



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS**

MAÍRA MACIEL TOMAZZOLI

**PROSPECÇÃO DE FONTES BOTÂNICAS E AVALIAÇÃO DO
EFEITO DA SAZONALIDADE NO PERFIL QUÍMICO DA
PRÓPOLIS DE SÃO JOAQUIM (SANTA CATARINA)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Florianópolis
2015**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS

Maíra Maciel Tomazzoli

**PROSPECÇÃO DE FONTES BOTÂNICAS E AVALIAÇÃO DO
EFEITO DA SAZONALIDADE NO PERFIL QUÍMICO DA
PRÓPOLIS DE SÃO JOAQUIM (SANTA CATARINA)**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Maraschin.

Área de Concentração: Biotecnologia.

Linha de Pesquisa: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos.

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Tomazzoli, Maira Maciel

Prospecção de fontes botânicas e avaliação do efeito da sazonalidade no perfil químico da própolis de São Joaquim (Santa Catarina) / Maira Maciel Tomazzoli ; orientador, Marcelo Maraschin - Florianópolis, SC, 2015.

142 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, . Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

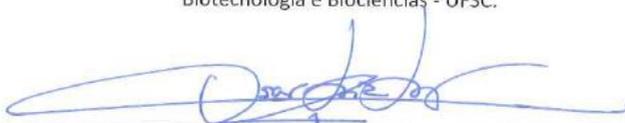
1. Biotecnologia e Biociências. 2. Própolis. 3. Sazonalidade. 4. UV-Visível. 5. Quimiometria. I. Maraschin, Marcelo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

“Prospecção de fontes botânicas e avaliação do efeito da sazonalidade no perfil químico da própolis de São Joaquim (Santa Catarina)”

Por

Maíra Maciel Tomazzoli

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (15/PPGBTC/2015) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Oscar Bruna Romero
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

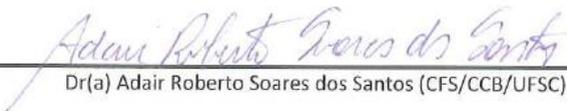
Banca examinadora:



Dr(a) Marcelo Maraschin (FIT/CCA/UFSC)
Orientador(a)



Dr(a) Francisco Carlos Deschamps (Ciências Biológicas/UNIVALI - Itajaí)



Dr(a) Adair Roberto Soares dos Santos (CFS/CCB/UFSC)



Dr(a) Fernanda Ramlov (Pós-doutorado Biologia Vegetal/CCB/UFSC)

Florianópolis, 14 de setembro de 2015.

Dedico este trabalho a minha amada
vó Cely Ramos Tomazzoli (*in
memoriam*), que me ensinou os
maiores valores da vida. Obrigada por
sempre acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua presença nas formas mais diversas e misteriosas em minha vida;

Aos meu amados pais, Edison e Maristela, obrigada por todo amor, carinho e apoio. Sem vocês toda essa caminhada não seria possível.

À toda a minha família, em especial ao meu irmão Thiago e a minha avó Cely.

Ao meu orientador Marcelo Maraschin, pelos ensinamentos acadêmicos, conselhos valorosos e pela primordial educação e respeito pelas pessoas.

Ao meu amado Leandro Specht, por todo apoio, companheirismo, conselhos e motivações. Obrigada pela parceria durante todas as etapas deste trabalho, desde as observações a campo (com direito a várias picadas de abelhas), viagens para São Joaquim, até os longos domingos de experimentos no laboratório. Esse trabalho não teria sido o mesmo sem você. Obrigada pelo seu carinho, amor e por me fazer cada dia mais feliz.

Ao Joel de Souza Rosa, Jaqueline Chechinel Rosa e família, que nos receberam de braços abertos em São Joaquim, permitindo a realização desse trabalho em sua propriedade. Obrigada por todo apoio durante as atividades a campo, pela preocupação, ensinamentos e gentileza. Sem vocês este trabalho não seria possível.

Aos amigos do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV/CCA), Amélia Zeggio, Aline Pereira, Rodolfo Moresco, Susane Lopes, Fernanda Ramlov, Eva Regina, Cláudia Bauer, Ana Voytena, Bianca Coelho, Simone Fanan, Regina Afonso, Manuel, Letícia, Heloísa, Roniele, Maria Beatriz, Débora, Fernanda Kokowicz, obrigada por todas as conversas, auxílios, estudos e companheirismo. Tenho muito orgulho de fazer parte desse grupo.

Ao Remi Dal Pai Neto, que durante a sua Iniciação Científica me auxiliou intensamente em diversos experimentos de laboratório. Muito obrigada pela fundamental ajuda, presteza e amizade.

Ao Rodolfo Moresco, pela amizade, horas de conversa, risos, por compartilhar angústias e vitórias no R e pelos ensinamentos científicos e de vida.

À Larissa Westphal, por todo auxílio no laboratório, muito obrigada.

Às minhas grandes amigas Karine Piacentini, Thais Heim, Teresa Severo, Elisa Aguiar, Carina Malinowsky, e Caroline Hawerroth, por todo apoio, amizade sincera e respeito. Minha vida fica mais colorida com vocês, sou muito abençoada em tê-las pertinho de mim.

Aos meus tesouros da agronomia Ana Heck, Ana Luiza Goulart, Bruno Melo, Francine da Boit e Maria Luiza Tomazi. Não importa o rumo que as nossas vidas tomaram, sempre levo um pouco de vocês comigo.

À Universidade do Minho, em especial ao professor Miguel Rocha e ao Christopher Costa, por todo apoio nas análises de bioinformática, pelos inúmeros e-mails trocados, pela presteza de suas respostas e ensinamentos.

Aos professores Rafael Trevisan e Angelo Schneider, por toda atenção e auxílio na identificação de taxonômica da espécie vegetal em estudo.

À Federação das Associações de Apicultores de Santa Catarina (FAASC), em especial ao Nésio.

A todos os meus amigos queridos, colegas de universidade e aos professores que contribuíram no meu crescimento, vocês foram importantíssimos na minha formação pessoal e profissional, muito obrigada.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências, pela oportunidade de crescimento e conhecimento científico.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro e bolsa de pesquisa.

Rir muito e com frequência; ganhar o respeito de pessoas inteligentes e o afeto das crianças; merecer a consideração de críticos honestos e suportar a traição de falsos amigos; apreciar a beleza, encontrar o melhor nos outros; deixar o mundo um pouco melhor, seja por uma saudável criança, um canteiro de jardim ou uma redimida condição social; saber que ao menos uma vida respirou mais fácil porque você viveu: isto é ter sucesso.
(Ralph Waldo Emerson)

RESUMO

A própolis é uma substância de composição complexa, originada de material resinoso de exsudados vegetais coletado por abelhas. Nas regiões tropicais, principalmente, a composição química da própolis é altamente variável, devido à extensa variedade de espécies vegetais doadoras de resina. Além disso, a sua composição química pode variar de acordo com a sazonalidade, altitude, tipo de coletor e disponibilidade de alimentos. A determinação da origem botânica, em conjunto com a origem geográfica é de extrema relevância no controle de qualidade e na padronização das amostras de própolis à aplicação terapêutica. Nesse contexto, este trabalho objetivou identificar a origem botânica e os efeitos da sazonalidade na composição química da própolis originária de São Joaquim (Santa Catarina). A observação a campo do comportamento forrageiro das abelhas *Apis mellifera* na coleta de resinas vegetais permitiu identificar a predileção desses insetos à espécie *Baccharis dracunculifolia*, coincidindo com a espécie botânica doadora de resina à produção da própolis verde de Minas Gerais. As análises cromatográficas (CCD e CLAE) e quimiométricas (PCA e HCA) possibilitaram identificar a espécie vegetal *B. dracunculifolia* como a principal fonte botânica doadora de resina à própolis originária do município de São Joaquim-SC, em especial durante o verão, sendo identificado o Artepillin C como o composto majoritário. Adicionalmente, verificou-se que outras espécies vegetais, não identificadas, também são doadoras de resina à produção de própolis na região em estudo, especialmente durante a primavera e inverno. As análises espectrofotométricas de varredura UV-Visível ($\lambda = 280-800$ nm) dos extratos hidroalcoólicos da própolis, aliadas às análises quimiométricas e de bioinformática (*Machine Learning*), permitiram identificar o efeito da sazonalidade no perfil químico da própolis de São Joaquim, sendo que a região espectral de absorção de compostos fenólicos ($\lambda = 280-400$ nm) foi a mais importante à discriminação amostral observada. O melhor algoritmo à análise preditiva de sazonalidade foi a árvore de decisão (rpart), apresentando 81,43% ($\lambda = 280-800$ nm) e 78,98% ($\lambda = 280-400$ nm) de precisão. Os teores de compostos fenólicos totais, flavonoides e bálsamo, apesar de distintos ao longo das estações, apresentaram-se dentro dos valores mínimos exigidos pelo MAPA. A própolis produzida em São Joaquim, especialmente na estação de verão, mostrou-se relevante à obtenção de matéria-prima com conteúdos superiores de Artepillin C.

Adicionalmente, este tipo de própolis apresentou elevada qualidade ao longo todas as estações estudadas, inferindo perspectivas promissoras a sua produção e comercialização na região.

Palavras-chave: Própolis. Sazonalidade. UV-visível. Quimiometria. Perfil Químicos. Origem Botânica.

ABSTRACT

Propolis is a chemically complex resinous substance collected by bees from plant exudates. In tropics, propolis shows a highly variable chemical composition because of the wide variety of resin donor plant species. Furthermore, propolis' chemical composition may vary due to the influence of the seasonality, altitude, collector type, and availability of food. The determination of the botanical and geographical origins of propolis is important for its quality control and standardization process for further therapeutic application. In this context, this study aimed at to identify the botanical origin and the seasonality effects in the chemical composition of propolis samples originated from the São Joaquim county (Santa Catarina state, southern Brazil). Field observations of *Apis mellifera* bees' behavior in the collection of plant resins detected a predilection of these insects for the plant species *Baccharis dracunculifolia*, coinciding with the botanical species donor of resin for the production of green propolis in Minas Gerais state (southeastern Brazil). The chromatographic (i.e., TLC and HPLC) and chemometric (PCA and HCA) analyzes made possible to associate the plant species *B. dracunculifolia* as the main botanical source of resin for propolis production in São Joaquim, SC, especially during the summer season, being Artepillin C® the major compound identified. Additionally, it was found that other plant species not taxonomically identified also furnish resins for the production of propolis in the studied geographical region, especially during the spring and winter. The UV-Visible scanning spectrophotometry analysis ($\lambda = 280-800 \text{ nm}$) of propolis hydroalcoholic extracts combined with chemometric analysis and bioinformatics tools (Machine Learning) allowed discriminating propolis samples according to their chemical profiles and seasons of harvest. The UV-Vis spectral absorption region of phenolic compounds ($\lambda = 280-400 \text{ nm}$) was the most decisive for the classification obtained. The best algorithm for the predictive analysis of the seasonality effect was the decision tree (rpart), with 81.43% ($\lambda = 280-800 \text{ nm}$ dataset) and 78.98% ($\lambda = 280-400 \text{ nm}$ dataset) of accuracy in the classification models. The total phenolic contents, flavonoids, and balsam, although distinct in samples as result of the seasoning, met the minimum amounts required by the ongoing legislation determined by MAPA. Propolis produced in São Joaquim, especially in the summer season, proved to be a raw material of superior quality due to their higher content Artepillin C. In addition, the studied propolis showed throughout the seasons to meet the parameters of high

quality according to the ongoing legislation inferring promising perspectives for its production and marketing.

