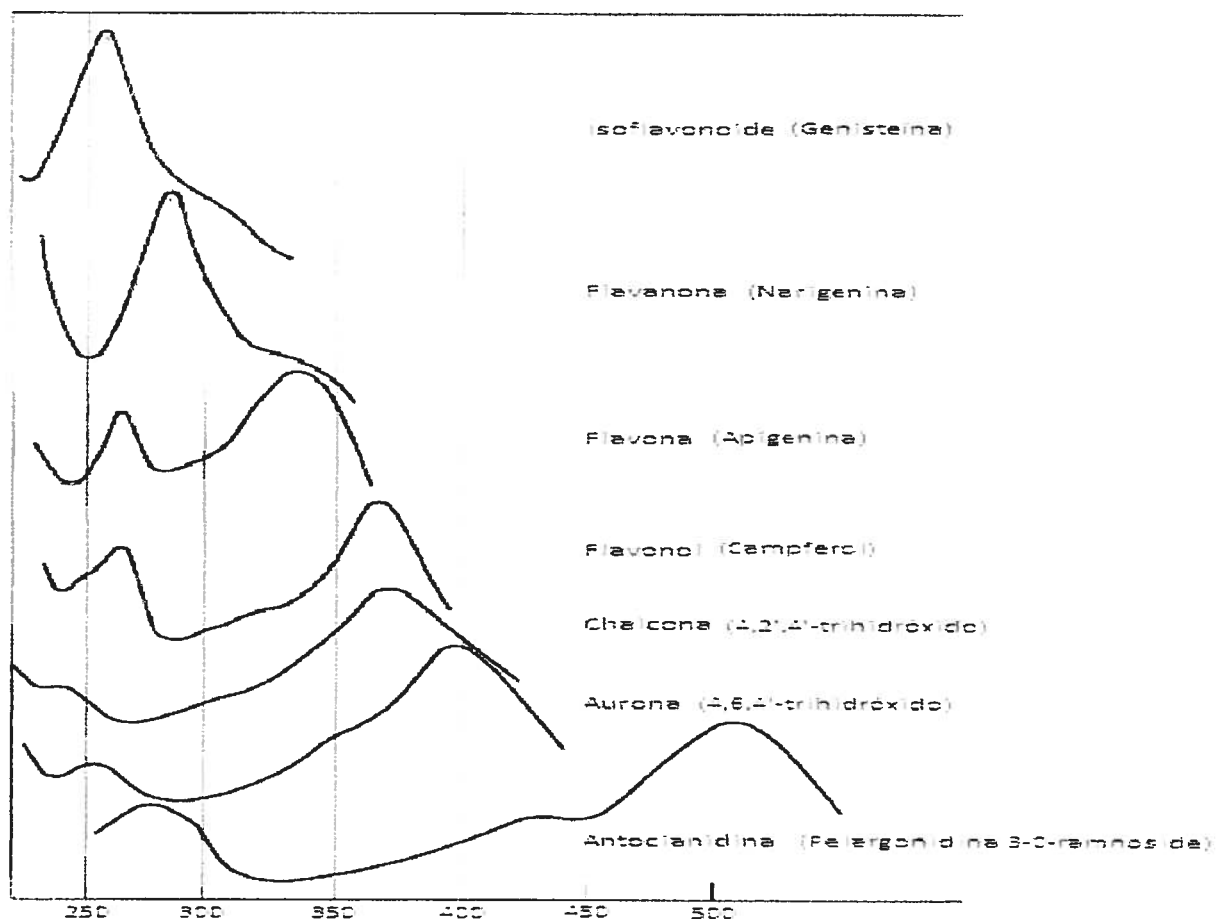


Figura 2. Espectros de absorção UV-vis para diferentes substâncias de diferentes classes de flavonóides presentes na própolis [10]

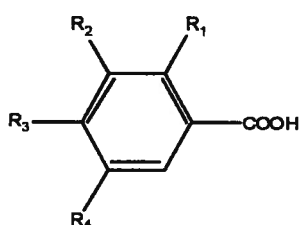


Figura 3. Estrutura química geral dos ácidos fenólicos mais simples.

As própolis produzidas pelas abelhas de regiões de clima temperado como Europa, Ásia, e América do Norte, têm como principal fonte vegetal espécies do gênero *Populus* ssp. Devido à baixa diversidade da flora local disponível para as abelhas, a constituição química dessas própolis é similar. Seus principais constituintes são agliconas de flavonóides, os ácidos aromáticos e seus ésteres, como por exemplo, a crisina, a pinobancisina, a galangina, o ácido caféico e seus ésteres (Figura 4). [12]

Já a própolis brasileira, por ser produzida em zona tropical, pode possuir alta diversidade em sua constituição química, uma vez que essa zona apresenta maior biodiversidade. Exemplos de componentes encontrados na própolis brasileira são prênílados do ácido *p*-cumárico (Figura 4), ácido caféico e seus derivados, acetofenonas prêníladas e ácidos diterpênicos. Vegetais do gênero *Baccharis* ssp. e *Araucária* ssp., são fontes botânicas comumente utilizadas pelas abelhas na elaboração da própolis em países da América do Sul. [12]

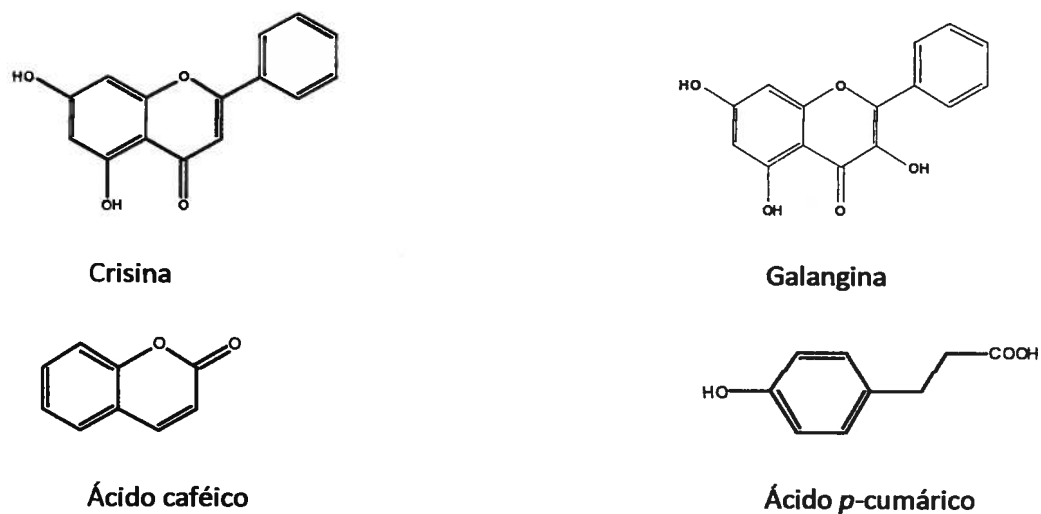


Figura 4. Estruturas de alguns compostos encontrados na própolis.

Embora as abelhas brasileiras consigam produzir uma grande diversidade de própolis, destaca-se uma variedade denominada de “própolis verde”, que possui como principal fonte vegetal a espécie *Braccharis dracunculifolia*, também conhecida como alecrim do campo (Figura 5). [13] Esta planta é nativa em alguns países da América do Sul, sendo encontrada em grandes quantidades na região sudeste do Brasil. [14]

Um exemplo de substância presente na própolis verde, que tem recebido atenção no meio acadêmico, é a artepilina C (Figura 6). Esse interesse se deve principalmente às propriedades antimicrobiana, antitumorais, indutor de apoptose, imunomodulador e propriedades antioxidantes dessa substância. [15]

de grande importância na obtenção dos resultados, pois o primeiro descreve a relação das amostras do modelo no espaço e o segundo descreve a importância de cada variável na descrição do modelo. [23,32]

1.3.3.2. Métodos de classificação

Os métodos de classificação podem ser subdivididos em métodos supervisionados e não supervisionados. Nos métodos supervisionados, também conhecidos como reconhecimento de padrão, utiliza-se um conjunto de amostras de categorias conhecidas para classificação do objeto. Já nos métodos não supervisionados, também denominados como conhecimento de padrão, um conjunto de treinamento não está disponível ou ainda não são conhecidas informações suficientes à respeito desse conjunto para classificação do objeto em um determinado grupo. [23,29]

O que diferencia os métodos de análise exploratória dos métodos de classificação não supervisionados é que, neste último, o objetivo é buscar similaridades entre as amostras. [23]

2. OBJETIVOS

Vista a importância econômica da própolis verde no Brasil, principalmente no que diz respeito à sua exportação, e tendo também em vista o possível problema relativo à venda de extratos de própolis comum no mercado incorretamente identificados como extrato de própolis verde, este trabalho tem por objetivo obter um modelo de calibração multivariado para a classificação da própolis por espectros de fluorescência molecular, utilizando a espectrofluorimetria e a quimiometria, além de compreender um pouco mais o método científico e a ferramenta quimiométrica. O estudo desse método visa, dessa maneira, encontrar uma melhor forma de identificar a própolis vendida no país e assim contribuir para o promissor desenvolvimento da qualidade do produto.

3. PARTE EXPERIMENTAL

A seqüência de etapas realizadas na pesquisa está apresentada na Figura 11.

