

## Desenvolvimento de modelos PLS para a determinação da atividade antioxidante de própolis utilizando NIR

### Development of PLS models for propolis antioxidant determination using NIR

#### RESUMO

A própolis é uma mistura complexa de resinas vegetais coletadas pelas abelhas a partir de troncos e secreções de árvores. Possui diversas aplicações na colmeia e várias propriedades benéficas ao organismo humano. Dentre as atividades biológicas que a própolis apresenta, destaca-se a atividade antioxidante, que usualmente é conferida pela classe dos compostos fenólicos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método para a determinação de compostos fenólicos totais de forma rápida, segura e com menor custo por meio da espectroscopia de infravermelho próximo combinada à análise estatística multivariada. Foram avaliados quatro tipos de própolis: *in natura*, macerada, extrato etanólico e extrato etanólico concentrado. Dentre os modelos construídos, aquele obtido a partir dos extratos etanólicos de própolis apresentou valores satisfatórios para as figuras de mérito: 0,96 para o  $R^2$  calibração; 0,82 para o  $R^2$  de validação cruzada; 0,90 para o  $R^2$  de validação externa; RMSEC de 2,59; RMSECV de 5,97; RMSEP de 5,35; razão RER de 32,56 e RPD de 3,18.

**PALAVRAS-CHAVE:** Quimiometria. Antioxidantes. Compostos fenólicos.

#### ABSTRACT

Propolis is a complex mixture of plant resins collected by bees from tree trunks and secretions. It has several applications in the hive and several sources beneficial to the human organism. Among the biological activities that a propolis presents, stands out an antioxidant activity, which is usually conferred by the class of phenolic compounds. The objective of this work was to develop a method for fast, safe and cost-effective determination of total phenolic compounds through near infrared spectroscopy combined with multivariate statistical analysis. Four types of propolis were obtained: fresh, macerated, ethanolic extract and concentrated ethanolic extract. Among the built models, the one found in the ethanolic extracts of propolis presented satisfactory values for the merit figures: 0,96 for  $R^2$  calibration; 0,82 for cross-validation  $R^2$ ; 0,90 for  $R^2$  external validation; RMSEC 2,59; RMSECV of 5,97; RMSEP of 5,35; RER ratio of 32,56 and RPD of 3,18.

**KEYWORDS:** Chemometrics. Antioxidants. Phenolic compounds.

**Leticia Alyne Matei**

[letyciam@alunos.utfpr.edu.br](mailto:letyciam@alunos.utfpr.edu.br)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Pato Branco, Pato Branco, Paraná, Brasil

**Tatiane Luiza Cadorn Oldoni**

[tatianeoldoni@utfpr.edu.br](mailto:tatianeoldoni@utfpr.edu.br)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Pato Branco, Pato Branco, Paraná, Brasil

**Cintia Boeira Batista Lafay**

[cintiabbatista@utfpr.edu.br](mailto:cintiabbatista@utfpr.edu.br)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Pato Branco, Pato Branco, Paraná, Brasil

**Matheus Augusto Calegari**

[matheus\\_augustocalegari@hotmail.com](mailto:matheus_augustocalegari@hotmail.com)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Pato Branco, Pato Branco, Paraná, Brasil

**Recebido:** 19 ago. 2019.

**Aprovado:** 01 out. 2019.

**Direito autorial:** Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



## INTRODUÇÃO

A própolis é um material resinoso produzido pelas abelhas, ela tem a função de proteger a colmeia contra invasores. A própolis apresenta propriedades que podem ser benéficas para o organismo humano, com potencial antimicrobiano, anti-inflamatório, antisséptico, antioxidante (OLDONI et al., 2015).

Atividade antioxidante é a capacidade de combater os radicais livres no organismo, que são os responsáveis pelo envelhecimento celular e desenvolvimento de algumas doenças como cânceres de colo, esôfago e mama. Usualmente a classe de compostos fenólicos é responsável pela atividade antioxidante da própolis pois, apresentam em sua estrutura química, radicais hidroxila e anéis aromáticos capazes de reagir e estabilizar os radicais do meio (KUMAZAWA et al., 2004).

O método mais empregado para a determinação de compostos fenólicos totais utiliza a espectrofotometria de absorção molecular na região do UV-VIS e faz uso do reagente de Folin-Ciocalteu (KUMAR, 2015), que consiste em uma solução de coloração amarela composta pela mistura de ácidos de molibdênio e tungstênio. Os compostos fenólicos podem ser determinados pela mudança de coloração, pois, na presença de agentes redutores, como os compostos fenólicos, o complexo muda sua coloração para azul (OLIVEIRA, 2011).