Keywords: Propolis. Seasonality. UV-Visible. Chemometric. Chemical Profile. Botanical Origin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número de publicações científicas relativas à própolis a partir do início do século XX.	29
Figura 2 - Produção científica de própolis associada a patente e aos idiomas de publicação	30
Figura 3 - Ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico.....	35
Figura 4 - Ácidos fenólicos derivados do ácido benzóico.....	35
Figura 5 - Estruturas químicas básicas dos principais flavonoides	37
Figura 6 - Estrutura química dos principais flavonoides encontrados em própolis.....	38
Figura 7 - A- Detalhe das inflorescências de <i>Baccharis dracunculifolia</i> . B- <i>Apis mellifera</i> coletando resina em ápices vegetativos de <i>B. dracunculifolia</i>	44
Figura 8 - Abelha coletando resina vegetal da espécie <i>Baccharis dracunculifolia</i> , município de São Joaquim (28°27'4.6"S, 49°56'25.5"O, estado de Santa Catarina, Brasil).....	56
Figura 9 - Exsicata de <i>Baccharis dracunculifolia</i> depositada no herbário FLOR (Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC - número de depósito FLOR0057646).....	56
Figura 10 - Perfis espectrais de UV-vis ($\lambda = 280-800\text{nm}$) de extratos hidroalcóolicos (EtOH 70%, v/v) de amostras de própolis, coletadas ao longo das estações dos anos de 2014 (verão, outono, inverno e primavera) e 2015 (verão e outono) no município de São Joaquim – SC.	58
Figura 11 - Análise hierárquica de cluster (método UPGMA) de amostras (n = 59) de extratos hidroalcóolicos de própolis coletadas no outono, primavera, verão e inverno de 2014.	60
Figura 12 - Análise hierárquica de cluster (método UPGMA) de amostras (n= 73) de extratos hidroalcóolicos de própolis coletadas nos anos de 2014 (verão, outono, primavera e inverno) e 2015 (verão e outono).	60
Figura 13 - A - Escores de dispersão dos dados espectrais de UV-vis ($\lambda = 280-800\text{nm}$) nos eixos de componentes principais 1 e 2 de cinquenta e cinco amostras de própolis coletadas sazonalmente em 2014. B - Amplificação das amostras sobrepostas no PCA.....	61
Figura 14 - Escores de dispersão dos dados espectrais de UV-vis ($\lambda = 280-800\text{nm}$) nos eixos PC1 e PC2 de setenta e três amostras de própolis coletadas em 2014 (verão, outono, inverno e primavera) e 2015 (verão e outono).	62

Figura 15 - Análise hierárquica de cluster (método UPGMA) de dados espectrais da região de <i>fingerprint</i> de compostos fenólicos (UV-vis, $\lambda = 280-400\text{nm}$) de extratos hidroalcoólicos de própolis (n = 73) coletados em São Joaquim (SC), nos anos de 2014 e 2015.....	63
Figura 16 - Análise de componentes principais (PCA) e escores de dispersão dos dados espectrais da região de <i>fingerprint</i> de compostos fenólicos (UV-vis, $\lambda = 280-400\text{nm}$) de extratos hidroalcoólicos de própolis (n = 73) coletados em São Joaquim (SC), nos anos de 2014 e 2015.....	64
Figura 17 - Concentração de fenólicos totais e flavonoides (médias mg/g \pm desvio padrão, n=3) de extratos hidroalcoólicos de <i>B. dracunculifolia</i> determinadas por espectrofotometria UV-visível. Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste Tukey (P<0,05).....	73
Figura 18 - Perfis de composição química em cromatografia de camada delgada (CDD) de extratos hidroalcoólicos de própolis (coletadas no verão 2014, no município de São Joaquim (SC)).....	77
Figura 19 - Perfis cromatográficos (CLAE, 280nm) dos extratos hidroalcoólicos de própolis (EtOH 70%) coletada no verão/2014 em São Joaquim (SC). Picos detectados: 1 = n.i; 2= ácido p-cumárico; 4= n.i; 5= n.i; 6= quercetina; 7= n.i 9= n.i; 10= pinocembrina; 11= crisina; 12= n.i; 13= n.i; 14= n.i; 16= n.i; 17= Artepillin C. Números em comum representam os mesmos compostos. n.i. = compostos não identificados.....	79
Figura 20 - Cromatografia em Camada Delgada (CDD) dos extratos hidroalcoólicos de própolis (EtOH70%) coletada no verão/2015.....	81
Figura 21 - Perfis cromatográficos (CLAE, 280nm) dos extratos hidroalcoólicos de própolis (EtOH 70%) coletadas na região serrana catarinense (São Joaquim) no verão/2014. Picos detectados: 1 = n.i; 2= ácido p-cumárico; 4= n.i; 5= n.i; 6= quercetina; 7= n.i; 9= n.i; 10= pinocembrina; 11= crisina; 12= n.i; 13= n.i; 14= n.i; 16= n.i; 17= Artepillin C. Números em comum representam os mesmos compostos. n.i. = compostos não identificados.....	83
Figura 22 - Cromatografia em camada delgada (CDD) dos extratos hidroalcoólicos de própolis (EtOH70%), oriundos do município de São Joaquim (SC). A – Outono/2014 e B – Outono/2015.....	85

Figura 23 - Perfis cromatográficos (CLAE, 280nm) comparativos dos extratos hidroalcoólicos de própolis (EtOH 70%) serrana catarinense (município de São Joaquim). Amostras O3 e O5 coletadas no outono/2014. Amostras O6, O8 e O10 coletadas no outono/2015. Picos detectados: 1 = <i>n.i.</i> ; 2= ácido <i>p</i> -cumárico; 4= <i>n.i.</i> ; 5= <i>n.i.</i> ; 6= quercetina; 7= <i>n.i.</i> ; 8= <i>n.i.</i> ; 10= pinocembrina; 11= crisina; 12= <i>n.i.</i> ; 13= <i>n.i.</i> ; 14= <i>n.i.</i> ; 16= <i>n.i.</i> ; 17= Artepillin C. Números em comum representam os mesmos compostos. <i>n.i.</i> = compostos não identificados.	87
Figura 24 - Perfil cromatográfico em camada delgada (CDD) de extratos hidroalcoólicos de própolis (EtOH70%) invernal (2014), oriundas de São Joaquim (SC).	88
Figura 25 - Cromatografia em Camada Delgada (CDD) dos extratos hidroalcoólicos de própolis (EtOH70%) da estação de primavera (2014), oriundos do município de São Joaquim (SC).	89
Figura 26 - Perfis cromatográficos (CLAE, 280nm) de extratos hidroalcoólicos de própolis (EtOH 70%) coletados na região serrana catarinense (São Joaquim) no inverno/2014. Picos detectados: 1 = <i>n.i.</i> ; 2= ácido <i>p</i> -cumárico; 3 = <i>n.i.</i> ; 6= quercetina; 10= pinocembrina; 11= crisina; 12= <i>n.i.</i> ; 13= <i>n.i.</i> ; 14= <i>n.i.</i> ; 16= <i>n.i.</i> ; 17= Artepillin C. Números em comum representam os mesmos compostos. <i>n.i.</i> = compostos não identificados.	91
Figura 27 - Perfis cromatográficos (CLAE, 280nm) de extratos hidroalcoólicos de própolis (EtOH 70%) coletadas na primavera/2014 em São Joaquim (SC). Picos detectados: 1 = <i>n.i.</i> ; 2= ácido <i>p</i> -cumárico; 3 = <i>n.i.</i> ; 6= quercetina; 8= <i>n.i.</i> ; 10= pinocembrina; 11= crisina; 12= <i>n.i.</i> ; 13= <i>n.i.</i> ; 14= <i>n.i.</i> ; 16= <i>n.i.</i> ; 17= Artepillin C. Números em comum representam os mesmos compostos. <i>n.i.</i> = compostos não identificados.	92
Figura 28 - Cromatograma em camada delgada (CDD) de extratos hidroalcoólicos de própolis (EtOH70%). V36= verão/2015; V7, V6 e V25= verão/2014; I5= inverno/2014; O10= outono/2015; O5= outono/2014; P2= primavera/2014; BAC= <i>Baccharis dracunculifolia</i> ; VMG= própolis verde de Minas Gerais.	93
Figura 29 - Perfis cromatográficos (CLAE, 280nm) dos extratos hidroalcoólicos de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (EtOH 70%) coletada na primavera/2014, verão/2015 e outono/2015. Picos detectados: 1 = <i>n.i.</i> ; 2= ácido <i>p</i> -cumárico; 3= <i>n.i.</i> ; 4= <i>n.i.</i> ; 5= <i>n.i.</i> ; 6= quercetina; 7= <i>n.i.</i> ; 11= crisina; 13= <i>n.i.</i> ; 14= <i>n.i.</i> ; 15= <i>n.i.</i> ; 16= <i>n.i.</i> ; 17=Artepillin C. Números em comum representam os mesmos compostos. = compostos não identificados.	95

Figura 30 - Análise de componentes principais (PCA) e escores de dispersão de dados cromatográficos (CLAE) de extratos hidroalcoólicos de própolis (EtOH 70%) coletadas em 2014 (verão, outono, inverno e primavera) e 2015 (verão e outono).....	97
Figura 31 - Análise hierárquica de cluster (método UPGMA) de dados cromatográficos (CLAE) de extratos hidroalcoólicos de própolis (EtOH 70%) coletadas no verão/2014 e 2015, outono/2014 e 2015, inverno/2014 e primavera/2014.	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação de própolis brasileira de acordo com seus constituintes físico-químicos e origem geográfica.....	31
Tabela 2 - Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o seu esqueleto carbônico básico.....	34
Tabela 3 - Índices de precisão e <i>kappa</i> dos modelos preditivos dos algoritmos PLS-DA, knn e (rpart) para os dados espectrais (UV-vis, $\lambda= 280-400\eta\text{m}$) de extratos hidroalcoólicos de amostras de própolis catarinense (São Joaquim, 2014/2015).....	66
Tabela 4 - Comprimentos de onda (λ) mais representativos à análise preditiva de amostras de EHs de própolis catarinense (São Joaquim, 2014/2015).	67
Tabela 5 - Índices de precisão e <i>kappa</i> dos algoritmos PLS-DA, knn e árvore de decisão (rpart) como indutores de classificação de amostras de própolis catarinense (São Joaquim, 2014/2015), consoante aos dados espectrais de UV-vis ($\lambda= 280-400 \eta\text{m}$).	67
Tabela 6 - Concentração média* (mg/g e % \pm desvio padrão) de compostos fenólicos totais**, flavonoides*** e bálsamo em extrato hidroalcoólico de amostras de própolis (n = 73) oriundas do município de São Joaquim - SC.	71
Tabela 7 - Concentração média (mg/g) de fenólicos em extratos hidroalcoólicos de própolis (EtOH70%) de São Joaquim determinados por CLAE*.....	75
Tabela 8 - Concentração média (mg/g) de fenólicos em extratos de própolis (EtOH70%) de São Joaquim determinados por CLAE* (Continuação).....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL:	Microlitro.
ANOVA:	Análise de Variância.
CART:	Classification and Regression Trees.
CCD:	Cromatografia em Camada Delgada.
CLAE:	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
e.g.:	Por exemplo.
EBDA:	Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola.
EH:	Extrato Hidroalcoólico.
EMATER:	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural.
EPAGRI:	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina.
EtOH:	Etanol.
FAASC:	Federação das Associações de Apicultores de Santa Catarina.
FEMAP:	Federação Mineira de Apicultura.
FEMAP-MG:	Federação Mineira de Apicultura.
FR-CLAE-DAD:	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa Acoplada a Detector de Arranjo de Diodos.
FR-CCD:	Cromatografia em Camada Delgada em Fase Reversa.
GC/MS:	Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massa.
HCA:	Análise Hierárquica de Cluster.
i.e.:	Isto é.
IBGE:	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
IMA:	Instituto Mineiro Agropecuário.
INPI:	Instituto Nacional da Propriedade Industrial.
knn:	k-vizinhos mais próximos.
LC/MS:	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa.
LMBV:	Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal.
m/m:	Massa/massa.
m/v:	Massa/volume.
MAPA:	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
MDIC:	Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior.
MeOH:	Metanol.
mg:	Miligrama.
mL:	Mililitro.

°C:	Grau Celsius
PCA:	Análise de Componentes Principais.
PLS-DA:	Análise de Quadrados Mínimos Parciais Acoplada à Análise Discriminante.
Rf:	Fator de Retenção.
rpart:	Árvore de decisão.
SEAPA-MG:	Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais.
TR:	Tempo de Retenção.
UFSC:	Universidade Federal de Santa Catarina.
UNIPAMPA:	Universidade Federal do Pampa.
UV_vis:	Ultravioleta visível.
nm:	Nanômetro.
λ:	Lâmbida.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 PRÓPOLIS – DEFINIÇÃO, PROPRIEDADES E MERCADO.....	27
2.2 CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA PRÓPOLIS.....	30
2.2.1 Ácidos Fenólicos.....	32
2.2.2 Flavonoides.....	36
2.2.3 Atividades biológicas da própolis.....	39
2.3 ORIGEM BOTÂNICA.....	40
2.4 BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA.....	42
2.5MUNICÍPIO DE SÃO JOAQUIM – CARACTERÍSTICAS GERAIS E EDAFO-CLIMÁTICAS.....	44
3 OBJETIVO GERAL	47
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
4 MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1OBSERVAÇÃO A CAMPO DO COMPORTAMENTO FORRAGEIRO DE RESINAS VEGETAIS DE <i>APIS MELLIFERA</i>	49
4.2 COLETA E ACONDICIONAMENTO DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS.....	49
4.3PREPARAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS E RESINA VEGETAL.....	50
4.3 ESPECTROFOTOMETRIA DE UV-VISÍVEL.....	50
4.5 CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS.....	50
4.6 TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS.....	50
4.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE BÁLSAMO.....	51
4.8DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PRÓPOLIS E RESINAS VEGETAIS POR TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.....	51
4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E QUIMIOMÉTRICAS.....	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
5.1COMPORTAMENTO FORRAGEIRO DE <i>APIS MELLIFERA</i> E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE BOTÂNICA FONTE DE RESINA.....	55
5.2 ESPECTROFOTOMETRIA DE VARREDURA UV-VISÍVEL.....	57
5.3 MACHINE LEARNING (APRENDIZAGEM DE MÁQUINA) APLICADA À DADOS ESPECTRAIS DE UV-VISÍVEL.....	65

5.4 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONOÍDICOS E BÁLSAMO.....	69
5.5 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PRÓPOLIS E DE ÁPICES VEGETATIVOS DE <i>BACCHARIS</i> <i>DRACUNCULIFOLIA</i> VIA CCD E CLAE.....	73
7 CONCLUSÕES.....	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
APÊNDICES.....	117

1 INTRODUÇÃO

A dissertação de mestrado em foco “Prospecção de fontes botânicas e avaliação dos efeitos da sazonalidade no perfil químico da própolis de São Joaquim (Santa Catarina)” caracteriza-se por seu grau de aprofundamento em relação ao tema de investigação, em conexão com a tese de doutoramento em andamento no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, i.e., doutoranda Amélia Somensi Zeggio. Sua execução envolve a parceria e o apoio técnico-logístico da Federação das Associações dos Apicultores e Meliponicultores de Santa Catarina (FAASC) e da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI).