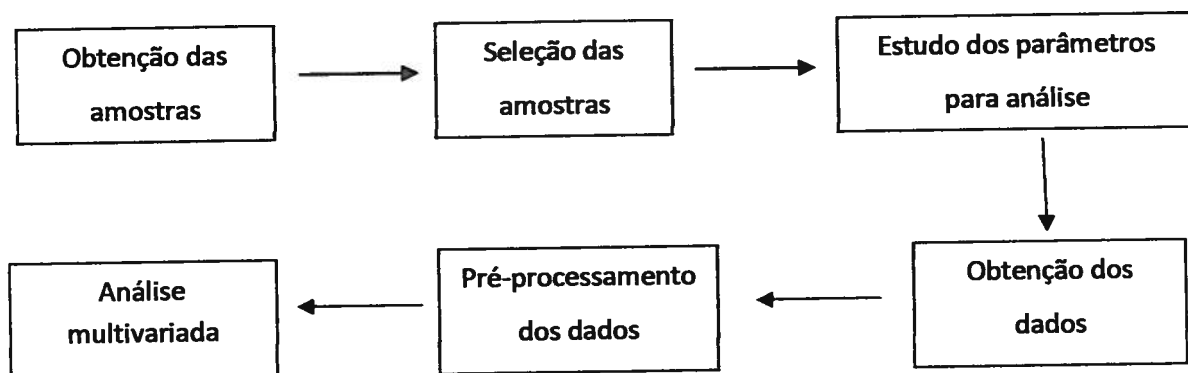


Figura 11. Diagrama das etapas realizadas no desenvolvimento do trabalho

3.1. AMOSTRAS

Foram utilizadas 59 amostras de extrato alcoólico de própolis de diferentes estados do país, como Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraná, São Paulo e Santa Catarina, obtidas em estabelecimentos comerciais ou doadas por algumas empresas produtoras. As amostras foram denominadas como do tipo comum (C) e do tipo verde (V) com base nas informações constatadas na embalagem. Quando nenhuma informação era disponível, designou-se como comum.

Devido ao elevado número de amostras, visando obter um conjunto mais representativo possível das mesmas, optou-se por realizar uma seleção que abrangesse diferentes regiões do país onde foram produzidas e ou diferentes datas de fabricação. Esta etapa é de fundamental importância na análise, pois aqui será formado o conjunto de calibração utilizado na construção do modelo. As Tabelas 3 e 4 apresentam as amostras comuns e verdes respectivamente, onde são informados as porcentagens de matéria prima presentes no extrato seco e os locais de origem.

3.2. REAGENTES

Foi utilizado álcool etílico PA da marca Synth 95 % (V/V) no preparo das soluções para as análises espectrofotométrica e espectrofluorimétrica.

Tabela 3. Amostras de própolis comum utilizadas para análise espectrofluorimétrica

Amostra	Extrato seco (% (m/V))	Cidade	Estado
C2	30	São José do Rio Preto	SP
C3	25	Belo Horizonte	MG
C5	30	Ribeirão Preto	SP
C6	-	Bebedouro	SP
C7	20	Bela Vista de Minas	MG
C8	30	Bela Vista de Minas	MG
C9	-	Nova Lima	MG
C11	11	São Gonçalo do Sapucaí	MG
C13	80	São Paulo	SP
C14	20	Divinópolis	MG
C15	11	Mairique	SP
C17	11	São Paulo	SP
C19	-	São Sebastião do oeste	MG
C20	20	Barretos	SP
C21	11	Assaí	PR
C22	11	Bambuí	MG
C23	-	São Gotardo	MG
C24	30	São José da Lapa	MG
C25	30	Ribeirão Preto	SP
C26	12	Pariquera-Açu	SP
C27	-	Belo Horizonte	MG
C28	30	Piumhi	MG
C29	-	São Carlos	SP
C30	-	Aquiráz	CE
C31	-	Jequié	BA
C32	30	São Paulo	SP
C34	11	Formiga	MG
C35	12	União da Vitória	PR
C36	30	Feira de Santana	BA
C38	15	Araraguá	SC
C39	30	Curitiba	PR
C40	11	Colombo	PR
C41	-	Curitiba	PR
C42	-	Mogi das Cruzes	SP
C43	-	São Paulo	SP
C45	-	Embu das Artes	SP
C46	30	Embu das Artes	SP

Tabela 4. Amostras de própolis verde utilizadas para análise espectrofluorimétrica

Amostra	Extrato seco (%)	Cidade	Estado
V1	11	Ribeirão Preto	SP
V2	30	Bebedouro	SP
V3	12	São Carlos	SP
V4	35	Moeda	MG
V5	40	Santa Barbara	MG
V6	11	BambuÍ	MG
V7	30	Ribeirão Preto	SP
V8	-	Uberlândia	MG
V9	12	São Carlos	SP
V10	11	Ribeirão Preto	SP
V11	30	Bela Vista de Minas	MG
V12	11	BambuÍ	MG
V13	-	Lagoa da Prata	MG
V14	30	Claudio	MG
V15	30	São Paulo	SP
V16	35	São Paulo	SP
V17	25	São Paulo	SP
V18	15	São Paulo	SP
V19	11	BambuÍ	MG
V20	11	Formiga	MG
V21	11	BambuÍ	MG
VP*	-	São Paulo	SP

* Preparada em laboratório utilizando uma própolis denominada de verde e álcool etílico 95 % (V/V)

3.3. ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA

Os espectros de absorção molecular na região do UV-Vis foram obtidos em um espectrofotômetro da marca Hewlet-Packard, modelo 8451A, com cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

Em balões de 25 mL, foram adicionados 5 µL do extrato de própolis utilizando para isto uma pipeta volumétrica ICELL-MOD.P-213 e álcool etílico 95 % (V/V) até completar o volume. Tal diluição foi necessária para que a intensidade das bandas dos espectros de absorção não fossem elevadas demais e provocassem distorções.

Os espectros de absorção de cada amostra foram obtidos realizando uma varredura do comprimento de onda de excitação de 190 a 800 nm, com incrementos de 2 nm.

3.4. ANÁLISE ESPECTROFLUORIMÉTRICA

Os espectros de emissão molecular na região do UV-Vis foram obtidos em um espectrofluorímetro da marca SHIMADZU RF-5301, dotado de uma lâmpada de xenônio, e foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

As soluções foram preparadas diretamente na cubeta, sendo transferidos 100 μL da amostra de própolis em estudo e 2,5 mL de álcool etílico. Para o volume de 100 μL utilizou-se uma micro pipeta ICELL 100 μL , modelo p-213. Para o volume de 2,5 mL foi utilizado uma pipeta Accumax PRO (0,5 – 5) mL, calibração NBR ISO/IEC 17025.

Na espectrofluorimetria convencional, todas as amostras foram excitadas em diferentes comprimentos de onda (λ), de 240 a 440 nm, com intervalos de 20 nm. Para cada comprimento de onda de excitação estipulado (λ_{EX}), diferentes janelas de excitação e emissão dos monocromadores foram testadas com o intuito de se obter a melhor intensidade do sinal. Estipuladas as janelas ideais para um determinado comprimento de onda, independente das amostras, estas janelas foram mantidas constantes. A varredura do monocromador de excitação foi do λ_{EX} a 750 nm.

Na espectrofluorimetria sincronizada, algumas amostras foram analisadas para definir a melhor diferença de comprimento de onda ($\Delta\lambda$) a ser utilizada. Nas análises, foi feita uma varredura entre $(250 + \Delta\lambda)$ a 800 nm, onde o $\Delta\lambda$ foi fixado em 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 para cada amostra em estudo. As janelas de excitação e emissão foram mantidas em 5 e 3 nm respectivamente.

3.5. SOFTWARES

Os programas OriginPro 8.0 e Excel 2007 foram utilizados para agrupamento dos dados e construção de gráficos e tabelas. Os programas MINITAB-14 e MathLab R2009b foram utilizados para tratamento quimiométrico dos dados.

3.6. PRÉ-PROCESSAMENTO UTILIZADO

Sabendo que cada comprimento de onda de emissão obtido corresponde a uma variável para construção do modelo quimiométrico, e que cada variável possui unidades equivalentes às demais variáveis, um pré-processamento para correlação destas variáveis não se faz necessário. Porém, foi realizada uma centralização dos dados na média, o que torna a visualização mais adequada. É importante ressaltar que a contribuição para análise multivariada de certos comprimentos de onda dos espectros de emissão são mais acentuados do que a de outros comprimentos de onda analisados no

mesmo espectro, o que é de interesse, pois os comprimentos de onda de emissão de maior peso para análise multivariada são justamente os que contêm as informações das substâncias presentes na própolis.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR

Considerando que o extrato alcoólico de própolis tenha a propriedade de fluorescência devido à presença de substâncias que contêm anéis aromáticos e duplas conjugadas, um primeiro passo a ser dado é avaliar a capacidade de absorção na região do UV-Vis das amostras.

Nesta parte do trabalho, um grupo de 40 amostras representativas, tanto de extratos de própolis verde quanto de comum, foi utilizado para verificar a absorção na região do UV-Vis. A Figura 12 apresenta os espectros de absorção molecular para todas as amostras analisadas.