Atualmente, o emprego da Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR) unida a quimiometria e a utilização de modelos de calibração multivariada, vem sendo utilizada na identificação de compostos fenólicos na própolis (CALLEGARI, 2018) com maior rapidez, menor custo e pouco preparo de amostra, o que garante agilidade na obtenção dos resultados para os apicultores.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 37 amostras de própolis *in natura*, 39 amostras de própolis macerada, 41 amostras de extrato etanólico de própolis (EEP) e 45 amostras de extrato etanólico de própolis concentrado (EEPC), coletadas na região Sul e Sudeste do Brasil.

O EEP foi obtido seguindo a metodologia de OLDONI et al. (2015), onde 4 g de própolis macerada e 50 mL de etanol:água (80:20 v/v) foram levados a banho térmico a 45°C por 45 min. Após a concentração, foram preparados extratos padronizados na concentração de 1.000 mg L<sup>-1</sup>(EEPC).

Os espectros foram obtidos em espectrômetro de infravermelho próximo (NIR) com transformada de Fourier, BRUKER MPA. Para as amostras sólidas de própolis (*in natura* e macerada) foi utilizado o copo de quartzo com rotação, e as configurações empregadas foram de 64 acumulações com resolução de 32 cm<sup>-1</sup>. Para as amostras líquidas de própolis (EEP e EEPC) foi utilizado a cubeta de quartzo com bomba de sucção, e as configurações foram de 32 acumulações com resolução de 8 cm<sup>-1</sup>. A região analisada de todas as amostras foi entre 13.330 – 4.000 cm<sup>-1</sup> (CALEGARI, 2018).

A construção dos modelos foi baseada em dois softwares: ChemoStat<sup>®</sup>, para análise exploratória multivariada - HCA (Análise Hierárquica de Componentes) e PCA (Análise por Componentes Principais) (FERREIRA, 2016) e o MatLab<sup>®</sup> para desenvolvimento dos modelos PLS e análise das figuras de mérito.

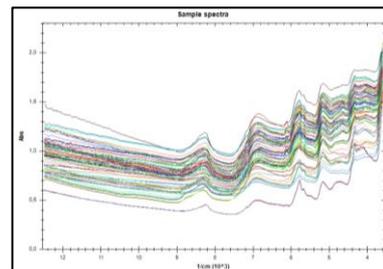
A definição dos pré tratamentos mais adequados para os modelos construídos foi baseada nas análises de PCA e HCA, inclusive identificando *outliers*. Na sequência, a finalização do modelo ocorreu no MatLab<sup>®</sup> através do PLS (Regressão por Quadrados Mínimos Parciais).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### PRÓPOLIS *IN NATURA*:

Os espectros obtidos no NIR para as própolis *in natura* foram submetidos à diferentes pré-processamentos e por meio do PCA e HCA foi possível definir que a segunda derivada juntamente com a normalização forneceu os melhores resultados (Figura 1).

Figura 1: Espectros das amostras de própolis *in natura*.

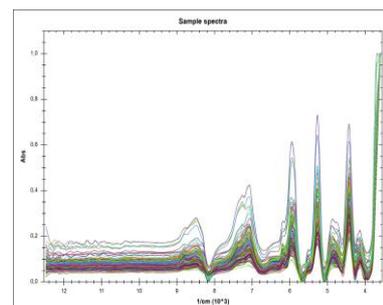


Fonte: Autor

### PRÓPOLIS MACERADA:

Os espectros das amostras de própolis macerada obtidos no NIR (Figura 2) foram analisados por diferentes pré-tratamentos e através da análise de HCA e PCA, foi possível definir que a segunda derivada juntamente com o pré-processamento de SNV, apresentou melhores resultados.

Figura 2: Espectros das amostras de própolis macerada.

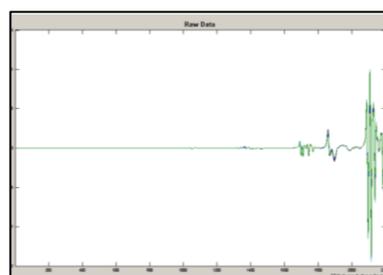


Fonte: Autor.

### EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS (EEP):

Os espectros das amostras de EEP obtidos no NIR (Figura 3) foram submetidos a diferentes pré tratamentos, através do HCA e PCA foi possível definir que o melhor pré tratamento foi de primeira derivada e *mean center*, apresentando valores satisfatórios. A primeira derivada corrige o deslocamento no eixo das ordenadas, onde após a correção o espectro resultante estará deslocado para o zero de absorbância.

Figura 3: Espectros das amostras de Extrato Etanólico de Própolis.

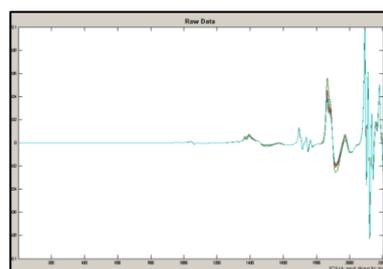


Fonte: Autor.

### EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS CONCENTRADO (EEPC):

Os espectros das amostras de EEPC, foram submetidos a diversos pré tratamentos, evidenciando pelo HCA e PCA, que o pré tratamento de primeira derivada e *mean center* juntamente com o pré-processamento de SNV, apresentou resultados satisfatórios, onde as figuras de mérito resultantes mostram que o modelo pode ser considerado confiável e robusto.

Figura 4: Espectros das amostras de Extrato Etanólico de Própolis Concentrado.



Fonte: Autor.

A análise exploratória HCA e PCA, foi empregada para a definição dos melhores pré tratamentos e para a identificação de *outliers* espectrais. O PLS é um método de calibração multivariada utilizado na quimiometria, onde é empregado geralmente em dados oriundos de espectroscopia, onde se obtém matrizes de dados mais complexas, sem sobreposição de bandas e apresentando resultados satisfatórios (FERREIRA, 2016). A análise das figuras de mérito é fundamental para a definição da qualidade do modelo construído, assim como a robustez e a validade

do mesmo. Na Tabela 1 é possível visualizar as figuras de mérito resultantes dos quatro modelos construídos.

Tabela 1 – Figuras de mérito dos modelos construídos para os quatro tipos de própolis.

	IN NATURA	MACERADA	EEP	EEPC
RMSEC	1,70	1,82	2,59	1,64
RMSECV	4,70	3,79	5,97	15,88
RMSEP	5,37	6,17	5,35	7,63
R <sup>2</sup> Calibração	0,96	0,97	0,96	0,98
R <sup>2</sup> Validação Cruzada	0,69	0,87	0,82	0,08
R <sup>2</sup> Validação Externa	0,75	0,82	0,90	0,62
RER	50,1	47,7	32,5	51,4
RPD	3,23	2,72	3,18	2,30

Fonte: Autor (2019).

Para definir a qualidade do modelo construído é preciso que determinados valores das figuras de mérito sejam alcançados, tais como: R<sup>2</sup> de determinação acima de 0,73 (EDFADL et al. 2010), valores de RPD acima de 2 (KUMAR, 2015), valores de RMSECV (KUMAR, 2015), RMSEP e RMSEC (CONZEN, 2006) os menores possíveis. A razão de intervalo de erro (RER) é considerada satisfatória para valores acima de 10, definindo assim que o modelo tem alta utilidade prática (WILLIAMS & SOBERING, 1996).

## CONCLUSÃO

Ao comparar os valores das figuras de mérito dos modelos das amostras sólidas, de própolis *in natura* e própolis macerada, os melhores valores obtidos foram para a própolis macerada, podendo ter relação com a melhor aquisição dos espectros. Por outro lado, ao comparar os valores das figuras de mérito dos modelos das amostras líquidas, EEP e EEPC, ficou evidente pelos valores encontrados, que o melhor modelo construído foi para as amostras de EEP, podendo atribuir esses valores satisfatórios ao fato da facilidade ao construir o modelo e com o menor número de amostras retiradas (*outliers*).

## REFERÊNCIAS

CALEGARI, M. A. **Espectroscopia Na Região Do Infravermelho Próximo (NIR) E Calibração Multivariada: Desenvolvimento De Modelos PLS Para A Determinação Da Atividade Antioxidante Em Amostras De Própolis.** (Dissertação de Mestrado em Química) Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2018.

CONZEN, J-P, Multivariate Calibration: A practical guide for developing methods in the quantitative analytical chemistry, **BRUKER**, 2006.

EDFADL, E.; REINBRECHT, C.; CLAUPEIN, W., Development of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) calibration model for estimation of oil content in a worldwide safflower germplasm collection. **International Journal of Plant Protection**, 2010.

FERREIRA M. M. C. **Quimiometria: Conceitos, aplicações e Métodos**. Editora UNICAMP, São Paulo, 2016.

KUMAR, S. Analytical Techniques for Natural Product Research. **CABI**, 2015.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329-339, 2004.

OLDONI, T. L. C.; OLIVEIRA, S. C.; ANDOLFATTO, S.; KARLING, M.; CALEGARI, M. A.; SADO, R. Y.; MAIA, F. M. C.; ALENCAR, S. M.; LIMA, V. A. Chemical Characterization and Optimization of the Extraction Process of Bioactive Compounds from Propolis Produced by Selected Bees. J. Braz. **Chem. Soc**, v. 26, p. 2054–2062, 2015.

OLIVEIRA, S. D. **Determinação da capacidade antirradicalar de produtos naturais utilizando-se a quimiluminescência do luminol e ensaios fotométricos com radicais estáveis**. 2011. 95 f. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

WILLIAMS, P.C.; SOBERING, D.C. Comparison of commercial Near Infrared transmittance and reflectance instruments for analysis of whole grains and seeds. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 1, p. 25-33, 1993.

### AGRADECIMENTOS

Agradeço a UTFPR, campus Pato Branco e a Central de Análises.