Estudos preliminares, vinculados à tese de doutorado supracitada, realizados no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), identificaram perfis químicos de própolis oriundos de dezoito municípios catarinenses, através do uso de técnicas cromatográficas (CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência e CCD - cromatografia em camada delgada). Entre as amostras estudadas, identificou-se um perfil químico peculiar àquelas originárias do município de São Joaquim – SC, similar ao observado em própolis verde de Minas Gerais, sugerindo uma fonte botânica comum à produção das própolis.

No presente trabalho, amostras de própolis foram coletadas ao longo das estações junto a quatro apiários da empresa (Apiário Real®), de propriedade de Joel de Souza Rosa e Jaqueline Chechinel Rosa, localizados no município serrano de São Joaquim (28°17'38"S, 49°55'54"O, Santa Catarina). Naqueles apiários também foram realizadas as observações do comportamento forrageiro de *Apis mellifera*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRÓPOLIS – DEFINIÇÃO, PROPRIEDADES E MERCADO

A própolis é uma substância de composição complexa, originada de material resinoso, gomoso ou balsâmico, coletado pelas abelhas de exsudados vegetais. Sua composição final é resultado da modificação química da(s) resina(s) por ação de enzimas salivares da abelha, bem como da adição de cera e pólen (OLIVEIRA; BASTOS, 1998). Fisicamente, suas características variam de acordo com inúmeros fatores. Algumas própolis possuem uma textura friável e dura, enquanto outras apresentam-se de forma elástica e pegajosa. Sua coloração também é bastante variável, passando pelo creme, amarelo, verde, marrom claro e escuro (GHISALBERTI, 1979; SALATINO, 2005).

As abelhas utilizam a própolis para evitar danos à colmeia, proteção contra insetos, microorganismos, luminosidade, oclusão de frestase na mumificação de insetos invasores (GHISALBERTI, 1979; MARCUCCI, 1996; SALATINO, 2005; COSTA, 2007). Além disso, a própolis atua como um antisséptico, evitando a infecção microbiana em larvas, favos de mel e alvéolos. As abelhas acrescentam a própolis em áreas onde os alvéolos serão anexados, com objetivo de criar superfícies lisas e livre de microorganismos. Adicionalmente, a mesma protege a colmeia contra correntes de ar, fornecendo um revestimento impermeável que mantém a umidade constante internamente (SEELEY; MORSEY, 1976). Embora a própolis seja considerada um produto de origem animal, a sua atividade biológica é atribuída a substâncias derivadas de plantas. A própolis é uma substância conhecida por sua heterogeneidade química, onde mais de 300 constituintes já foram identificados (MARCUCI, 1995; SALATINO et al. 2005).

O reconhecimento dos efeitos antissépticos da própolis é bastante antigo. Há relatos de Aristóteles recomendando o uso de própolis no tratamento de abscessos e feridas. Além disso, soldados romanos também utilizavam a própolis ao tratamento de ferimentos em guerras. Nos tempos modernos, a própolis ganhou reconhecimento na promoção da saúde na década de 1950 e 1960 na ex-União Soviética e países do leste europeu, como a Bulgária, Checoslováquia, e Polônia, no tratamento de otite externa, faringite, rinite crônica, amigdalites e asma, por exemplo, com resultados satisfatórios. A popularidade do uso da própolis nos países do Oeste e Norte europeu, América do Sul e Japão ocorreu

posteriormente, a partir de 1980. No Japão, o primeiro anúncio importante da própolis como um produto promissor terapêuticamente ocorreu em 1985 (30° Congresso Internacional de Apicultura, Nagoya). Até aquele momento a própolis era considerada pelos apicultores como um produto indesejado na colmeia, por não possuir valor de mercado e sua produção significava um declínio na produção de mel. Atualmente o Japão é o principal importador mundial de própolis, com predileção à própolis produzida no Brasil (MATSUNO, 1997a; SALATINO et al. 2005).

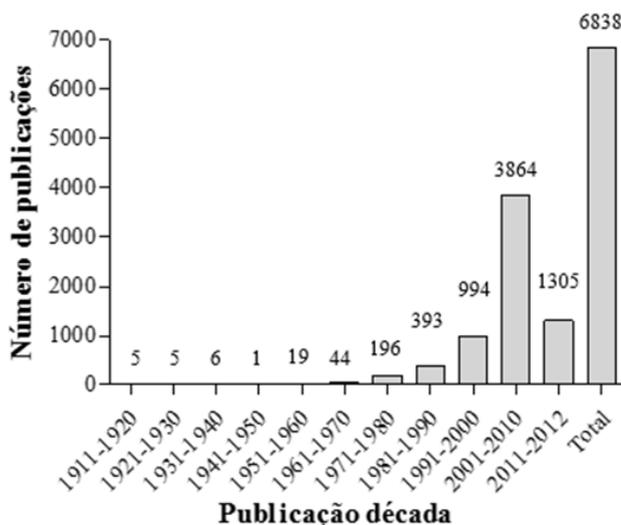
Estima-se que em 2012 o mercado brasileiro de própolis exportou 41.721 kg, correspondendo a um faturamento de cerca de 5 milhões de dólares. Em comparação a 2010, o valor de mercado da própolis aumentou em mais 50% em 2012, alcançando US\$129,47/kg (TORETI et al. 2013). Dados da EMATER-MG observaram que a produção nacional da própolis verde é de 40 t/ano, das quais 29 t provêm de Minas Gerais, com destino preferencial aos países asiáticos, em especial o Japão. Segundo o Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC), a própolis verde mineira movimentou, no período de janeiro a maio de 2012 cerca de US\$ 1,5 milhão em exportação. A Federação Mineira de Apicultura (FEMAP) relaciona o sucesso das exportações daquela matéria-prima ao esforço dos produtores mineiros para oferecer um produto de alta qualidade (SEAPA-MG, 2012). No Japão, atualmente a própolis brasileira é extensamente utilizada em alimentos e bebidas, com o objetivo de manter ou melhorar a saúde humana (AGA et al., 1994).

A própolis vermelha, comumente encontrada no nordeste, principalmente em Alagoas e na Bahia, também se destaca devido às suas peculiaridades. Esta própolis é produzida a partir da resina de uma espécie nativa dos mangues da região, o rabo-de-bugio (*Dalbergia ecastophyllum*), a qual confere características químicas e farmacológicas singulares a este tipo de própolis, permitindo-lhe atingir valores de comercialização no mercado externo de R\$ 450,0/kg (EBDA,2011).

O primeiro trabalho sobre própolis foi indexado no Chemical Abstract e publicado em 1903, enquanto a primeira patente envolvendo aquela matéria-prima foi descrita em 1904 (USA - *Composition for treating pins and piano strings*). Cento e nove anos após a publicação no Chemical Abstract, o número sobre publicações de própolis atingiu 6838 em periódicos científicos e 2884 em patentes (TORETI et al., 2013). A Figura 1 mostra o número de publicações sobre própolis ao longo das décadas, claramente revelando o crescente interesse global naquele produto apícola. Segundo Pereira et al., (2002), dois fatores

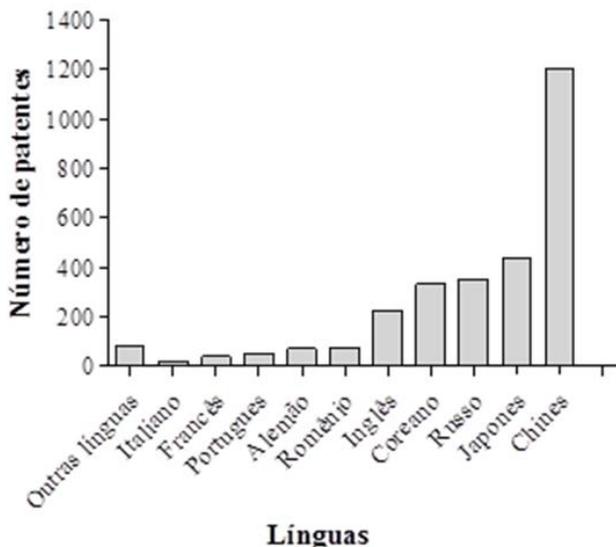
explicam o crescimento observado: *i)* a diversidade das propriedades biológicas e o *ii)* alto valor agregado. Na Figura 2 pode-se observar a produção científica da própolis associada a patentes e aos idiomas das publicações. Consta-se que a China, o Japão e a Rússia são os países que detêm a maior parte das patentes, um fato justificado pela alta produtividade de própolis na China e na Rússia (TORETI et al., 2013).

Figura 1 - Número de publicações científicas relativas à própolis a partir do início do século XX.



Fonte: Adaptado de Toreti et al. (2013)

Figura 2 - Produção científica de própolis associada a patente e aos idiomas de publicação



Fonte: Adaptado de Toreti et al. (2013)

2.2 CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA PRÓPOLIS

As própolis das diversas regiões do Brasil apresentam composição química bastante variada, dependendo da flora e clima, do local de produção, bem como das características genéticas de *A. mellifera* e do manejo apícola, entre outros fatores. Em decorrência disto, é expectável observar atividades biológicas variadas, como, antibacteriana, antifúngica e atividades antioxidantes, entre própolis de origens geográficas distintas (BANKOVA, 2005; TRUSHEVA et al., 2006). Nesse contexto, estudos recentes classificaram a própolis brasileira em 13 tipos, de acordo com sua origem geográfica e características físico-químicas (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação de própolis brasileira de acordo com seus constituintes físico-químicos e origem geográfica.

Grupos	Cor	Origem da própolis
Grupo 1 (RS5)	Amarelo	Sul
Grupo 2 (RS1)	Marrom	Sul
Grupo 3 (PR7)	Marrom Escuro	Sul
Grupo 4 (PR8)	Marrom	Sul
Grupo 5 (PR9)	Marrom Esverdeado	Sul
Grupo 6 (BA11)	Marrom Avermelhado	Nordeste
Grupo 7 (BA51)	Marrom Esverdeado	Nordeste
Grupo 8 (PE5)	Marrom Escuro	Nordeste
Grupo 9 (PE3)	Amarelo	Nordeste
Grupo 10 (CE3)	Amarelo Escuro	Nordeste
Grupo 11 (PI11)	Amarelo	Nordeste
Grupo 12 (SP12)	Verde ou Marrom Esverdeado	Sudeste
Grupo 13 (AL)	Vermelho	Nordeste

Fonte: Adaptado de Toreti et al. (2013)

Nas regiões tropicais, principalmente, a composição química da própolis é altamente variável, devido à extensa variedade de espécies vegetais doadoras de resina que crescem em torno dos apiários (KUJUMGIEV et al., 1999; KUMAZAWA et al., 2004). Além disso, a composição química da própolis pode variar de acordo com a sazonalidade, intensidade de radiação solar, altitude, tipo de coletor e disponibilidade de alimentos (CASTRO et al., 2007; TORETI et al., 2013).

Dentre os constituintes da própolis destacam-se a resina, ceras, bálsamos, óleos aromáticos, pólen e outras matérias orgânicas. A proporção destes varia de acordo com o local e momento da coleta (GHISALBERT et al., 1978). Os compostos identificados na própolis originam-se de três fontes: exsudato resinoso coletado pelas abelhas, substâncias originadas a partir do metabolismo das abelhas e por fim, materiais introduzidos durante a elaboração da própolis (GHISALBERT, 1979). Os principais metabólitos encontrados em própolis correspondem as classes de flavonoides, ácidos fenólicos e compostos aromáticos (BANSKOTA et al., 1998; XU et al., 2009).