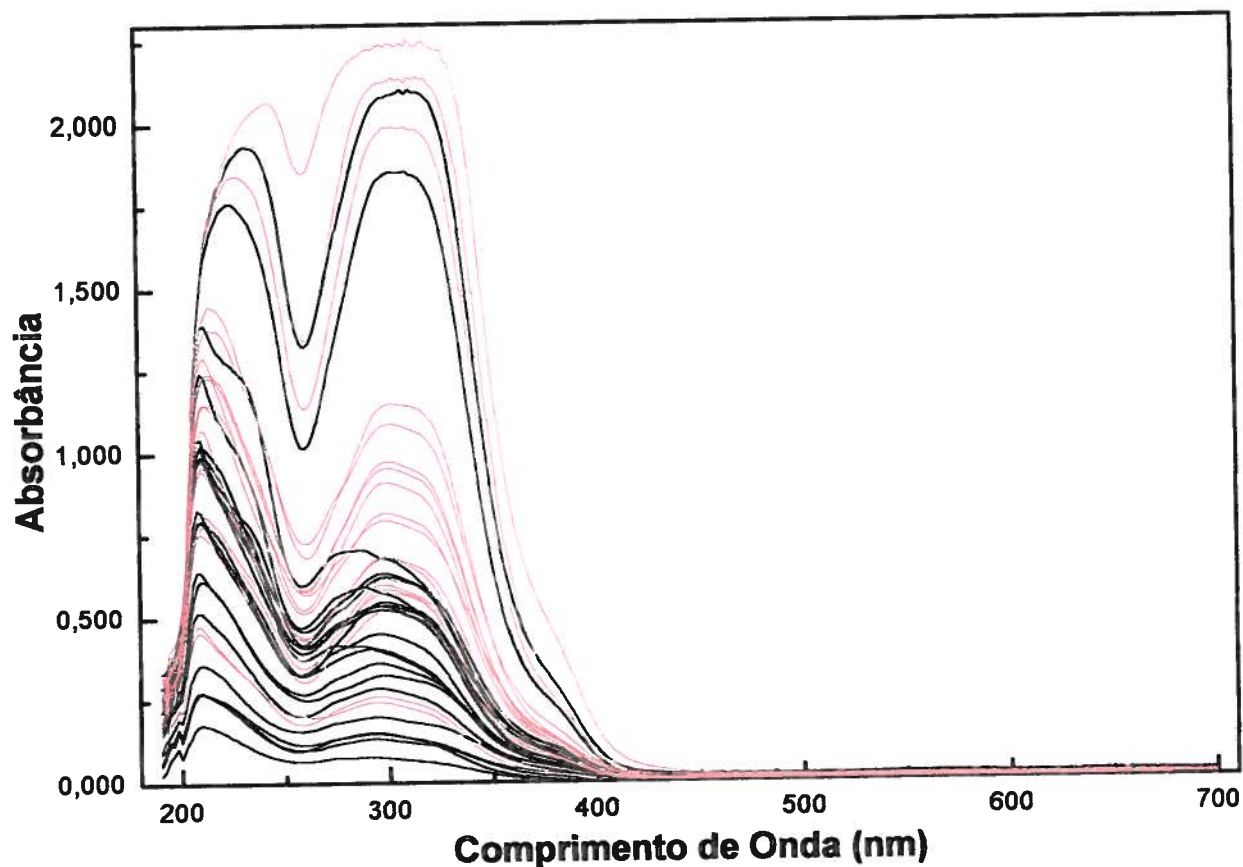


Figura 12. Espectros de absorção molecular para quarenta amostras de extrato de própolis. (—) própolis comum, (—) própolis verde.

Segundo o Ministério da Agricultura [3], extratos de própolis comercializados devem apresentar espectros de absorção de radiação UV-Vis contendo picos característicos das principais classes de flavonóides. Para Markham [10], um típico espectro de absorção para flavonóides deve apresentar duas bandas de absorção na região do UV-Vis com seus máximos entre as faixas de 300 a 550 nm e de 240 a 285 nm. De acordo com a Tabela 5, máximos de absorção para todas as amostras podem ser observados entre as faixas estipuladas para os flavonóides, confirmando, dessa forma, a presença dos mesmos.

Observando as estruturas dos ácidos fenólicos e flavonóides (Figuras 1 e 3), substâncias presentes na própolis, é possível notar a presença de anéis aromáticos. Segundo a literatura, as transições eletrônicas envolvidas no benzeno são basicamente do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. Estas transições fornecem bandas de absorção que possuem comprimento de onda máximo em torno de 184 e 202 nm (banda primária) e 255 nm (banda secundária). Das bandas primárias, a banda em 184 nm não é observada em condições experimentais normais, porque absorções nesse comprimento de onda estão na região do Ultravioleta de vácuo do espectro, região esta além do alcance da maioria dos instrumentos comerciais. A substituição no anel benzênico pode causar deslocamentos batocrômico e hiperacrômico em suas bandas de absorção primária e secundária dificultando, dessa forma, a predição do significado de cada banda em um espectro de UV-Vis em amostras que possuam um número elevado de substâncias distintas. [34]

Segundo a literatura, substituintes com elétrons n (não ligantes) causam deslocamento nas bandas para maiores comprimentos de onda, e quanto mais disponíveis estes elétrons estiverem para interação com o sistema π do anel aromático, maiores serão os deslocamentos. [34]

Em hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, as bandas primárias e secundárias estão deslocadas para maiores comprimentos de onda. Um exemplo é que a banda primária em 184 nm do benzeno desloca-se para 220 nm em certas substâncias polinucleares. [34]

Para melhor visualização dos máximos de absorção especificados na Tabela 5 de I a VI, a Figura 13 apresenta três espectros de absorção molecular com estes picos identificados.

Tabela 5. Comprimento de onda de absorção máxima para as amostras de própolis verde e comum.

Amostra	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)					
	I	II	III	IV	V	VI
C2	210		272	295	316	379
C3	208	222	272	298	322	380
C5	210		273	295	321	382
C6	207	220	275	295	318	379
C7	210		272	291	320	372
C8	210	220	272	294	323	380
C9	208	230	272	294	317	379
C11	210	222	272	297	316	382
C14	210	221	272	292	324	380
C20	210	220	273	292	318	380
C22	211	221	272	297	319	385
C29	209	232		291	320	379
C30	211	220	272	294	319	379
C31	208	221	276	294	321	386
C34		223		294	321	382
C35	208	233	280	291	318	379
C36	211	219	274	297	318	377
C38	211	231	272	289	315	378
C39	209	233	276	298	319	376
C40	211	232	276	289	316	376
C42		234		297	322	380
V1	211		272	298	316	380
V2	210	235	274	298	316	379
V3	209			294	319	384
V4	209		273	294	318	381
V5	215		272	300	320	379
V6	212	223	272	296	320	379
V7	211		276	298	319	383
V8	211	236	274	298	320	378
V9	208	237	274	295	317	377
V10	211		275	300	318	383
V11	213		274	299	320	380
V12	213		274	300	318	380
V13	213		273	300	320	380
V14	211	237		295	318	379
V15		234		290	326	384
V16		226		297	319	382
V17		242		283	330	380
V18	214	235		296	320	383
VP	210	236		296	322	375

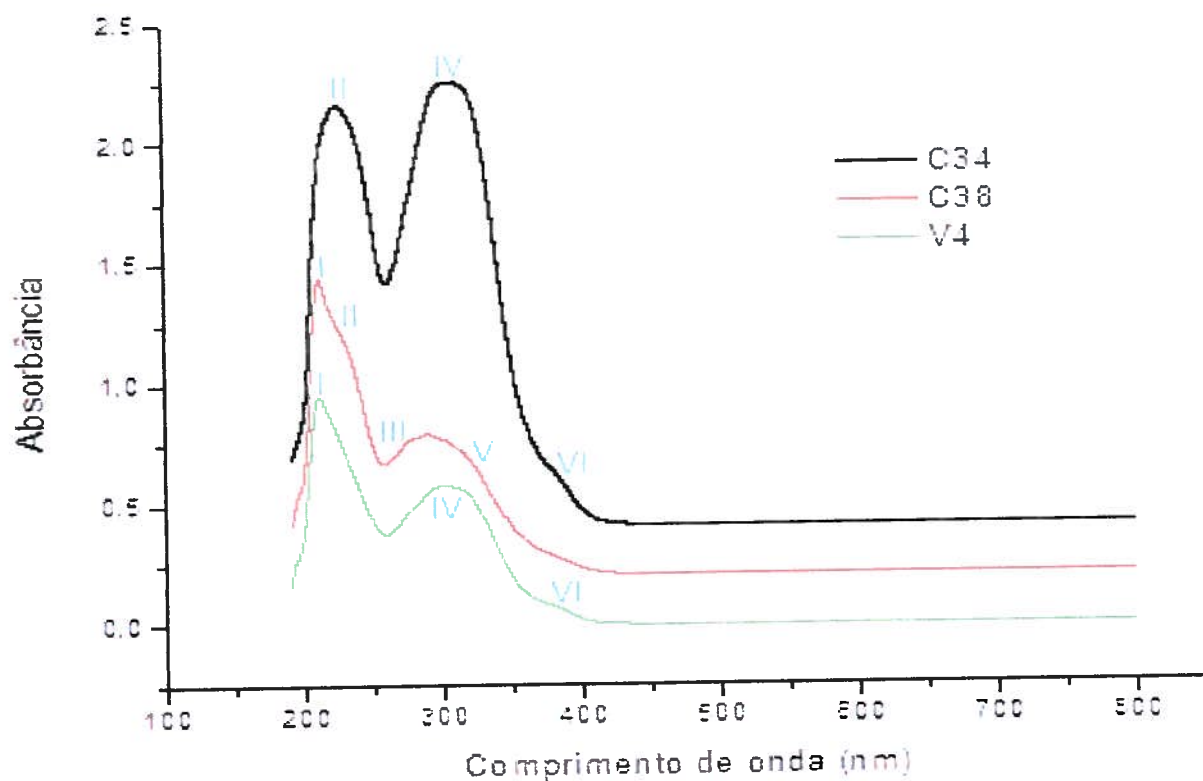


Figura 13. Espectros de absorção molecular com identificação de seus picos de máximo de absorção para as amostras C34, C38 e V4

Os ácidos fenólicos e flavonóides são hidrocarbonetos aromáticos polinucleares e possuem substituintes com elétrons não ligantes. Estes dois fatos causam um deslocamento batocrômico, para maiores comprimento de onda, das bandas no espectro de UV-vis das amostras.

Segundo a Tabela 5, é possível observar um comprimento de onda em comum para quase todas as amostras próximo de 210 e 230 nm, o que pode ser explicado pelo deslocamento batocrômico para o comprimento de onda de 184 e 202 nm do benzeno em substâncias polinucleares. Outro comprimento de onda em comum a quase todas as amostras está próximo de 310 nm, que pode corresponder ao deslocamento da banda de 255 nm para o benzeno. Os comprimentos de onda próximos a 270 nm podem ser relativos às duplas conjugadas presentes nas estruturas das própolis, estruturas estas que podem não estar presentes em todas as amostras.

Ainda analisando a Tabela 5, um máximo de absorção para todas as amostras é observado próximo a 380 nm. Este comprimento de onda é próximo ao de 400 nm referente ao violeta no espectro visível, responsável pela cor amarela das amostras de própolis. [34]

Visto que tanto as amostras de própolis verde quanto as amostras de própolis comum possuem bandas de absorção no UV-Vis, um segundo passo a ser dado é a escolha do método a ser utilizado para

obtenção da matriz de dados de fluorescência. Porém, da análise espectrofotométrica realizada, foi possível obter uma matriz de dados dos espectros de absorção encontrados e, conseqüentemente, uma análise multivariada pode ser realizada.

A PCA é uma técnica da análise exploratória e tem como característica reduzir o número de variáveis originais para um menor número de variáveis denominadas de componentes principais, sendo que cada componente principal do modelo construído possui um percentual de variância explicada, e a soma de cada percentual de variância explicada resulta na porcentagem de variância acumulada.

A Tabela 6 apresenta o percentual de variância explicada e acumulada para as cinco primeiras componentes principais da análise multivariada dos dados de absorção obtidos.