Dentre as técnicas analíticas frequentemente utilizadas à investigação da composição química da própolis estão a espectrofotometria UV-Visível, a cromatografia líquida de alta

eficiência (CLAE) acoplada a detector(es) de arranjos de diodo (DAD) e/ou de massa. A espectrofotometria UV-Vis é empregada em uma série de métodos à análise química da própolis como, por exemplo, à quantificação de compostos fenólicos totais (reativo de Folin-Ciocalteu), de flavonoides (AlCl_3) e de determinação da atividade anti-radical 1, 1- difenil- 2-picrilhidrazil - DPPH (XU et al., 2009). Estes métodos espectrofotométricos geram resultados importantes à caracterização mais genérica da constituição química da própolis, subsidiando a classificação qualitativa desta matéria-prima, com amparo na legislação vigente.

Um número expressivo de estudos sobre a composição química de extratos etanólicos de própolis (e.g.) é encontrado na literatura. Em seu conjunto, estes relatos sugerem que a heterogeneidade de composição química entre amostras parece ser a regra, respeitando-se nas analogias os rigores pertinentes às análises químicas que subsidiam estas. A título de exemplo, em amostras de extratos hidroalcoólicos de própolis originária do Uruguai, foram isolados e identificados 33 compostos, sendo 18 flavonoides, 11 ácidos fenólicos e 4 ácidos carboxílicos aromáticos (KUMAZAWA et al., 2002). Em três tipos de própolis da Turquia foram identificados 48 compostos, tais como os ácidos 1, 3- benzenodicarboxílico e benzenoacético e os álcoois, benzenoetanol e crisofanol (SILICI & KUTLUCA, 2005). Estudos sobre as própolis europeia, chinesa e argentina demonstraram que estas caracterizavam-se pela presença de ácidos fenólicos e flavonoides, sendo os compostos mais abundantes a crisina (2%-4%), pinocembrina (2%-4%), pinobanksin acetato (1,6%-3%) e galangina (1%-2%). Por sua vez, amostras de própolis brasileiras caracterizam-se pela presença de artepillin C (3,5- diprenil-4- ácido hidroxicinâmico), ácidos cafeoilquínicos e alguns flavonoides (GARDANA et al., 2007). Por fim, em amostras de própolis originárias da China, Hungria, Bulgária, Uruguai e Argentina, a pinocembrina, crisina, galangina e a tectocrisina foram identificados como os compostos característicos (FUJIMOTO et al., 2001).

2.2.1 Ácidos Fenólicos

Os compostos fenólicos ou polifenóis constituem um dos grupos mais numerosos e amplamente distribuídos de produtos naturais em vegetais, sendo que mais de 8000 fenólicos são atualmente conhecidos, e entre estes, mais de 4000 flavonoides já foram identificados, os quais caracterizam-se por possuir um anel aromático com um ou mais

substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (SIMÕES et al., 2000 – Tabela 2). Alguns polifenóis são solúveis apenas em solventes orgânicos, outros são ácidos carboxílicos e glicosídeos solúveis em água; havendo ainda aqueles que são polímeros insolúveis. A distribuição e a variedade de polifenóis em plantas levaram a diferentes formas de categorizar estes compostos, sendo classificados pela sua biogênese, função biológica e estrutura química (BRAVO, 1998; TAIZ & ZEIGER, 2009; TSAO, 2010). Devido à ampla diversidade química, esta classe de compostos apresenta uma variedade de funções nos vegetais, entre elas a defesa contra herbívoros e patógenos, atrativa de polinizadores e dispersores em frutos, na proteção à radiação UV, ou mesmo como compostos inibidores de crescimento de plantas competidoras (TAIZ & ZEIGER, 2009). Em própolis, os compostos fenólicos mais encontrados são os ácidos fenólicos e os flavonoides (BANSKOTA et al., 1998).

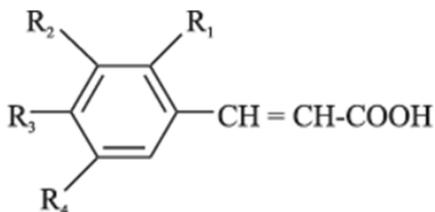
Os ácidos fenólicos são compostos que podem ser divididos em dois tipos principais: os derivados do ácido benzóico (C6-C1) e os derivados do ácido cinâmico (C6-C3). Ambos os compostos possuem propriedades químicas e analíticas semelhantes e ações biológicas em comum. Entre os derivados do ácido cinâmico (Figura 3) podemos citar os ácidos *p*-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico. Para os derivados do ácido benzóico (Figura 4) encontram-se os ácidos *p*-hidróxi-benzóico, salicílico, protocatéquico, vanílico, gentísico, gálicoesiríngico (SIMÕES et al., 2000).

Tabela 2- Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o seu esqueleto carbônico básico.

Classe de compostos fenólicos	Esqueleto básico
Fenóis simples, benzoquinonas	C6
Ácidos fenólicos	C6-C1
Acetofenonas e ácidos fenilacéticos	C6-C2
Fenilpropanóides: Ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas	C6-C3
Naftoquinonas	C6-C4
Xantonas	C6-C1-C6
Estilbenos, antraquinonas	C6-C2-C6
Flavonóides e isoflavonóides	C6-C3-C6
Lignananas	(C6-C3) ₂
Diflavonóides	(C6-C3-C6) ₂
Melaninas vegetais	(C6) _n
Ligninas	(C6-C3) _n
Taninos hidrolisáveis	(C6-C1) _n
Taninos condensados	(C6-C3-C6) _n

Fonte: Simões et al. (2000).

Figura 3- Ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico



Ácido cinâmico: $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$

Ácido o-cumárico: $R_1 = OH$; $R_2 = R_3 = R_4 = H$

Ácido m-cumárico: $R_1 = R_3 = R_4 = H$; $R_2 = OH$

Ácido p-cumárico: $R_1 = R_2 = R_4 = H$; $R_3 = OH$

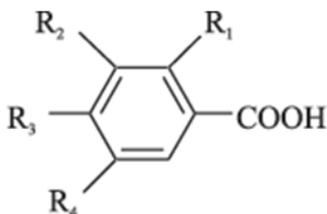
Ácido caféico: $R_1 = R_4 = H$; $R_2 = R_3 = OH$

Ácido ferúlico: $R_1 = R_4 = H$; $R_2 = OCH_3$; $R_3 = OH$

Ácido sinápico: $R_1 = H$; $R_2 = R_4 = OCH_3$; $R_3 = OH$

Fonte: Ramalho e Jorge (2006).

Figura 4- Ácidos fenólicos derivados do ácido benzóico



Ácido salicílico: $R_1 = OH$; $R_2 = R_3 = R_4 = H$

Ácido genticóico: $R_1 = R_4 = OH$; $R_2 = R_3 = H$

Ácido p-hidroxibenzoico: $R_1 = R_2 = R_4 = H$; $R_3 = OH$

Ácido protocatequínico: $R_1 = R_4 = H$; $R_2 = R_3 = OH$

Ácido vanílico: $R_1 = R_4 = H$; $R_2 = OCH_3$; $R_3 = OH$

Ácido gálico: $R_1 = H$; $R_2 = R_3 = R_4 = OH$

Ácido sirínico: $R_1 = H$; $R_2 = R_4 = OCH_3$; $R_3 = OH$

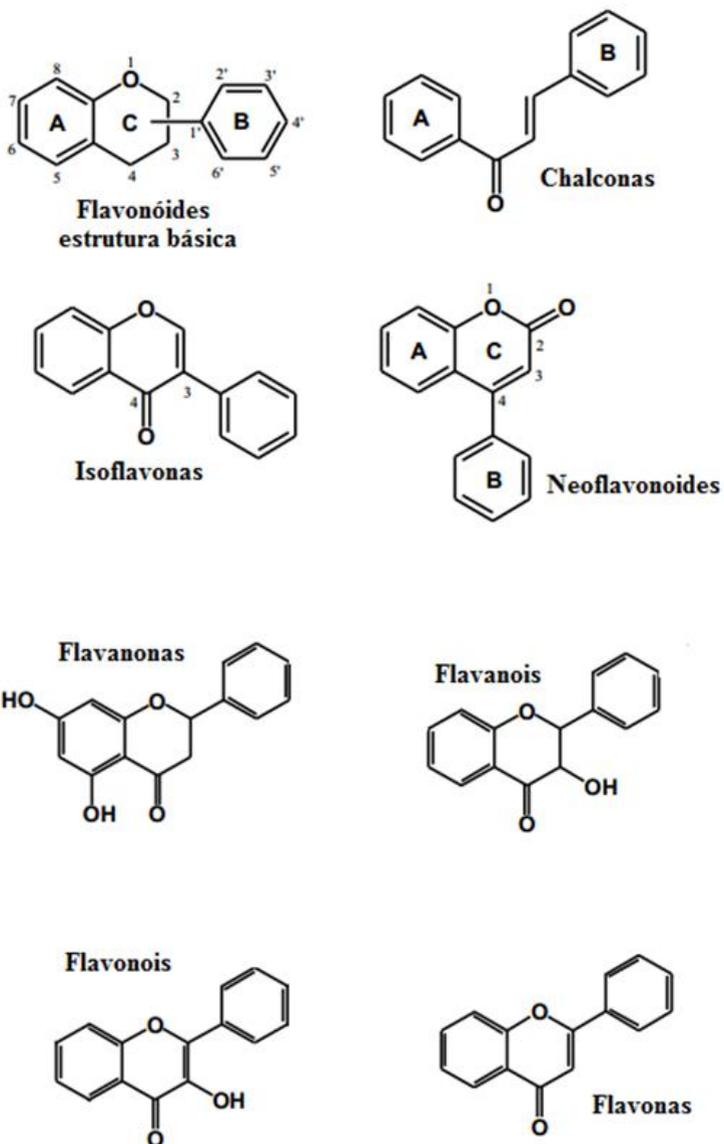
Fonte: Ramalho e Jorge (2006).

2.2.2 Flavonoides

Os flavonoides representam a maior classe de fenólicos nos vegetais e a maioria de seus representantes possuem um esqueleto básico contendo 15 átomos de carbono organizados em dois anéis aromáticos, conectados por uma ponte de 3 carbonos. Esta estrutura resulta de duas rotas biossintéticas, a saber: rota do ácido chiquímico, viafenilalanina, e a rota do ácido malônico (SIMÕES et al., 2000; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Nos compostos tricíclicos, os anéis aromáticos recebem a denominação de anéis A, B e C (Figura 5). Devido ao padrão de hidroxilação com substituições no anel C os flavonoides podem ainda dividir-se em subgrupos, como, flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis, isoflavonas e neoflavonoides. Embora a grande maioria dos flavonoides possuam o seu anel B ligado na posição C2 do anel C, alguns, flavonoides como as isoflavonas e neoflavonoides, possuem o anel B ligado na posição C3 e C4 do anel C, respectivamente. As chalconas, apesar de não possuírem o anel heterocíclico C, também são consideradas membros da classe de flavonoides (TSAO, 2010). Os flavonoides de origem natural apresentam-se quase sempre oxigenados e frequentemente conjugados com açúcares, denominando-se heterosídeos (SIMÕES et al., 2000). As estruturas básicas dos flavonoides ocorrem na forma de agliconas, entretanto, em plantas, a maioria destes metabólitos existe como glicosídeos. As atividades biológicas desses compostos dependem das características estruturais dos padrões de glicosilação (TSAO, 2010). Entretanto, no caso da própolis, a enzima 13-glicosidase, presente na saliva das abelhas, converte-os em suas respectivas agliconas (PARK et al., 1997).

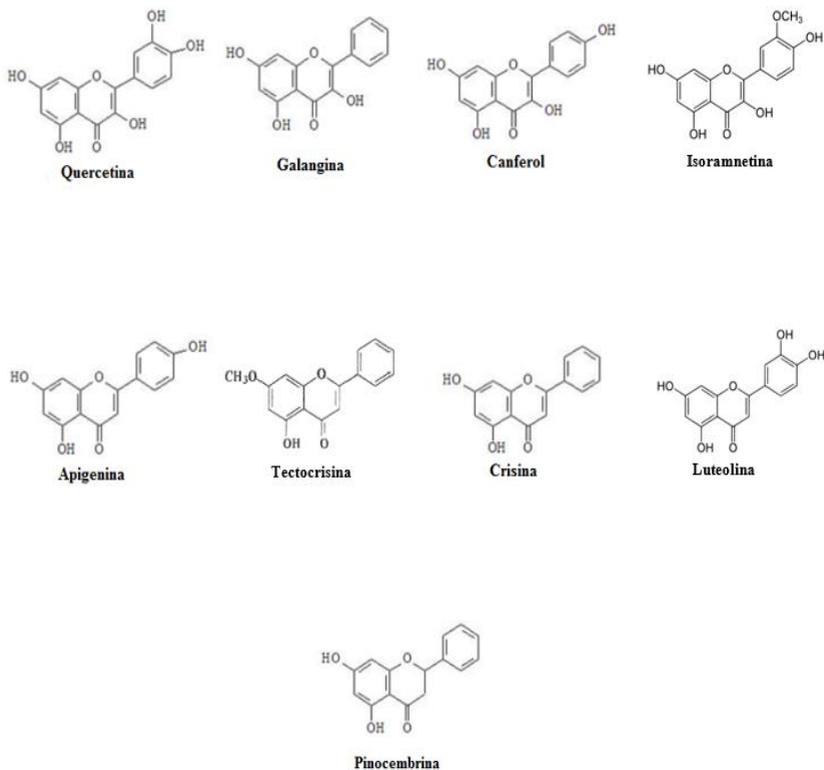
Figura 5- Estruturas químicas básicas dos principais flavonoides



Fonte: Adaptado de Tsao (2010).