Tabela 6. Número de componentes principais (CP) e suas respectivas porcentagens de variância explicada (% Var. Explicada) e porcentagem de variância acumulada (% Var. Acumulada), para a matriz de dados obtida da análise espectrofotométrica dos extratos de própolis

Número de componentes principais	% Var. Explicada	%Var. Acumulada
1	96,8	96,8
2	2,5	99,3
3	0,5	99,8
4	0,1	99,9
5	0,1	100

De acordo com a Tabela 6, é possível observar, que das 130 variáveis originais, as cinco primeiras componentes principais explicam 100 % da variância total do modelo. Estas 130 variáveis originais correspondem a cada comprimento de onda de excitação analisado.

Sendo a PC1 responsável por 96,8 % da variância explicada no modelo construído para classificação da própolis por tipo, ao analisar-se o gráfico de pesos para o modelo quimiométrico (Figura 14), observa-se que os comprimentos de onda de maior peso para a discriminação das amostras encontram-se próximo a 215 e 310 nm, correspondente aos picos I, II e IV. Como especificados anteriormente, esta região está relacionada com o deslocamento batocrômico do benzeno para hidrocarbonetos aromáticos polinucleares presentes na própolis como ácidos fenólicos e flavonóides.

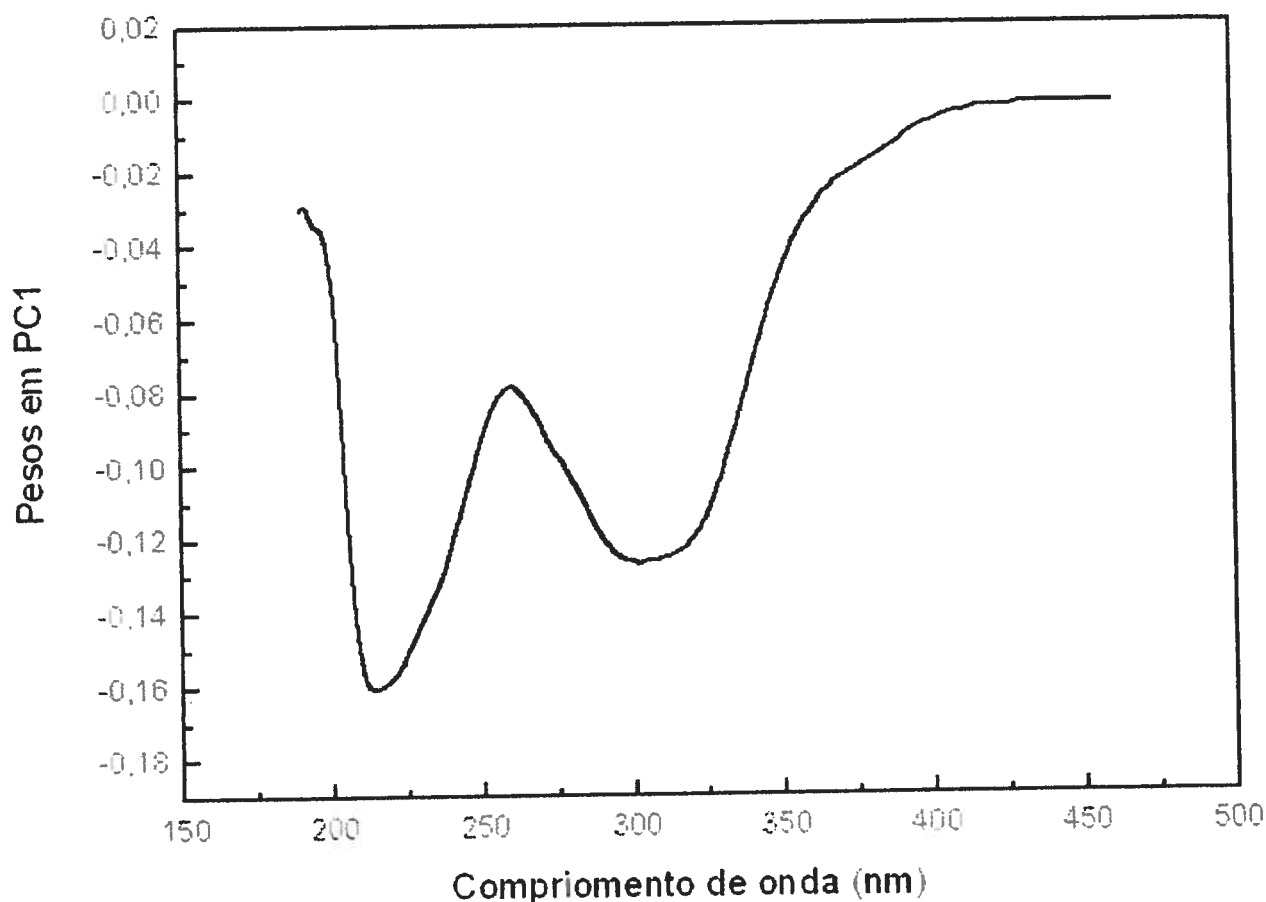


Figura 14. Gráfico de pesos para a classificação de extratos alcoólicos de própolis, usando a espectrofotometria de absorção molecular.

A Figura 15 apresenta o gráfico dos escores PC1xPC2 que tem por objetivo visualizar a segregação das amostras de própolis por tipo (comum ou verde) e por estado. Segundo o gráfico A, a primeira e a segunda componentes principais possibilitaram a segregação entre as amostras de própolis para diferentes tipos. De acordo com este gráfico é possível notar que as amostras contidas no agrupamento de amostras verdes têm origem predominante de Minas Gerais e São Paulo, região onde o alecrim do campo é encontrado em grandes quantidades. É possível observar ainda que três amostras de própolis comum encontram-se junto ao grupo de amostras verdes e que, destas amostras, duas são do estado de Minas Gerais e uma é da Bahia, como pode ser observado na Figura 15 B. Uma possível explicação para o agrupamento destas duas amostras de Minas Gerais ao grupo das amostras verdes é que a manufatura destes extratos analisados tenha sido realizada com resina de própolis verde e classificação pelo produtor como comum. O mesmo vale para a amostra da Bahia, uma vez que grandes produtores podem comprar resina de própolis de diferentes regiões do país, ou simplesmente que esta amostra seja um "outlier".

Observando ainda o gráfico **A**, duas amostras de própolis classificadas como verde estão agrupadas como amostras comuns, sendo que estas duas amostras pertencem ao mesmo produtor. Uma explicação para este fato é que a resina de própolis utilizada para sua manufatura seja a do tipo comum.

Observando ainda a Figura 15 **B**, é possível notar que a PC2 separa as amostras da região sul das amostras dos outros estados.

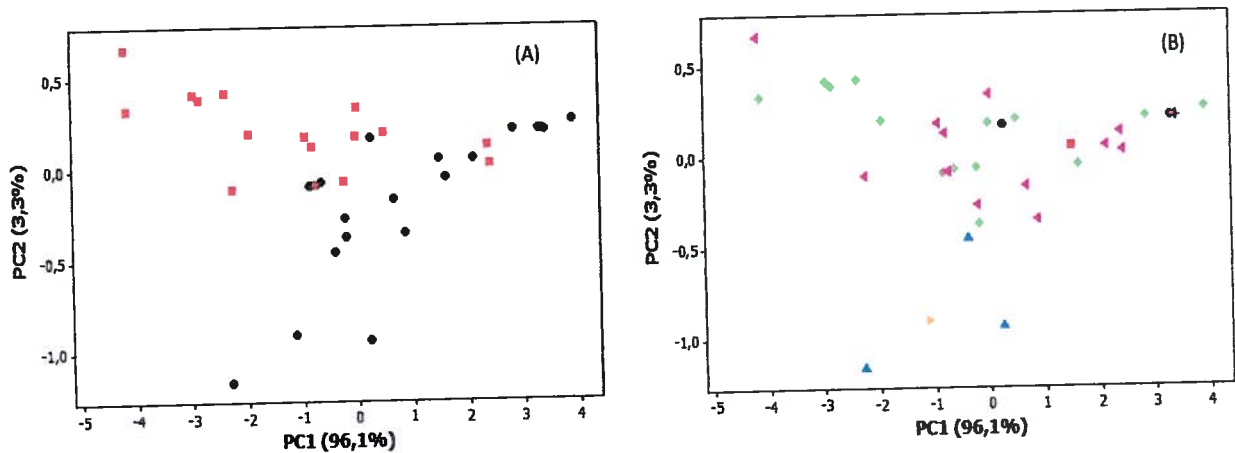


Figura 15. Gráfico dos escores para as duas primeiras componentes principais, obtidos para classificação dos extratos de própolis por tipo (comum, verde) (A) e por estado (B), Onde, para o gráfico A: (●) Comum e (■) Verde e para o gráfico B: (●) Bahia, (■) Ceará, (◆) Minas Gerais, (▲) Paraná, (▶) Santa Catarina e (◀) São Paulo

4.2. ESPECTROFLUORIMETRIA DE EMISSÃO MOLECULAR

4.2.1 ESCOLHA DO MÉTODO

Os dados de fluorescência podem ser obtidos pelo método convencional ou sincronizado e são expressos na forma de espectros. O método sincronizado tem sido utilizado com maior frequência em experimentos científicos, por gerar bandas mais finas e definidas das espécies de interesse, quando se emprega um $\Delta\lambda$ adequado. Porém, a obtenção destes $\Delta\lambda$ adequado requer maior disponibilidade de tempo. Alguns dados foram obtidos utilizando a espectrofluorimetria sincronizada, porém, com seus resultados não foi possível observar separação por alguma categoria como tipo ou estado utilizando análise multivariada.

Já o método convencional, por sua vez, apesar de analisar simultaneamente várias espécies presentes em uma mesma amostra, apresenta curvas mais simples e de mais fácil interpretação ao se realizar uma análise multivariada, além de requerer menor demanda de tempo para a obtenção de comprimentos de onda adequados.

Dessa maneira, com o intuito de melhor explorar o volume de dados a ser obtido, optou-se por realizar somente o método de espectrofluorimetria convencional para a obtenção das matrizes de dados.

4.2.2. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA ESPECTROFLUORIMETRIA CONVENCIONAL

Sendo o método de espectrofluorimetria convencional escolhido para análise das amostras de própolis verde e comum, diferentes janelas de excitação (j_{EX}) e emissão (j_{EM}) foram testadas com o intuito de encontrar as que melhor se adequaram a cada λ_{EX} , e os resultados que melhor se ajustaram para os λ_{EX} estão expresso na Tabela 7. Os comprimentos de onda de excitação utilizados nas análises foram de 250 a 400 nm variando de 50 em 50 nm. É importante ressaltar que esse número reduzido de comprimentos de onda de excitação foi escolhido na parte final do trabalho onde procurou-se inserir o maior número possível de amostras para construção do modelo.

A definição de um comprimento de onda mais adequado para excitação das amostras de própolis poderia ter sido obtida com uma matriz de excitação-emissão construindo-se um gráfico 3D. Porém, devido à diferença de janelas de excitação e emissão utilizadas para específicos comprimentos de excitação, a construção do gráfico 3D é inadequada. Assim, a análise das amostras foi realizada separadamente em diferentes comprimentos de onda de excitação.

Tabela 7. Janelas de excitação (j_{EX}) e emissão (j_{EM}) para diferentes comprimentos de onda de excitação.

Comprimento de onda de excitação (nm)	j_{EX} (nm)	j_{EM} (nm)
250	10	10
300	15	10
350	10	5
400	5	5

4.2.3. ANÁLISE DOS ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA

Espectros de emissão molecular de 59 amostras de extrato de própolis verde e comum, devidamente selecionadas, foram obtidos com o intuito de se realizar análise multivariada dos dados encontrados.

Considerando que a constituição da própolis comum seja diferente da constituição da própolis verde, espera-se obter espectros de perfis singulares para os diferentes tipos de própolis. Porém, é importante ressaltar que as amostras dos extratos alcoólicos de própolis podem ter sido caracterizadas como comuns pelo produtor, mas terem sido manufaturas com resina de própolis verde, ou até mesmo misturas. Uma possível explicação para isso é a produção de extratos por pequenos produtores que não disponham de análises para caracterização da própolis como verde ou comum. Extratos alcoólicos de própolis verde também podem ser manufaturados com própolis classificada como comum.

A Figura 16 apresenta espectros de emissão molecular para os comprimentos de onda de excitação de 250, 300, 350 e 400 nm para um grupo representativo de amostras classificadas como comum e verde. De acordo com a figura, as amostras em questão apresentam máximos de emissão entre 430 e 470 nm, o que pode ser atribuído à presença de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, que possuem, segundo a literatura, bandas de emissão com máximo entre 320 a 550 nm. [36] Uma segunda banda de emissão próxima a 670 nm pode ser observada para algumas amostras utilizando comprimento de onda de excitação de 400 nm.

Os comprimentos de onda de 250, 300, 350 e 400 nm foram escolhidos devido à presença de substância na própolis que possuam máximos de absorção na região de 240 a 550 nm. Além do que, com o decorrer da análise dos dados utilizando a análise multivariada, observou-se que os resultados obtidos com estes comprimentos de onda de excitação apresentavam mais informações.

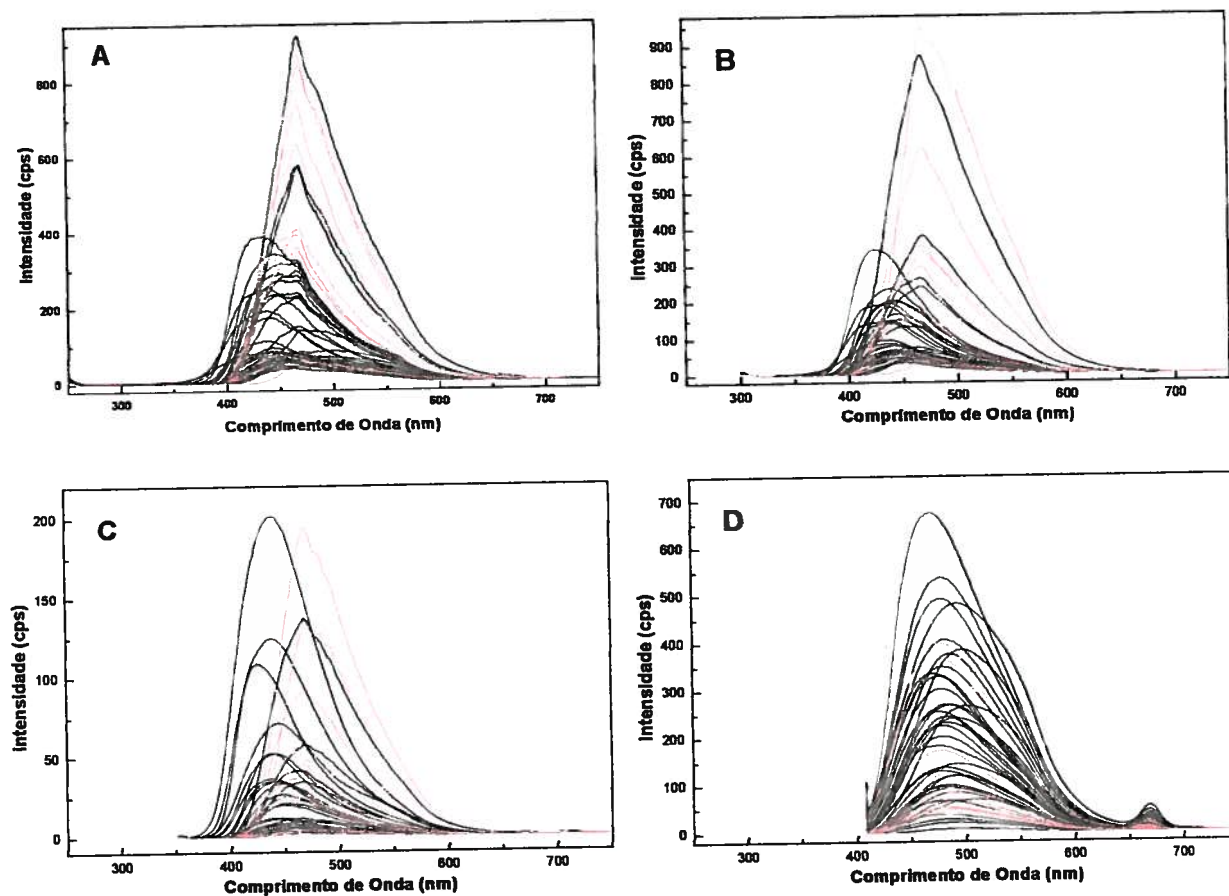


Figura 16. Espectros de emissão molecular no modo convencional para 59 amostras de extrato alcoólico de própolis utilizando diferentes λ_{EX} . A) 250 nm, B) 300 nm, C) 350 nm, D) 400 nm. (—) própolis comum, (---) própolis verde.

4.2.4. ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA DOS DADOS DE EMISSÃO MOLECULAR

A análise de componentes principais (PCA) para os dados de emissão molecular obtidos para um conjunto de 59 amostras de própolis identificadas pelo produtor como verde e comum, foi feita com o intuito de identificar possíveis agrupamentos, correspondendo a um determinado tipo de própolis, determinada região de produção do extrato ou ainda determinado fabricante do extrato.

A Tabela 8 apresenta o percentual de variância explicada e acumulada para as três primeiras componentes principais da análise multivariada dos dados obtidos para os comprimentos de onda de excitação de 250, 300, 350 e 400 nm, e a Figura 17 apresenta os respectivos gráficos dos pesos.

Tabela 8. Número de componentes principais (CP) e suas respectivas porcentagens de variância explicada (% Var. Explicada) e porcentagem de variância acumulada (% Var. Acumulada), utilizando diferentes λ_{EX}

λ_{EX} (nm)	Número de componentes principais	% Var. Explicada	%Var. Acumulada	Variáveis de Maior importância
250	1	93,6	93,6	460 a 475 nm
	2	5,7	99,3	
	3	0,6	99,9	
300	1	92,6	92,6	460 a 475 nm
	2	6,4	99,0	
	3	0,9	99,9	
350	1	82,6	82,6	450 a 470 nm
	2	16,9	99,5	
	3	0,4	99,9	
400	1	97,2	97,2	465 a 495 nm
	2	2,5	99,7	
	3	0,2	99,9	

Independentemente do λ_{EX} empregado, os comprimentos de onda de emissão mais importantes para a discriminação das amostras é a faixa entre 465 a 495 nm. A análise dos pesos é de fundamental importância para saber quais comprimentos de onda de emissão e conseqüentemente quais substâncias possuem maior influência em um determinado modelo, porém há uma dificuldade em encontrar na literatura valores de máximos de emissão para determinadas substâncias presentes na própolis utilizando determinados comprimentos de onda de excitação.