Alguns flavonoides comumente identificados em amostras de própolis estão em destaque na Figura 6. Flavonóis: canferol, a quercetina, a isoramnetina e a galangina. Flavonas: apigenina, a luteolina, a crisina e a tectocrisina. Flavonona: pinocembrina. Dihidroflavonol: pinobancsina (MARCUCCI et al., 1998a).

Figura 6 - Estrutura química dos principais flavonoides encontrados em própolis.



Fonte: Adaptado de Marcucci (1998a) e Cabral (2008).

2.2.3 Atividades biológicas da própolis

Diversos estudos atribuindo inúmeras aplicações da própolis na medicina popular têm sido conduzidos em diversos países. O grande potencial terapêutico da própolis deriva de suas atividades biológicas, como, antibacteriana, antiviral, e antifúngica, cicatrizante, antitripanossomal (GHISALBERTI, 1979; KUJUMGIEV et al., 1999; LOTFY, 2006) antioxidante (MARCUCCI, 1995; KUMAZAWA, et al., 2004), antitumoral (KIMOTO et al., 1998), anti-inflamatória (SHI et al., 2012) e citotóxica (MATSUNO et al., 1997b).

Com relação à atividade antimicrobiana da própolis brasileira, estudos de Aga et al. (1994) isolaram três compostos antimicrobianos, os ácidos 3, 5- diprenil-4- hidroxicinâmico (Artepillin C) e 3-prenil-4-hidroxicinâmico e o 2, 2-dimetil-6-carboxietenil-2*H*-1-benzopirano. Suas respectivas atividades antimicrobianas foram testadas contra *Bacillus cereus*, *Enterobacter erogenous* e *Arthroderma benhamiae*. Os resultados revelaram uma atividade mais elevada do ácido 3,5- diprenil-4- hidroxicinâmico, inferindo que este é um dos principais compostos antimicrobianos da própolis brasileira. A análise da ação antimicrobiana de própolis oriundas de diferentes regiões do Brasil (Botucatu-SP, Mossoró-RN e Urubici-SC) revelou resultados distintos para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* em estudo de Júnior et al., (2006). A própolis de Botucatu mostrou-se mais eficiente contra *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Enterococcus* sp. Para *E. coli*, a própolis mais eficaz foi a de Urubici e para *Pseudomonas aeruginosa* a de Mossoró. Essas discrepâncias estão relacionadas ao local de produção da própolis, com conseqüente heterogeneidade na composição química da mesma. A atividade antiviral da própolis brasileira (região de fronteira com o Uruguai, sul do Brasil) também foi identificada, especificamente contra o HIV. Os compostos melliferone (novo triterpenoide), os ácidos morônico, anwuweizônico, betulônico, 4-hidroxi-3-metoxipropiofenona, 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeido, 3-(3, 4-dimetoxifenil)-2-propenal, 12-acetoxi tremetona, ácido 3 β -hidroxi 3-desoximorônico e ácido 3-O-(3', 3'dimetil succinil) morônico foram isolados e testados quanto à atividade anti-HIV em linfócitos H9. O ácido morônico apresentou atividade anti-HIV significativa: EC 50 <0,1 μ g/mL, TI >186 (ITO et al., 2001).

A composição química e as atividades antimicrobianas dos extratos etanólicos de própolis da Bulgária e do Brasil foram testadas *in*

vitro contra *Trypanosoma cruzi*, *Candida albicans*, *Sporothrix schenckii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*. Os resultados indicaram maior eficácia da própolis da Bulgária contra *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae*. Apesar de ambos os extratos apresentarem atividade antimicrobiana, detectou-se para a atividade antibacteriana uma correlação positiva com os teores de flavonoides presentes no extrato da própolis búlgara (SALOMÃO et al., 2004).

Estudos de Silici & Kutluca (2005) avaliaram a atividade antimicrobiana de própolis oriundas de três raças de *Apis mellifera* (*A. mellifera caucasica*, *A. mellifera carnica* e *A. mellifera anatolica*) contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Os extratos etanólicos da própolis identificaram uma alta atividade antibacteriana contra a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*, em contrapartida, uma baixa atividade contra bactérias gram-negativas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e contra a levedura *Candida albicans*. As amostras de própolis coletadas por *Apis mellifera caucasica* mostraram atividade antibacteriana superior ao coletado por *Apis mellifera anatolica* e *Apis mellifera carnica*.

2.3 ORIGEM BOTÂNICA

O conhecimento sobre as fontes vegetais utilizadas pelas abelhas para a produção de própolis é de extrema importância na padronização dessa biomassa. Através de ferramentas analíticas como as cromatografias em camada delgada (CCD), líquida de alta eficiência (CLAE) e gasosa (CG) é possível comparar os perfis químicos da própolis aqueles da(s) resina(s) vegetais, uma estratégia que possibilita inferir a(s) espécie(s) fonte(s) daquele biofluido. Adicionalmente, informações importantes sobre os conteúdos dos componentes químicos envolvidos podem ser obtidas (BANKOVA et al., 2000).

Na Europa, América do Norte e oeste da Ásia, a própolis é originária do exsudado do botão de álamo (*Populus* sp.) (MARKHAM et al., 1996; WOLLENWEBER; BUCHMANN, 1997). Estudos verificaram que na Bulgária diferentes espécies do gênero *Populus* eram doadoras de resina para a produção de própolis, como, *P. nigra*, *P. italica* e *P. tremula*. Já na Mongólia, a espécie *P. suaveolens* foi identificada como fonte botânica, enquanto na Hungria, os gêneros *Betula*, *Populus*, *Pinus*, *Prunus*, *Acacia* e a espécie *Aesculus hypocastane* são doadores de resina à produção da própolis. Na

Venezuela *Clusia minor* e nas Ilhas Havaianas *Plumeria acuminata* e *P. acutifolia* (MARCUCCI, 1995) são espécies identificadas como fontes de resina. Através de análises fitoquímicas, a espécie *Populus alba* também foi identificada como a principal fonte botânica da própolis do sul do Brasil, Argentina e Uruguai (PARK et al., 2002b).

Da mesma forma, estudos identificaram que a própolis produzida na Nova Zelândia apresentou como espécie de origem plantas de álamo introduzidas na região. Na Rússia, brotos de bétula (*Betula verrucosa*) foram reconhecidos como doadores de resina à produção de própolis pelas abelhas (MARKHAM et al., 1996; BANKOVA et al., 2000). De amostras de própolis da Venezuela foram isoladas benzofenonas polipreniladas, metabólitos da resina presente em flores de algumas espécies de *Clusia*. Com base em comparações de perfis cromatográficos, foi possível relacionar as espécies *Clusiagrande* e *Clusia menor* (Guttiferae) como as principais fontes de resinas à própolis (TOMAS-BARBERAN et al., 1993).

Alguns estudos encontrados na literatura fornecem longas listas de plantas que podem ser fontes de resinas à produção de própolis, em diversas partes do mundo. Entretanto, é importante salientar que essas listas são baseadas principalmente em observações do comportamento da abelha e somente em poucos casos existe uma análise complementar referente à comparação de perfis químicos própolis-materiais vegetais. Assim, tais listas devem ser consideradas como uma informação preliminar à identificação de fontes botânicas na produção de própolis, uma vez que em comparação com as coletas de pólen e de néctar, a coleta de resina pelas abelhas é uma atividade menos constante, podendo ocorrer em locais de difícil visualização, por exemplo, em topos de árvores (BANKOVA et al., 2000).

Tendo em vista a grande biodiversidade dos trópicos, comparativamente às zonas temperadas, a identificação da(s) espécie(s) doadora(s) de resina(s) à própolis apresenta alta complexidade, tipicamente proporcional ao número de espécies que habita os arredores das colméias, considerando-se os hábitos de vôos de *A. mellifera*. De modo geral, a observação do comportamento de abelhas na predileção de alguma espécie específica à coleta de resina não é fácil, principalmente por causa da pequena porcentagem de indivíduos que coletam própolis. Em regiões tropicais isso se torna ainda mais difícil, devido à maior diversidade de plantas (PARK et al., 2002b; TEIXEIRA et al., 2005), o que amplia ainda mais as possibilidades de matéria-prima para a fabricação da própolis. O mecanismo envolvido na comunicação

química das abelhas com o ambiente, para determinação de espécies fornecedores de resina para própolis, não está claramente definido, entretanto, relaciona-se basicamente com cheiro, cor e valor nutricional das plantas (FERRACINI et al., 1995).

Para verificar a possível origem botânica da própolis é importante realizar a análise da sua composição química comparativamente à(s) provável(is) fonte(s) vegetal(is) de resina(s). A determinação da origem botânica, em conjunto com a sua origem geográfica é de extrema relevância no controle de qualidade e na padronização das amostras de própolis, para que seja possível uma efetiva aplicação terapêutica com suporte em um racional produtivo de matéria-prima adequado (PARK et al., 2002a). A variabilidade química da própolis é, possivelmente, o maior problema ao desenvolvimento de medicamentos padronizados derivados desta biomassa, uma vez que sua composição é função de variáveis e da flocimáticas e da flora da região produtora, épocas de coleta e com o gênero e espécie das abelhas, por exemplo (NUNES et al., 2009).

2.4 BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA

Através da Portaria nº 1138 de 2011, o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) estabeleceu no mês de maio daquele ano a primeira denominação de origem no estado de Minas Gerais, no âmbito da produção de própolis verde. Ao todo, foram registrados cento e dois municípios mineiros, localizados em áreas de produção associadas à Federação Mineira de Apicultura (FEMAP-MG) que compõe a Região da Própolis Verde (BRASIL, 2011). Atualmente, para o âmbito nacional dos produtos agropecuários registrados pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), a própolis verde Minas Gerais encontra-se entre os “pedidos de indicação geográfica em andamento”, na modalidade Denominação de Origem: Vale da Própolis Verde de Minas Gerais (BRASIL, 2015).

Ao longo de uma série de comprovações científicas que caracterizaram o estado de Minas Gerais como produtor de própolis verde, foi possível relacionar a espécie vegetal *Baccharis dracunculifolia* como a principal fonte botânica daquele derivado apícola (OLIVEIRA; BASTOS, 1998; BASTOS et al., 2011). *B. dracunculifolia* (Figura 7A) é uma espécie da família Asteraceae, conhecida popularmente como vassourinha e alecrim-do-campo. Nativa do cerrado brasileiro (MENDONÇA et al., 2008), possui ocorrência natural nos campos rupestres da Serra do Cipó (GIULIETTI et al.,

1987). Adicionalmente, a espécie também é encontrada nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, estendendo-se à Argentina, Paraguai, Uruguai, e Bolívia, sendo comum em cerrados, pastagens abandonadas, áreas em processo de sucessão, adaptando-se facilmente a habitats pobres em nutrientes (OLIVEIRA; BASTOS, 1998; JULIÃO et al., 2005; SFORCIN et al., 2012). A planta é um arbusto lenhoso, podendo atingir até 4 metros de altura, perene, dióica e com reprodução por sementes. Suas folhas possuem tricomas tectores e glandulares, que além de atuarem como barreira ao ataque de insetos predadores, auxiliam na interação da espécie com as abelhas, para a coleta do seu material resinoso (OLIVEIRA; BASTOS, 1998; SFORCIN et al., 2012).

Do ponto de vista econômico, *B. dracunculifolia* possui grande importância devidos aos seus metabólitos secundários, que auxiliam na interação da espécie com as abelhas da espécie *Apis mellifera* na coleta do material resinoso (Figura 7B) à produção de própolis verde (NEGREIROS et al., 2009). A resina de *B. dracunculifolia* é caracterizada por apresentar fragmentos epidérmicos e tricomas glandulares que são transportados à colmeia para a elaboração da própolis. A cor verde daquela matéria-prima resulta do uso de tecidos foliares jovens contendo clorofila por parte das abelhas. Além disso, as folhas jovens apresentam pêlos secretórios com óleos voláteis e aromáticos, conferindo um aroma típico à própolis verde. Ao longo do ano, a própolis de uma mesma região pode apresentar diferentes colorações, variando entre o amarelo-claro e o vermelho escuro, dependendo da sua origem botânica e época do ano (SALATINO et al., 2005; SFORCIN et al., 2012).