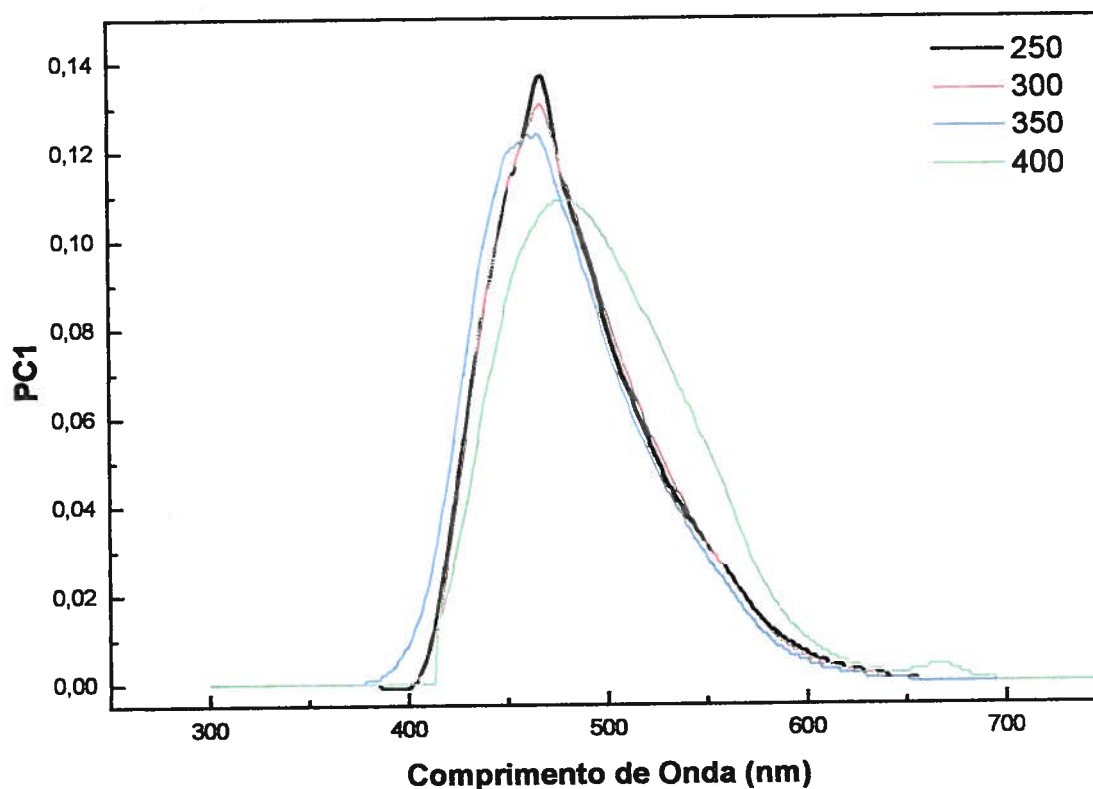


Figura 17. Gráfico dos pesos para a classificação de extratos alcoólicos de própolis, usando a espectrofluorimetria no modo convencional em diferentes λ_{ex} . (—) 250 nm, (—) 300 nm (—) 350 nm, (—) 400 nm.

A Figura 18 apresenta os gráficos dos escores PC1xPC2 para os comprimentos de onda de excitação de 250, 300, 350 e 400 nm, onde tentou-se classificar as amostras de própolis por tipo (comum ou verde).

De acordo com a Figura 18 é possível observar que os gráficos dos escores para os comprimentos de onda de excitação de 250, 300 e 350 nm apresentam formação de grupos, mas que estes não fornecem maiores informações a respeito da classificação por tipo da própolis, uma vez que as componentes principais em questão não separam as amostras de própolis como comum ou verde. Já para o gráfico dos escores construído utilizando o comprimento de onda de excitação de 400 nm (Figura 18 D), é possível observar a separação por tipo, sendo a PC1 a principal responsável.

Ainda observando o gráfico D da Figura 18, é possível notar a formação de um grupo coeso de amostras de própolis verde, onde quase todas as amostras desse tipo podem ser encontradas. Considerando que a produção deste tipo de própolis pelas abelhas, possui como principal fonte vegetal a espécie *Braccharis dracunculifolia*, é de se esperar que estas amostras fiquem bem próximas umas das outras na análise multivariada dos dados espectrais. Outra observação a ser feita é que amostras de

própolis comum também podem ser notadas neste agrupamento. Sendo este grupo realmente de amostras verdes, uma possível explicação para a ocorrência destas amostras comuns nesta região do gráfico é que resina de própolis verde tenha sido utilizada para manufatura das amostras. A análise da Figura 19 pode auxiliar a confirmar esta hipótese.

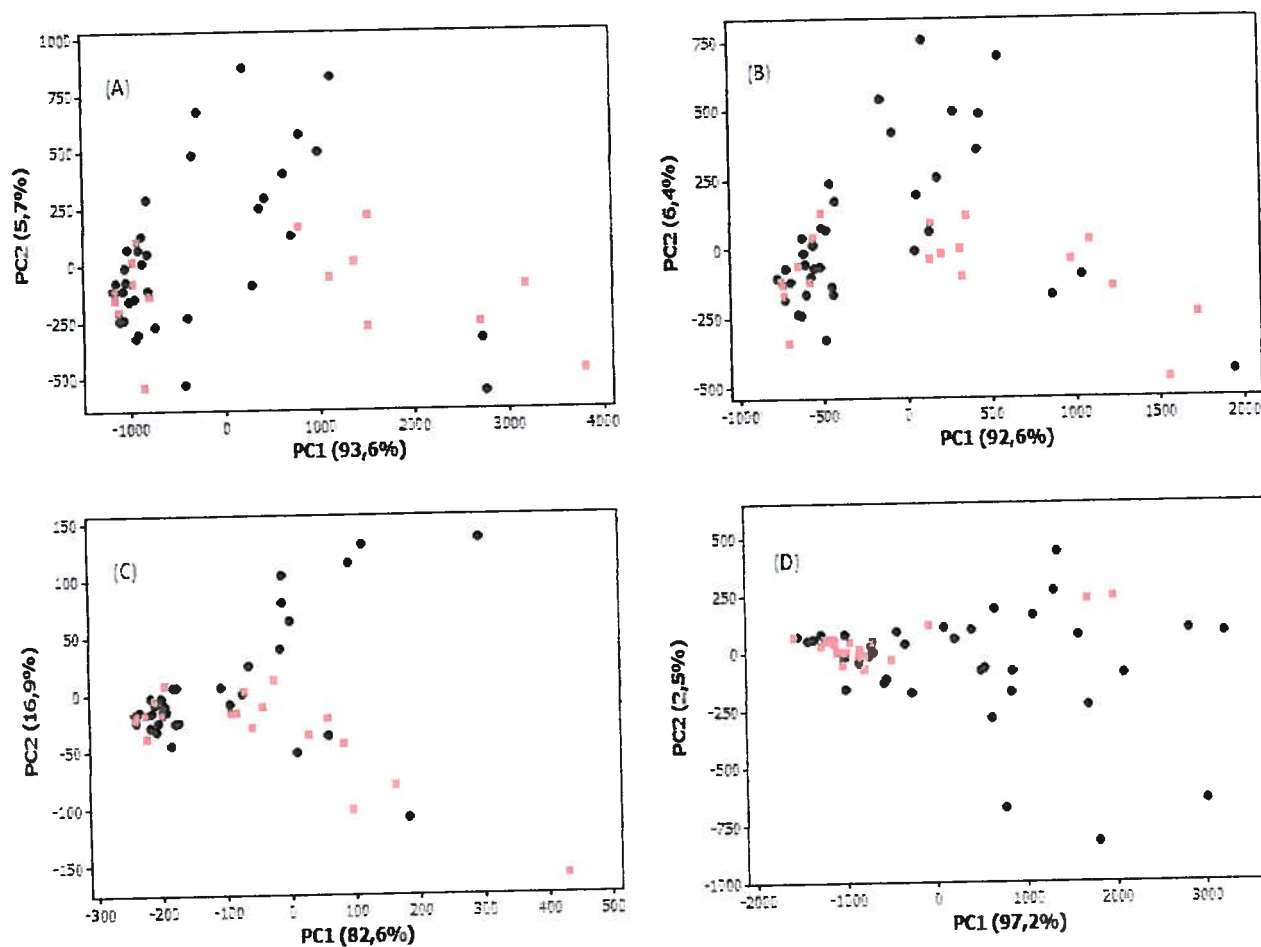


Figura 18. Gráfico dos escores para as duas primeiras componentes principais, obtidos para classificação, por tipo (comum, verde), do extrato de própolis, utilizando diferentes λ_{EX} . A) 250 nm, B) 300 nm, C) 350 nm, D) 400 nm. (●) Comum, (■) Verde.

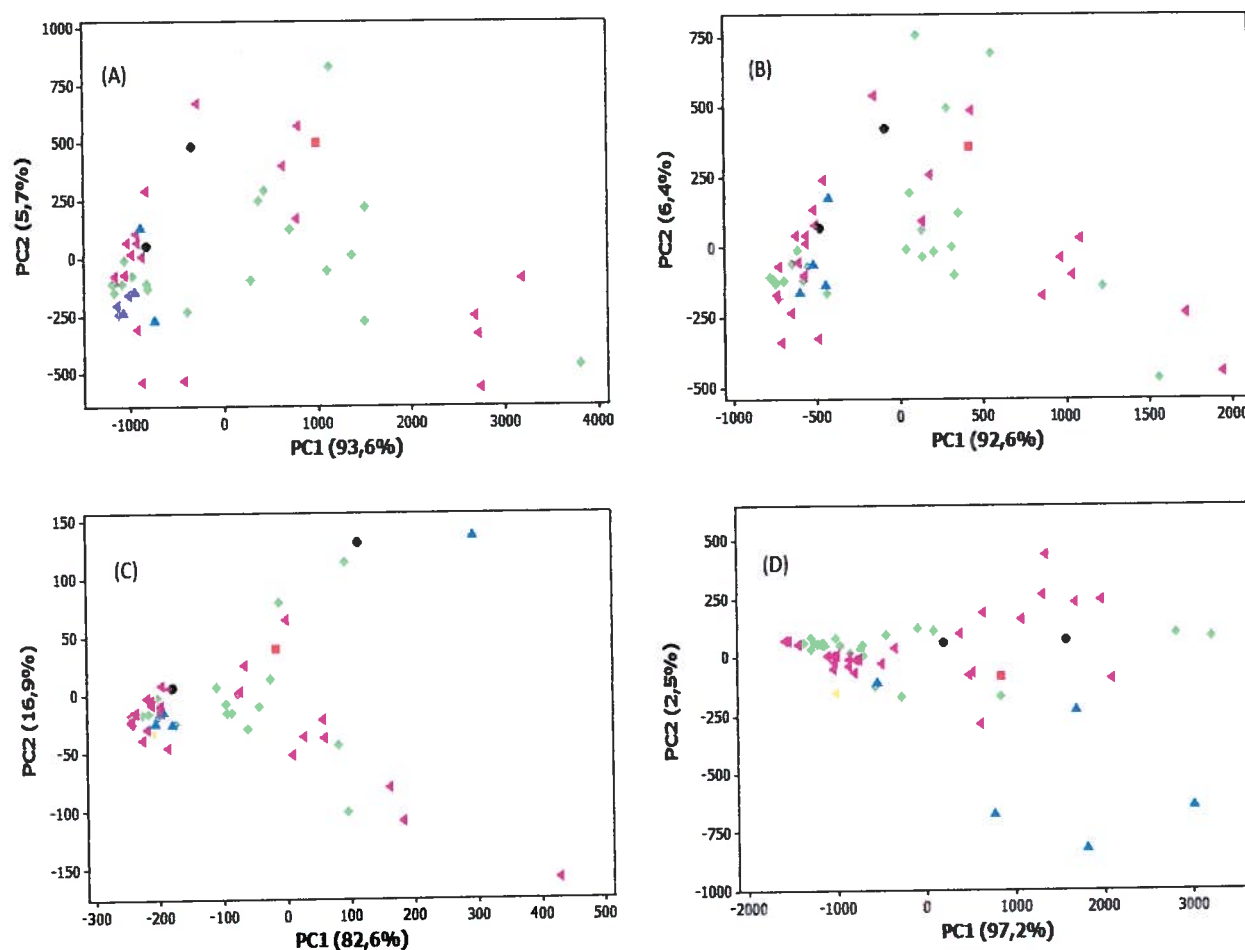


Figura 19. Gráfico dos escores para as duas primeiras componentes principais, obtidos para classificação do estrato de própolis por estado, utilizando diferente λ_{EX} . A) 250 nm, B) 300 nm, C) 350 nm, D) 400 nm. (●) Bahia, (■) Ceará, (◆) Minas Gerais, (▲) Paraná, (◊) Santa Catarina e (◄) São Paulo

Na Figura 19 é possível observar que o grupo formado pelas amostras verdes para comprimentos de onda de 400 nm (Figura 19 D) é constituído basicamente de amostras vindas dos estados de Minas Gerais e São Paulo, estados estes localizados na região sudeste, local de maior incidência da espécie vegetal *Braccharis dracunculifolia*. Assim, a probabilidade de que amostras comuns de extratos de própolis tenham sido manufaturadas com resina de própolis verde se faz real. Duas amostras, uma do Paraná e outra de Santa Catarina, também se agrupam a este grupo de amostras verdes. É possível que os produtores destas amostras tenham utilizado resina de própolis verde, além do que, estas amostras também podem ser "outliers".

Como pode ser observado nas Figuras 18 D e 19 D, o modelo quimiométrico obtido conseguiu separar as amostras de extrato de própolis comercializadas por tipo, levando em consideração as hipóteses mencionadas na discussão. Um fator que corrobora o presente resultado é que as duas

amostras verdes agrupadas com as amostras comuns observadas para os dados quimiométricos da análise UV-Vis, também se agruparam às amostras comuns para os dados quimiométricos de fluorescência para o comprimento de onda de excitação de 400 nm.

Com os dados de emissão obtidos, uma análise com a tentativa de classificar os extratos de própolis por produtor e provavelmente a forma como são produzidos estes extratos, também foi realizada. A Figura 20 apresenta os gráficos dos escores PC1xPC2 para os comprimentos de onda de excitação de 250, 300, 350 e 400 nm, onde tentou-se classificar as amostras de própolis por produtor. Os fabricantes que possuem apenas uma amostra analisada, não foram representados com o intuito de facilitar a visualização dos resultados.

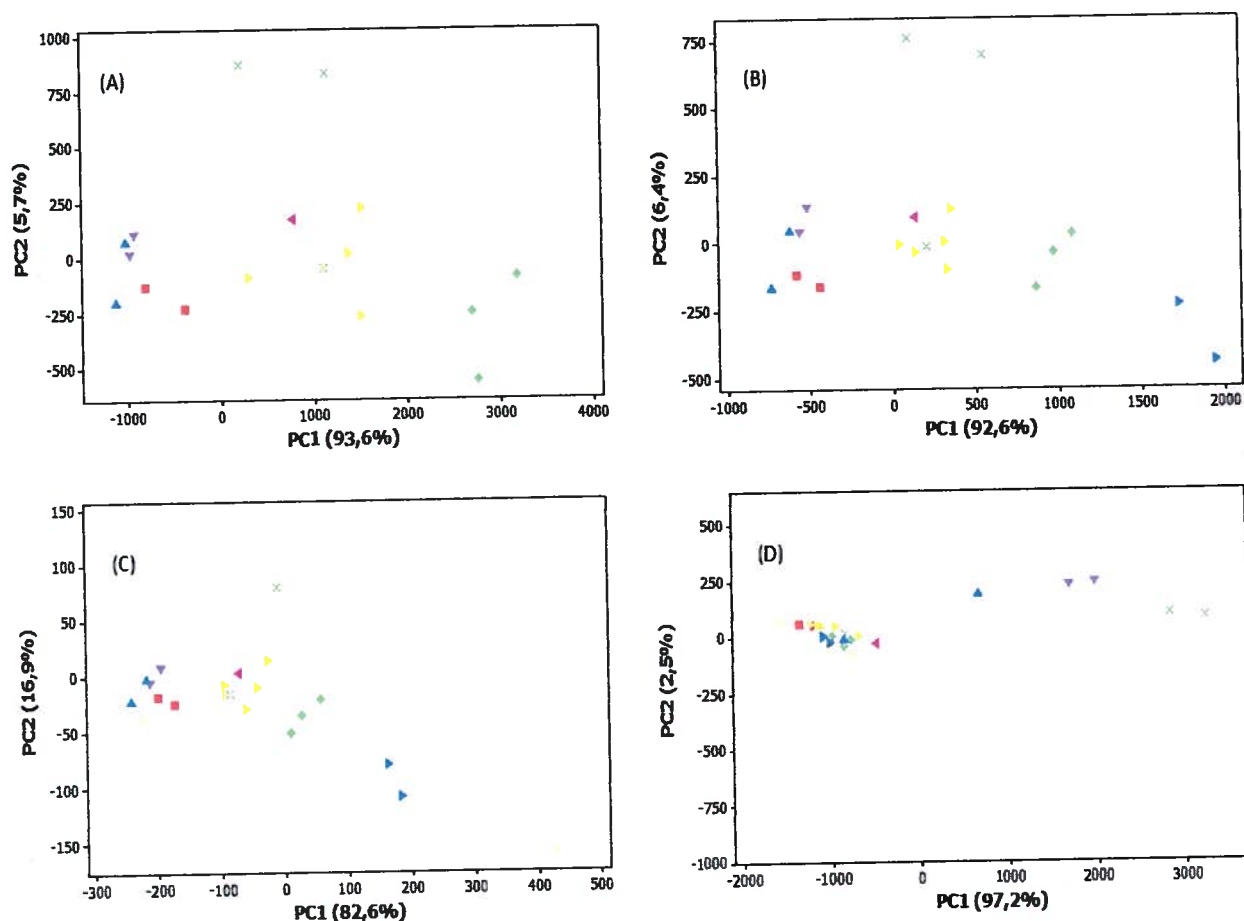


Figura 20. Gráfico dos escores para as duas primeiras componentes principais, obtidos para classificação do extrato de própolis por produtor, utilizando diferentes λ_{ex} . A) 250 nm, B) 300 nm, C) 350 nm, D) 400 nm. (■) 1, (▲) 2, (◆) 3, (◄) 4, (▼) 5, (◄) 6, (▶) 7, (×) 8 e (×) 9

Apesar do número reduzido de amostras para um mesmo produtor, é possível notar na Figura 20, para os quatro gráficos obtidos, que amostras de um mesmo fabricante quase sempre se agrupam, mesmo estas amostras sendo de diferentes tipos (comum e verde). De acordo com as informações dos gráficos da figura em questão, é possível considerar que o modo de preparo das amostras pode ser um fator relevante para as classificações encontradas. Segundo informações do produtor 6, o modo de preparo utilizado por ele é:

- A própolis é mergulhada em álcool cereais 70 % e deixada sob agitação por 8 horas;
- A mistura fica descansando por mais dois dias ao abrigo da luz;
- A solução é filtrada duas vezes e é envasada.

Já o produtor 2, realiza o preparo de suas amostras da seguinte forma:

- A própolis é macerada e em seguida é mergulhada em álcool cereais por aproximadamente 5 dias;
- Espera-se decantar-se e realiza o envasamento.

Segundo estas informações, os métodos de preparo são um pouco diferentes. Outras formas de preparo do extrato de própolis são cabíveis e podem ser um fator relevante para a classificação encontrada. O contato com outras empresas para informações a respeito da manufatura de seus extratos foi realizado, porém uma resposta ainda não foi obtida.

Segundo ainda informação fornecida pelo produtor 2, tanto os extratos de própolis comum quanto os extratos de própolis verde, são manufaturados com resina de própolis verde, a diferença está na quantidade de própolis utilizada, e ainda, a empresa compra a resina do produtor 1. De acordo com os gráficos A, B e C da Figura 16, o agrupamento das duas amostras produzidas pela empresa 2 é observado, provavelmente, devido à utilização de resinas de própolis verde para manufatura de ambas as amostras, que são classificadas pelo produtor como comum e verde. Ainda observando a Figura 16, é possível notar que ocorre um agrupamento das amostras do produtor 1 (que fornece a resina) com as amostras do produtor 2. Neste ponto é admissível observar que as amostras estão se agrupando segundo a região onde é produzida a resina de própolis.

5. CONCLUSÕES

Os resultados do estudo espectrofotométrico dos extratos alcoólicos de própolis verde e comum possibilitaram observar a absorção destas amostras na região do ultravioleta visível, e seus tratamentos quimiométricos permitiram obter uma segregação destas amostras por tipo (comum e verde). Esta segregação por tipo também foi notada para o tratamento dos dados espectrofluorimétricos quando utilizado comprimento de onda de excitação de 400 nm. A análise dos dados de fluorescência permitiu, ainda, a classificação das amostras de própolis por produtor para os quatro comprimentos de onda de excitação estudados. Dessa maneira, um grupo de calibração para tipo e produtor da própolis foi obtido utilizando técnicas espectrofluorimétricas. Com o intuito de se classificar os extratos de própolis vendidos no mercado, este grupo de calibração pode ser utilizado, contribuindo assim para o aumento da qualidade da própolis brasileira.

É importante ressaltar ainda a similaridade dos resultados encontrados para a análise multivariada dos dados obtidos com as técnicas espectrofotométricas e espectrofluorimétricas quando observada a classificação por tipo. Nas duas técnicas foi possível notar a presença de duas amostras classificadas pelos produtores como verde, mas que se agruparam às amostras comuns. Estas duas amostras, em ambas as técnicas, são as mesmas. Com estes resultados é possível inferir que alguns extratos de própolis classificados como verde são provavelmente manufaturados com resina de própolis comum.