No estado de Santa Catarina, *Baccharis dracunculifolia* teve a sua ocorrência catalogada nos municípios de Brusque, Caçador, Campo Erê, Campos Novos, Dionísio Cerqueira, Erval Velho, Florianópolis, Itajaí, Joaçaba, Lacerdópolis, Lages, Lauro Muller, Palhoça, Rio do Sul, Santa Cecília, Santo Amaro da Imperatriz, São Joaquim, Seara e Sombrio (BARROSO; BUENO, 2002). Entretanto, dados mais específicos quanto à dispersão da espécie dentro dos municípios catarinenses ainda são incipientes, permanecendo estas informações sob domínio dos produtores rurais. Por exemplo, em São Joaquim, produtores citam que a espécie *B. dracunculifolia* ocorre amplamente em todo o município, entretanto, nenhum trabalho de dispersão da espécie foi encontrado até o momento.

Figura 7 - A- Detalhe das inflorescências de *Baccharis dracunculifolia*. B- *Apis mellifera* coletando resina em ápices vegetativos de *B. dracunculifolia*.



2.5 MUNICÍPIO DE SÃO JOAQUIM – CARACTERÍSTICAS GERAIS E EDAFO-CLIMÁTICAS

O município de São Joaquim (latitude 28° 17' 38" sul; longitude 49° 55' 54" oeste), possui cerca de 24.812 habitantes e uma área total de 1.892,2 km². A cidade localiza-se à 230 km de Florianópolis, capital do estado de Santa Catarina, e a 1.360 metros acima do nível do mar (IBGE, 2015).

Segundo o Zoneamento Agroecológico de Santa Catarina da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), o município enquadra-se na Zona Agroecológica 4A – Campos de Lages. Esta zona agroecológica é classificada como de clima Cfb, segundo Köeppen, apresentando um clima temperado constantemente úmido, ausente de estação seca e com verão fresco. A temperatura média do mês mais quente é inferior a 22°C e a temperatura do mês mais frio apresenta-se entre -10 e 15 °C, com isoterma do mês mais frio entre 10 e 11,5 °C, sendo considerado um clima mesotérmico brando (THOMÉ et al., 1999).

A temperatura anual da Zona Agroecológica 4A varia entre 13,8 a 15,8 °C, estando a temperatura média máxima entre 19,4 a 22,3 °C e a mínima entre 9,2 a 10,8 °C. A umidade relativa do ar é de 80 a 83% e a precipitação pluviométrica anual varia de 1.360 a 1.600 mm, apresentando 123 a 140 dias de chuva/ano. O número de geadas anuais é de 20 a 29 e as horas de frio abaixo ou iguais a 7,2 °C podem variar de 642 a 847 horas acumuladas por ano. Por fim, a insolação total anual da região varia entre 1.824 a 2.083 horas (THOMÉ et al., 1999). Segundo

os dados meteorológicos disponibilizados pela Epagri/Ciram para o ano de 2014 no município de São Joaquim (Tabela suplementar 1), a média das temperaturas máxima e mínima foram de 19,63 °C e 10,5 °C, respectivamente. A umidade relativa também se manteve bem próxima ao descrito para a Zona Agroecológica 4A, i.e., 79,8%.

Na região, a vegetação primária predominante são os Campos com Capões, Florestas Ciliares e Bosques de Pinheiros, com maior frequência de ocorrência de espécies herbáceas, e.g., gramíneas, ciperáceas, leguminosas e compostas. Também se destaca a Floresta de Araucária na Bacia dos Rios Pelotas-Canoas, com submata onde predominam as espécies: canela-lajeana (*Ocotea pulchella*), canela-amarela (*Nectandra lanceolata*), canela-guaicá (*Ocotea puberula*), canela-fedida (*Nectandra grandiflora*), canela-fogo (*Cryptocarya aschersoniana*) e camboatá (*Matayba elaeagnoides*), entre outras (THOMÉ et al., 1999).

Estudos preliminares realizados no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) identificaram perfis químicos de própolis catarinense, através do uso de técnicas cromatográficas (CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência e CCD - cromatografia em camada delgada), associados à origem geográfica daquela biomassa. Entre as amostras estudadas, identificou-se um perfil químico característico do município de São Joaquim – SC, muito similar ao encontrado em própolis verde de Minas Gerais (ZEGGIO et al., dados não publicados), sugerindo que a fonte botânica de ambas as regiões pode se tratar da mesma espécie vegetal.

3 OBJETIVO GERAL

Identificar através de análises espectroscópicas, cromatográficas e de bioinformática, a origem botânica e os efeitos da sazonalidade na composição química da própolis originária de São Joaquim (Santa Catarina).

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar através da observação a campo o comportamento forrageiro de *A. mellifera* em relação às espécies fontes de resina utilizadas na produção de própolis;
- b) Avaliar o efeito da sazonalidade na composição química das amostras de própolis do município de São Joaquim, via técnicas de espectrofotometria de UV-Visível e análises de bioinformática;
- c) Determinar os teores de compostos fenólicos totais, flavonoides e bálsamo da própolis e das resinas vegetais;
- d) Determinar o perfil da composição química de amostras de própolis e resinas vegetais, através de técnicas cromatográficas e espectroscópicas, com ênfase em ácidos fenólicos e flavonoides;
- e) Analisar comparativamente os perfis químicos qualitativos das amostras de própolis e de resinas vegetais como estratégia à determinação da origem botânica da própolis da região serrana de Santa Catarina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBSERVAÇÃO A CAMPO DO COMPORTAMENTO FORRAGEIRO DE RESINAS VEGETAIS DE *APIS MELLIFERA*

Abelhas *Apis mellifera* de colmeias pertencentes ao apiário comercial (Apiário Real®) localizado no município serrano de São Joaquim (28°17'38"S, 49°55'54"O, Santa Catarina) foram monitoradas por observação visual quanto ao seu comportamento forrageiro à coleta de resinas vegetais nos meses de janeiro, maio, agosto e outubro de 2014, e janeiro e maio de 2015. As observações a campo foram realizadas adaptando-se a metodologia descrita por Teixeira et al., (2005), onde as abelhas foram monitoradas visualmente e fotografadas com câmera digital Sony/DSC W8000 Cyber-shot. O comportamento dos insetos foi observado desde a chegada na planta até a coleta das resinas no ápice vegetal. Adicionalmente, foram coletadas partes das plantas forrageadas à confecção de exsicatas que após a identificação botânica foram depositadas junto ao Herbário Flor da Universidade Federal de Santa Catarina. As coletas dos materiais vegetais ocorreram nos meses de setembro/2014, janeiro/2015 e maio/2015. As amostras de biomassas resiníferas de folhas, brotos e inflorescências foram acondicionadas imediatamente após a coleta em tubos falcom (50mL), transportadas sob refrigeração em nitrogênio líquido (-196°C) ao Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (Universidade Federal de Santa Catarina) e armazenadas em freezer (-80°C).

4.2 COLETA E ACONDICIONAMENTO DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS

Amostras de própolis (100 g) foram coletadas durante todas as estações do ano de 2014 e no verão e outono de 2015. No total, 73 amostras de própolis foram coletadas em quatro apiários pertencentes à empresa Apiário Real®. Para efeitos de padronização da amostragem de própolis, utilizou-se coletor de própolis com abertura central retangular, inserido sob a tampa da melgueira. As amostras de própolis foram retiradas do coletor e posteriormente acondicionadas em embalagens plásticas, sob refrigeração (4°C) para transporte. Em laboratório, as amostras foram armazenadas em freezer (-20°C).

4.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS E RESINA VEGETAL

Amostras de própolis (500mg) e resina vegetal (500mg) foram adicionadas a 25 ml de solução de etanol P.A a 70% (v/v), maceradas com auxílio de graal e pistilo e incubadas, no escuro, por 24h. O extrato hidroalcoólico (EH) foi filtrado em suporte de celulose, sob vácuo, completando-se o extrato para 25 mL, conforme metodologia previamente descrita (POPOVA et al., 2004). O EH de própolis foi utilizado para a determinação dos conteúdos de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, bálsamo e à obtenção dos espectros de varredura UV-Visível (280 - 800nm).

4.3 ESPECTROFOTOMETRIA DE UV-VISÍVEL

Os espectros de varredura nas regiões espectrais das radiações ultravioleta (200–380 nm) e visível (380-800 nm) dos EH da própolis e da resina vegetal foram obtidos através da adição de uma alíquota de 50µL dos extratos (EtOH 70%) a 3mL de EtOH (70%). As absorbâncias foram coletadas em espectrofotômetro Gold Spectrum lab 53 UV-Vis spectrophotometer (BEL photonics, Brasil) com resolução de 2nm /data point.

4.5 CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS

A determinação do conteúdo de fenólicos totais utilizou metodologia descrita por Popova et al. (2004), com adaptações. Uma alíquota de 40µl do EH de própolis foi adicionada a 3,16 mL de água destilada, 200µl do reativo de Follin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, MO, EUA) e 600 µl de solução de Na₂CO₃–(Vetec) a 20% (m/v). Após 2h de repouso, a solução foi transferida para cubeta de quartzo (3mL) e submetida à espectrofotometria UV-Vis (Gold Spectrum lab 53 UV-Vis spectrophotometer) para determinação do teor de fenólicos totais ($\lambda = 760$ nm). A quantificação foi realizada a partir da curva padrão de ácido gálico ($y = 0,0013x$, $r^2=0,99575$), nas concentrações de 100, 300, 500, 700, 1100, 1300, 1500, 2000 e 2500 µg/mL.

4.6 TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS

A quantificação de flavonoides totais nos EHs utilizou-se a metodologia de Popova *et al.* (2004), com adaptações. Uma alíquota de

200µl do EH foi adicionada a 4,7 mL de MeOH e 100µl de $AlCl_3$ a 5% em MeOH (m/v). Após 30 minutos de repouso, a solução foi transferida para cubeta de quartzo (3mL) e submetida à espectrofotometria UV-Vis (Gold Spectrum lab 53 UV-Vis spectrophotometer) para determinação das absorvâncias ($\lambda = 425 \text{ nm}$). Os dados de concentração de flavonoides totais foram expressos em equivalentes de quercetina, utilizando-se curva padrão daquele flavonol nas concentrações de 5, 25, 50, 100, 300, 400 e 500 µg de quercetina/ml ($y = 0,0028x$, $r^2 = 0,98772$).

4.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE BÁLSAMO

O teor de bálsamo dos EHs, ou extrato seco, foi determinado por método gravimétrico. Para tal, 5 mL de EH foram transferidos a cadinho de porcelana, seguido de pesagem e secagem em estufa (60°C) até massa constante. Em seguida, os cadinhos foram novamente pesados e o conteúdo do bálsamo atribuído à diferença de massas antes e após a evaporação do solvente. As medidas foram realizadas em triplicata e o conteúdo de bálsamos expresso em % de bálsamo (POPOVA et al., 2004).

4.8 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PRÓPOLIS E RESINAS VEGETAIS POR TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Amostras de EHs de própolis e de biomassa resinosa foram analisadas quanto aos seus perfis de composição química via técnicas cromatográficas, como, cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, acoplada a detector de arranjo de diodos (FR-CLAE-DAD) e cromatografia em camada delgada (CCD).

Numa primeira série de experimentos, os EHs de própolis foram analisados por CCD unidimensional, em suporte de sílica gel (Whatman®) sob fluorescência a 365 nm. Nesta fase, objetivou-se determinar o perfil de composição química das amostras de própolis coletadas ao longo das estações. Posteriormente, as amostras discrepantes em seus perfis cromatográficos foram analisadas por FR-CLAE-DAD. Num segundo momento, os perfis cromatográficos de amostras de própolis foram contrastados aqueles de *B. dracunculifolia* coletados nas cercanias das colmeias fontes das amostras de própolis em estudo. Tal abordagem visou detectar bandas comuns às amostras de

própolis e o do EH de *B. dracunculifolia*, permitindo vincular a origem botânica da própolis serrana catarinense àquela espécie.

Cromatografia em camada delgada (CCD): Amostras de EH das resinas de interesse à produção da própolis foram analisadas por CCD, conforme descrito previamente (DAUGSCH et al., 2008), com adaptações. Com o auxílio de um capilar de vidro, os EHs da própolis e das resinas vegetais foram aplicados em placa de sílica gel (9,0 cm x 6,0 cm) e eluídas em fase móvel de clorofórmio: metanol: ácido fórmico (85: 10: 5, v/v). Após a eluição dos compostos, a fase móvel foi evaporada e as bandas visualizadas em câmara escura utilizando radiações com comprimentos de onda de 254 e 360 nm. Posteriormente, as placas foram fotografadas com câmera digital Sony/DSC W8000 Cyber-shot. O cálculo do fator de retenção (Rf) foi realizado com auxílio do programa Image J (1.49), dividindo-se a distância percorrida pela amostra (cm), pela distância percorrida pelo solvente (cm).