Outro resultado interessante é que os grupos de amostras verdes para as duas técnicas são constituídos basicamente de amostras oriundas da região sudeste, região onde a espécie *Braccharis dracunculifolia* (responsável pela produção da própolis verde) é encontrada em grandes quantidades. Nestes grupos, são encontradas algumas amostras classificadas como comuns e que são produzida na região sudeste, o que indica que possivelmente elas também foram manufaturadas com resina de própolis verde.

O principal objetivo do presente trabalho foi a classificação do extrato de própolis por tipo (comum e verde). Esta classificação consiste em tentar agrupar amostras de composição química semelhante. Assim, esperava-se que as amostras de própolis verde e comum formassem grupos distintos. A formação do agrupamento para própolis verde foi obtida. Já para a própolis comum, apesar de terem se segregado das amostras verde, não foi observado agrupamento coeso entre elas, uma vez que a composição química deste tipo de própolis está relacionada com a alta biodiversidade vegetal existente no país.

A tentativa de se conseguir um grupo de calibração por tipo entre os resultados, adotando comprimentos de onda de excitação de 250, 300 e 350 nm, não foi bem sucedida. Isso provavelmente se deve à similaridade das substâncias presentes nos extratos de própolis comum e verde que sofrem processo de excitação para estes comprimentos de onda.

6. PERSPECTIVAS

Obtenção de um maior número de amostras de extrato alcoólico de própolis com o objetivo de obter um conjunto mais representativo possível das mesmas, facilitando dessa forma a observação de agrupamentos.

Preparo de extratos alcoólicos de própolis utilizando resinas da própolis que forem fornecidas por produtores, visando especificar agrupamentos formados pelos extratos de própolis adquiridos.

Utilização de diferentes condições experimentais com o intuito de verificar maiores informações a respeito de determinados agrupamentos que possam vir a ser formados.

Análise cromatográfica dos extratos para a identificação dos marcadores naturais da própolis, para garantir a informação correta sobre o tipo de própolis empregada em cada amostra utilizada na construção dos modelos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] - Pereira, F.M.; Lopes, M.T.R.; Camargo, R.C.R.; Vilela, S.L.O.; Sistema de produção – produção de mel; 3 julho de 2003; *Embrapa Meio Norte*; Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/#mel> Março 2010
- [2] – Marcucci, M. C.; Propriedades Biológicas e Terapêuticas dos Constituintes Químicos da Própolis; 1996; Campinas – SP.
- [3] - Ministério da Agricultura do Brasil, Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Própolis, Instrução Normativa nº 3 – Anexo VI, 19 de janeiro de 2001
- [4] – Marcucci, M. C.; Propolis: Chemical Composition, Biological Properties and Therapeutic Activity. *Apidologie*, V.26, n.2, p 83-99, 1995.
- [5] – Castro, M.L; Cury, J.A.; Rosale, P.L; Própolis do Sudeste e Nordeste do Brasil: Influência da Sazonalidade na Atividade Antibacteriana e Composição Fenólica. *Química Nova*, v. 30, n 7, p 1512-1216, 2007

- [6] – Junior, A. F.; Lopes, M. M. R.; Colombari, V.; Monteiro, A. C. M.; Vieira, E. P.; *Ciência Rural*, Santa Maria, v 36, n 1, p 294-297, **2006**.
- [7] – Pereira, A.S.; Seixas, F. R. M. S.; Neto, F. R. A.; *Própolis: 100 anos de Pesquisa e suas Perspectivas Futuras. Química Nova*, v.25, n.2, p 321-326, **2002**.
- [8] – Furnári, C. S.; Ferro, V. O.; *Análise de Própolis, Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26 (**2006**) 71
- [9] – Silva, M. B. S.; *Flavonóides com Capacidade Antioxidante; Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Química Aplicada*.
- [10] – Markham, K. R. *Techniques of Flavonoid Identification; Academic Press, London*, **1978**.
- [11] – Soares, S. E.; *Ácidos Fenólicos como Antioxidante, Revisão de Nutrição*, v 15(1), p 71-81, jan/abr **2002**.
- [12] – Bankova, V. S.; Castro, S. L.; Marcucci, M. C.; *Propolis: Recent Advances in Chemistry and Plant Origin Apidologi*, v 31, p 3-15, **2000**
- [13] – Kumazawa, S.; Yoneda, M.; Shibata, I.; Kanaeda, J.; Hamasaka, T.; Nakayama, T.; *Direct Evidence for the Plant Origin of Brazilian Propolis by the Observation of Honeybee Behavior and Phytochemical Analysis, Chem. pharm. Bull*, v 51, n 6, p 740-742, **2003**.
- [14] – Souza, J. P. B.; *Influência da Sazonalidade do Perfil Químico dos Óleos Essenciais e das Substâncias Fixas de *Braccharis Dracunculifolia* Cultivada, Utilizando-se Cromatografia em Fase Gasosa e Líquida. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Área de produtos naturais e sintéticos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, São Paulo*.
- [15] – Paulino N.; Abreu S. R. L.; Uto Y.; Koyama D.; Nagasawa H.; Hori H.; Dirsch V. M.; Scremin A.; Bretz W. A.; *Anti-inflammatory Effects of a Bioavailable Compound, Artepillin C, in Brazilian Propolis, European Journal of Pharmacology* 587 (**2008**) 293-301
- [16] – Barbeira, P. J. S., *Desenvolvimento de Métodos Analíticos para a Própolis Utilizando Técnicas Espectrométricas em Conjunto com Análise Multivariada. Universidade Federal de Minas Gerais, ICEX-DQ*, **2009**.
- [17] – Souza, J. P. B.; *Influência da Sazonalidade no Perfil Químico dos Óleos Essenciais e das Substâncias Fixas de *Braccharis dracunculifolia* Cultivada, Utilizando Cromatografia em Fase Gasosa e Líquida. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão preto, Dissertação de Mestrado*, **2007**.

- [18] – Nunes, L. C. C.; Galindo, A. B.; Deus, A. S. O de; Rufino, D. A.; Randau, K. P.; Xavier, H. S.; Cíto, A. M. G. L.; Neto, P. J. R.; Variabilidade Sazonal dos Constituintes da Própolis Vermelha e Bioatividade em *Artemia salina*. *Revista Brasileira de Farmacologia*, v 19, p 524-529, **2009**.
- [19] – Carvalho, C. A. L. de; Morete, A. C. de C. C.; Marchini, L. C.; Alves, R. M. de O.; Oliveira, P. C. F. de. Pollen Spectrun of Honey of “Uruçu” Bee, *Revista Brazil de Biol.*, v 61, p 63-67, **2000**.
- [20] – Park, Y. K.; Alencar, S. M.; Aguiar, C. L.; Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis, *J. Agricultural and Food Chem.* v 50, p 2502-2506, **2002**.
- [21] – Teixeira, E. W.; Negri, G.; Meira, R. M.S.A.; Message, D.; Salatino, A.; Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry, *eCAM*, v 2, n 1, p 85-92, **2005**.
- [22] – Leitão, J. M. M.; Técnicas Quimiométricas de Calibração Acopladas a Metodologias de Análise Espectrofotométricas de Formulações Farmacêuticas. Dissertação de doutorado, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, **2005**.
- [23] – Corgozinho, C. N. C.; Utilização de Técnicas Espectrofluorimétricas e Quimiométricas na Análise de Biodiesel e de suas Misturas com Óleo Diesel. Universidade Federal de Minas Gerais, ICEX-DQ, Belo Horizonte, **2009**.
- [24] – Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.; Princípios de Análise Instrumental, 6ª Edição, Porto Alegre, Editora Bookman, **2009**.
- [25] – Vo-Dinh, T.; Multicomponent Analysis by Synchronous Luminescence Spectrometry; *Analytical Chemistry*, v 50, n 3, p 396-401, March **1978**.
- [26] – Patra, D.; Mishra, A. K.; Recent Developments in Multi-Component Synchronous Fluorescence Scan Analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, v 21, n 12, p 787-797, **2002**.
- [27] – Chang, R.; Estudos Químicos da Própolis do Estado de Minas Gerais, Universidade Federal de Minas Gerais, ICEX - Departamento de Química, Belo Horizonte, **2005**.
- [28] – Sousa, J. P. B.; Bueno, P. C. P.; Gregório, L. E.; Filho, A. A. S.; Furtado, N. A. J. C.; Souza, M. L.; Bastos, J. K.; A Reliable Quantitative Method for the Analysis of Phenolic Compounds in Brazilian Propolis by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography, *Journal of Separation Science*, v 30, p 2656 – 2665, **2007**.
- [29] – Bruns, R. E.; Faigle, J. F. G.; Quimiometria, *Química Nova*, abril, p 84-98, **1985**.
- [30] – Mingote, S. A.; Análise de Dados Através de Métodos de Estatística Multivariada. Uma Abordagem Aplicada. Editora UFMG, 1ª reimpressão, Belo Horizonte, **2007**.
- [31] – Johnson, R. A.; Wichern, D. W.; Applied multivariate Statistical Analysis, Fourth Edition, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, **1998**.

- [32] – Aleme H. G.; Utilização de Curvas de Destilação e Métodos Quimiométricos na Previsão da Origem e na Determinação do Teor Alcoólico e Massa Específica da Gasolina Automotiva. Dissertação de Mestrado em Química, UFMG, Belo Horizonte, **2008**.
- [33] – Lyra W. S.; Cilva E. C.; Araújo M. C. U.; Fragos W. D.; Classificação Periódica: Um Exemplo Didático para Ensinar Análise de Componente Principal. Química Nova, Vol 33, n 7, 1594-1597, **2010**.
- [34] – Pavia D. L.; Lampman G. M.; Kriz G. S.; Vyvyan J. R.; Introdução a Espectroscopia, Tradução da 4ª edição norte-americana; DQ, Universidade de Western Washington, Bellingha. (**2010**)
- [35] - Fifield, F. W., Kealey, D., Principles and Practice of Analytical Chemistry, 5th edition, Blackwell Science Ltd, **2000**.
- [36] – Mabry T. J.; Markham K. R.; Thomas M. B.; The Systematic Identification of Flavonoids, New York, Heidelberg, Berlin, **1970**.