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE): Amostras de EH (10 µl) de própolis e de resinas vegetais foram injetadas em cromatógrafo líquido (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000), equipado com uma coluna C₁₈ de fase reversa (BioBasic-18, 150mm x 4,6mm Ø, 5µm) termostatizada a 40°C e detector de arranjo de diodos. As amostras foram eluídas com fluxo 0,8 ml/min, utilizando um gradiente linear de ácido fórmico 0,5% (v/v) (solvente A) e metanol (solvente B), a saber: (0-10 min) 15% B, (10-55 min) aumento gradativo para 70% B e (55-60 min) redução de B a 15%. Para a quantificação dos compostos de interesse, uma curva padrão externa de artemisinina C/ml ($y = 0,2461x, r^2 = 1$) nas concentrações de 56,25; 112,5; 225; 450 e 900 µg/ml foi utilizada. Os resultados de conteúdos de metabólitos foram expressos em equivalentes de artemisinina C, considerando-se o valor médio de três injeções consecutivas/amostra. A identificação dos compostos fenólicos foi realizada através da comparação dos tempos de retenção das amostras de padrões autênticos de flavonoides e ácidos fenólicos, e.g., pinocembrina, quercetina, ácido *p*-cumárico, crisina e artemisinina C.

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E QUIMIOMÉTRICAS

Os dados espectrais de UV-Vis (280-800nm), de conteúdos de compostos fenólicos totais, flavonoides e bálsamo, de intensidade de bandas dos cromatogramas em camada delgada e de área de picos dos perfis de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram exportados para o Excel® no formato de arquivo.csv e submetidos à

análise estatística multivariada, via cálculo dos componentes principais (PCA) e análise hierárquica (HCA). Para isso, *scripts* foram escritos em linguagem R (v. 3.1.1), utilizando ferramentas definidas pelo nosso grupo de estudo e pelos pacotes Chemospec (HANSON, 2012) e HyperSpec (BELEITES, 2011). As análises de PCA e HCA podem ser úteis na extração de informações relevantes dos dados analisados, minimizando redundâncias e caracterizando a relação entre as variáveis estudadas. Os dados das variáveis acima referidas também foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido de teste Tukey ($P < 0,05$) com suporte dos programas GraphPad Prism 5 e GraphPad InStat 3.06. Todas as análises foram realizadas em triplicata ($n=3$).

Para as análises de *machine learning*, foram construídos modelos de classificação visando discriminar as amostras de própolis de acordo com a estação de coleta. Para isso, três algoritmos foram avaliados, como, análise de quadrados mínimos parciais discriminantes (PLS-DA), *k*-vizinhos mais próximos (knn) e árvores de decisão (rpart), utilizando-se uma validação cruzada repetida com 10 dobras e 10 repetições. Os *scripts* utilizados, os dados brutos e os resultados das análises quimiométricas estão disponíveis em <http://darwin.di.uminho.pt/metabolomics-package>, sob a forma de material suplementar. O relatório das análises geradas a partir dos *scripts* fornecidos pelo R Markdown encontra-se disponível nos apêndices deste trabalho.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 COMPORTAMENTO FORRAGEIRO DE *APIS MELLIFERA* E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE BOTÂNICA FONTE DE RESINA

A observação *in loco* do comportamento forrageiro das abelhas *Apis mellifera* foi identificado próximo ao primeiro apiário de coleta de própolis, a predileção das abelhas por uma determinada espécie vegetal, popularmente conhecida na região como Vassourinha. As abelhas coletavam as resinas de ápices vegetativos desta espécie, utilizando o primeiro par de patas para o corte do tecido vegetal, seguido da transferência do material para a estrutura presente em suas patas traseiras, denominada de corbícula (Figura 8).

Após a coleta do material vegetativo da espécie supracitada, contendo flores e frutos, uma amostra da planta foi herborizada e identificada taxonomicamente. Com o auxílio do professor Angelo Schneider, especialista no gênero *Baccharis* (Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA), a espécie em estudo foi identificada como *Baccharis dracunculifolia*, coincidindo com a espécie botânica doadora de resina à produção da própolis verde de Minas Gerais. Posteriormente, o material herborizado foi depositado no herbário FLOR (Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC) sob o número de coleta FLOR0057646 (Figura 9).

O comportamento das abelhas *Apis mellifera* foi semelhante ao relatado na literatura por Teixeira et al., (2005), onde um grande número desses insetos foi observado visitar plantas de *B. dracunculifolia*, fragmentando ápices vegetativos (broto, primórdios foliares e folhas jovens). Após a manipulação desses fragmentos, as abelhas moviam o tecido vegetal contendo a resina para as patas medianas e, em seguida, à corbícula. A predileção de *A. mellifera* por plantas de *B. dracunculifolia* na produção de própolis também foi observado em estudos anteriores, onde verificou-se que as abelhas coletavam as resinas presentes em brotos foliares, em folhas não expandidas, e raramente de folhas adultas daquela espécie (PARK et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005).

Figura 8 - Abelha coletando resina vegetal da espécie *Baccharis dracunculifolia*, município de São Joaquim (28°27'4.6"S, 49°56'25.5"O, estado de Santa Catarina, Brasil)



Figura 9 - Exsicata de *Baccharis dracunculifolia* depositada no herbário FLOR (Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC - número de depósito FLOR0057646).



5.2 ESPECTROFOTOMETRIA DE VARREDURA UV-VISÍVEL

Industrialmente, a própolis é comumente utilizada após o seu pré-processamento, que consiste na retirada de materiais inertes, insolúveis e cera. Em seguida, ocorre a extração dos compostos bioativos da biomassa com diferentes solventes. Esse processo de extração tem o objetivo de conservar os compostos bioativos da matéria-prima, em especial os compostos fenólicos. Na composição química da própolis é possível identificar a presença de ácidos fenólicos e flavonoides, bem como seus derivados hidroxilados, metoxilados e outros substituintes com elétrons não-ligantes, substâncias polinucleares e compostos com duplas ligações conjugadas. Todos esses fatores causam um deslocamento batocrômico para maiores comprimentos de onda nos espectros UV-Vis da própolis (PAGANOTTI et al., 2014).

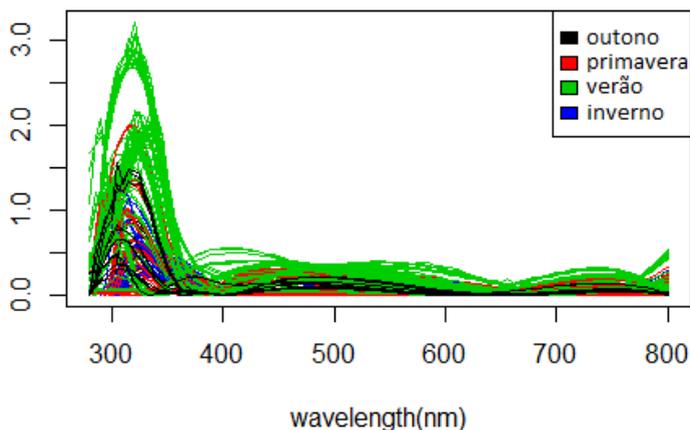
Os EHs de própolis em estudo apresentaram valores máximos de absorção na janela espectral de 280 a 400 nm (Figura 10) a qual, segundo Paganotti et al. (2014) engloba à região de absorção de uma classe de fenólicos denominados flavonoides, indicando que o sistema de extração EtOH: água (70:30, v/v) foi adequando à recuperação desses metabólitos da matriz em estudo. Além disso, a análise visual dos perfis espectrais das amostras revelou à similaridade destas, sugerindo uma composição química homogênea entre os extratos de própolis ao longo das estações do ano. Adicionalmente, é importante considerar que o espectro de absorção da radiação UV-Vis na região de 200 a 400 nm é utilizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) à avaliação da qualidade dos extratos de própolis comercializados no Brasil (MAPA, 2001).

Atualmente, o desenvolvimento de modelos descritivos de classificação, com base em técnicas analíticas rápidas, baratas e robustas, como a espectrofotometria UV-Vis é de grande interesse à indústria farmacêutica, uma vez que técnicas analíticas mais específicas (e.g., cromatografias líquida ou gasosa, acopladas ou não à espectrometria de massa), apresentam limitações importantes ao uso como ferramentas de rotina no controle de qualidade de matrizes complexas, como é o caso da própolis. Por outro lado, a grande quantidade de dados gerada em análises de matrizes complexas via espectrofotometria de varredura UV-Vis torna a adoção de ferramentas de bioinformática obrigatórias à extração de informações adicionais relevantes.

Tendo em vista este cenário, o conjunto de dados de absorbâncias (280-800 nm) das amostras dos EHs de própolis foram utilizados à

construção de modelos descritivos e de classificação, via cálculo dos componentes principais e análise hierárquica de cluster. Tal abordagem considerou como pressuposto básico a reconhecida variabilidade de composição química da própolis, derivada da ação de fatores ecológicos (a)bióticos, um aspecto importante em processos de controle de qualidade e de padronização de extratos daquela biomassa. Assim, modelos de classificação rápidos, de baixo custo e que permitam identificar eventuais (dis)similaridades de composição química de amostras de própolis coletadas ao longo das estações do ano são relevantes às indústrias afins aquela matéria-prima.

Figura 10 - Perfis espectrais de UV-vis ($\lambda = 280\text{-}800\text{nm}$) de extratos hidroalcoólicos (EtOH 70%, v/v) de amostras de própolis, coletadas ao longo das estações dos anos de 2014 (verão, outono, inverno e primavera) e 2015 (verão e outono) no município de São Joaquim – SC.



A análise hierárquica de cluster (HCA) foi aplicada aos dados espectrais de UV-Vis ($\lambda = 280\text{-}800\text{nm}$ - Figura 11) derivados das amostras coletadas ao longo das estações de 2014. As similaridades foram definidas com base na distância euclidiana utilizando o método de agrupamento UPGMA. Os objetos em cada cluster tendem a ser similares, porém diferem daqueles pertencentes a outros agrupamentos, não havendo qualquer informação prévia sobre a composição inicial do(s) grupo(s) (VICINI & SOUZA, 2005). Dois grupos principais de própolis foram detectados pela HCA às amostras coletadas nas estações de 2014. O primeiro grupo correspondeu às amostras coletadas

exclusivamente no verão, enquanto as demais amostras formaram o segundo grupo, revelando uma interessante separação derivada do efeito da sazonalidade.

Entretanto, a adição dos dados das amostras de 2015 (verão e outono – Figura 12) ao modelo de classificação inviabilizou a clara discriminação das amostras de verão em relação à demais, especialmente quando as amostras de outono foram computadas. Tal fato pode estar vinculado à extensa variabilidade química da biomassa de interesse, decorrente das complexas relações dos modelos biológicos em estudo, i.e., plantas-*A. mellifera*, as quais são reguladas por fatores (a)bióticos de intensidades variáveis ao longo das estações do ano. Por exemplo, é sabido que as rotas biossintéticas de metabólitos secundários vegetais são sensíveis à ação de fatores climáticos e às interações inseto-planta e patógeno-planta (BAUER; TITTEL, 1996), constituindo estratégias de defesa dos vegetais a estresses (a)bióticos (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Dentre as principais classes de metabólitos secundários de defesa vegetal encontram-se os terpenos, os compostos fenólicos e nitrogenados (TAIZ; ZEIGER, 2004; SHETTY et al., 2008) cujos perfis quali/quantitativos nos tecidos vegetais e seus biofluidos, e.g., seiva e resinas, respondem à sazonalidade.

Modelos de classificação de amostras baseados em técnicas de estatística multivariada tem sua robustez como função da amplitude da variação amostral presente no conjunto de dados em análise. Assim, especula-se que o modelo de classificação construído a partir dos dados espectrais das amostras de 2014 evidenciou sua fragilidade quando da inserção adicional de dados (i.e., amostras 2015), revelando a necessidade de ampliação do universo amostral da matriz complexa em estudo, para a obtenção de modelos classificatórios mais credíveis.

Figura 11 - Análise hierárquica de cluster (método UPGMA) de amostras (n = 59) de extratos hidroalcoólicos de própolis coletadas no outono, primavera, verão e inverno de 2014.

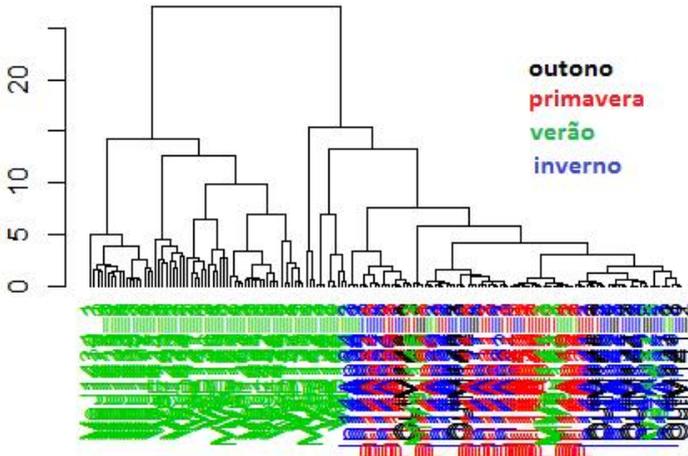
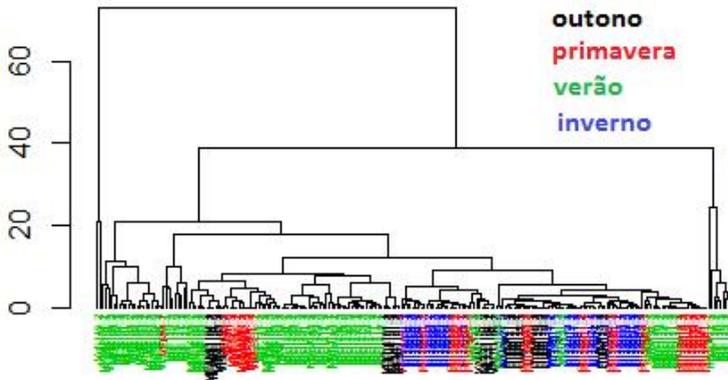


Figura 12- Análise hierárquica de cluster (método UPGMA) de amostras (n= 73) de extratos hidroalcoólicos de própolis coletadas nos anos de 2014 (verão, outono, primavera e inverno) e 2015 (verão e outono).



Numa segunda abordagem buscando uma melhor compreensão do efeito da época de colheita (sazonalidade) indicado pela HCA, o conjunto de dados espectrais de UV-Vis foi submetido ao cálculo de componentes principais (PCA). No modelo derivado das amostras coletadas em 2014 (verão, outono, inverno e primavera), os componentes principais (PC1) e (PC2) explicaram 68% e 13,9% da variabilidade amostral do conjunto de dados, i.e., 81,9% em sua totalidade (Figura 13A). A adição ao modelo de PC3 (12,4%) ampliou de forma importante a extração de informação latente, i.e., 94,2% do total de variabilidade amostral do conjunto de dados estudados. Os resultados de PCA confirmam a discriminação sazonal das amostras em dois grupos principais, como observado na análise hierárquica de agrupamentos. Na Figura 13 é possível observar que as amostras de outono, primavera e inverno se encontram sobrepostas e centradas no gráfico (ampliação na Figura 13B), diferentemente das amostras de verão, dispersas ao longo de todo o gráfico. Quando realizamos a análise de PCA com acréscimo das amostras de 2015 (verão e outono - Figura 14), os dois primeiros componentes PC1 (64,5%) e PC2 (17,6%) explicam 82,16% da variabilidade amostras dos dados, entretanto, assim como ocorreu na análise HCA, não é possível visualizar uma clara distinção entre as amostras provenientes da estação de verão com relação as demais estações, o que pode estar relacionado mais uma vez com a variabilidade química a que as plantas estão submetidas, por exemplo, fatores bióticos e abióticos.

Figura 13- A - Escores de dispersão dos dados espectrais de UV-vis ($\lambda = 280\text{-}800\text{nm}$) nos eixos de componentes principais 1 e 2 de cinquenta e cinco amostras de própolis coletadas sazonalmente em 2014. B - Amplificação das amostras sobrepostas no PCA.

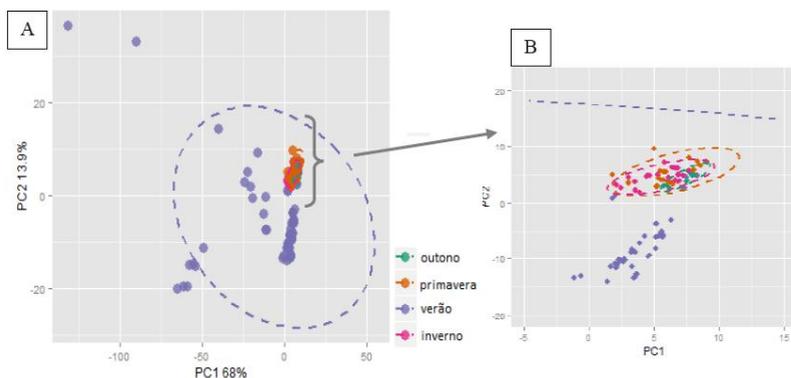
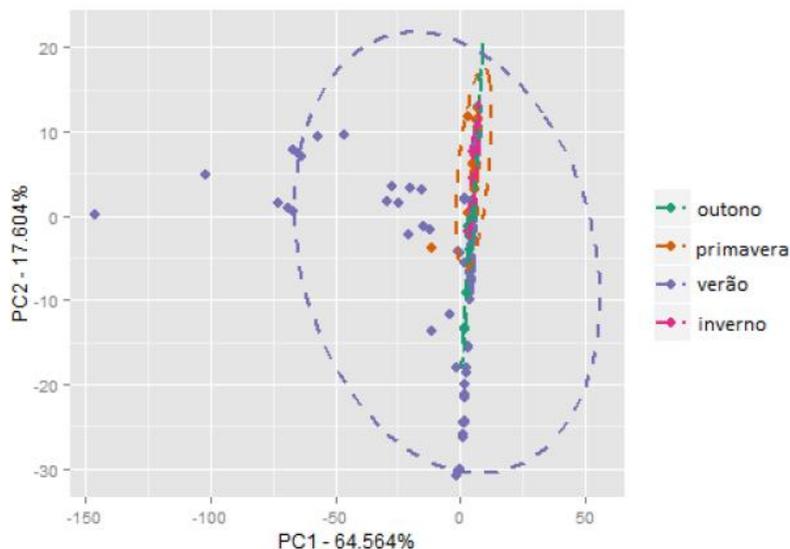


Figura 14 - Escores de dispersão dos dados espectrais de UV-vis ($\lambda = 280-800\text{nm}$) nos eixos PC1 e PC2 de setenta e três amostras de própolis coletadas em 2014 (verão, outono, inverno e primavera) e 2015 (verão e outono).



Os metabólitos bioativos mais representativos em amostras de própolis geralmente são os compostos fenólicos. Assim, uma segunda abordagem de análise foi aplicada aos dados espectrais de UV-Vis, objetivando investigar mais detalhadamente o efeito sazonal na composição fenólica dos EHs de própolis. Para tal, o cálculo dos componentes principais e a HCA foram efetuados considerando os dados espectrais da região de *fingerprint* de compostos fenólicos, i.e., 280-400nm. Os resultados demonstram que, comparativamente ao observado previamente na HCA para o conjunto total de absorvâncias ($\lambda = 280-800\text{nm}$ - Figura 12), o modelo hierárquico de agrupamentos derivado da região de *fingerprint* de compostos fenólicos ($\lambda = 280-400\text{nm}$ - Figura 15) permitiu discriminar as amostras em dois grupos, a saber: 1º grupo, amostras de verão; 2º grupo: amostras de inverno, primavera e outono. Na PCA (Figura 16) os dois primeiros componentes compreenderam 92,76% da variabilidade total do conjunto de dados, sugerindo que os compostos fenólicos correspondem uma importante classe de metabólitos na discriminação das amostras de própolis. Sendo

assim, tendo em vista a melhoria na discriminação das amostras de própolis nos resultados de PCA e HCA para UV-Vis na região de *fingerprint* dos compostos fenólicos, podemos especular que este modelo é mais credível à classificação dos extratos hidroalcoólicos de própolis em relação aquele aonde o conjunto total de absorbâncias, i.e., 280-800 nm, foi computado.

Figura 15 - Análise hierárquica de cluster (método UPGMA) de dados espectrais da região de *fingerprint* de compostos fenólicos (UV-vis, $\lambda = 280-400\text{nm}$) de extratos hidroalcoólicos de própolis (n = 73) coletados em São Joaquim (SC), nos anos de 2014 e 2015.

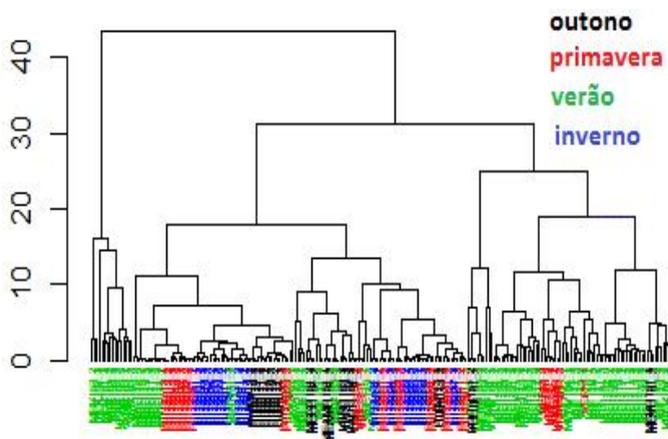
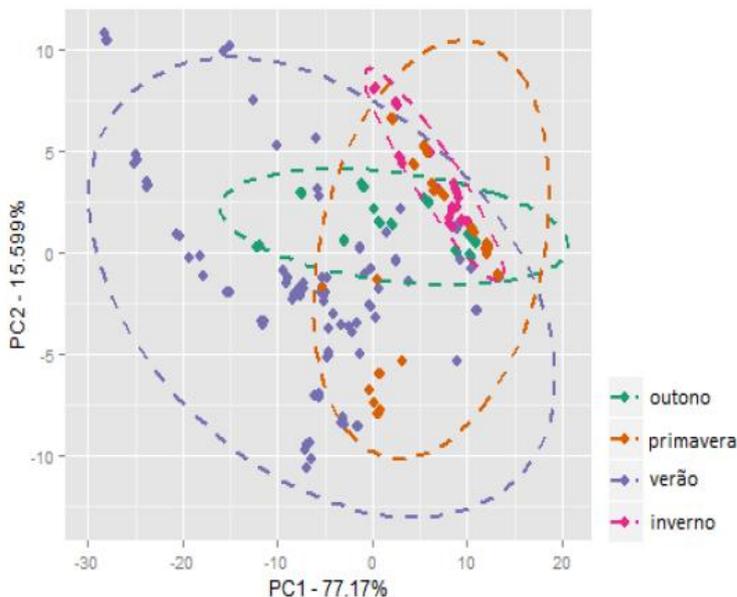


Figura 16 - Análise de componentes principais (PCA) e escores de dispersão dos dados espectrais da região de *fingerprint* de compostos fenólicos (UV-vis, $\lambda = 280-400\text{nm}$) de extratos hidroalcoólicos de própolis (n = 73) coletados em São Joaquim (SC), nos anos de 2014 e 2015.



Modelos experimentais de descrição e classificação utilizando dados de espectrofotometria UV-Vis para determinadas regiões de *fingerprint* molecular têm sido descritos com o objetivo de melhor explicar a variabilidade amostral de um determinado conjunto de dados. Esta abordagem foi utilizada em estudo de classificação de genótipos de *Manihot esculenta* (MORESCO et al., 2015), que foram identificados apresentar atividade pró-vitamina A em biomassa radicular contendo β -caroteno, uma estratégia à redução da hipovitaminose A em países subdesenvolvidos, por exemplo. Os autores verificaram que no modelo analítico aplicando a PCA ao conjunto de dados espectrais à região de *fingerprint* de carotenoides ($\lambda = 400-500\text{ nm}$) os genótipos de mandioca foram agrupados de acordo com os seus teores de carotenoides e distribuídos de acordo com a cor de polpa de cada raiz.

Os resultados de estudos espectrofotométricos para o conteúdo de capsaicina em pimenta Chiltepin como uma possível alternativa para

análises de CLAE mostrou-se extremamente eficiente. Através da comparação de resultados das análises de UV-Vis ($\lambda = 215-300\text{nm}$) e CLAE-DAD verificou-se que o método espectrofotométrico pode ser utilizando rotineiramente à determinação dos conteúdos totais de capsaicina e controle de qualidade na análise agrícola e farmacêutica (GONZÁLEZ-ZAMORA et al., 2015).

Nesse contexto, pode-se notar a importância de identificar o efeito da sazonalidade no perfil químico de amostras de própolis, resultando em sua qualidade como fonte de importante metabólitos secundários. Apesar da análise de espectrofotometria de varredura UV-Vis ser uma técnica analítica rápida, barata e confiável, a quantidade de dados gerados usualmente impossibilita a seleção das amostras via análise visual dos perfis espectrais, sendo necessária a utilização de ferramentas de bioinformática para otimizar a extração de informações relevantes, permitindo melhor classificação dos objetos de interesse.

5.3 MACHINE LEARNING (APRENDIZAGEM DE MÁQUINA) APLICADA À DADOS ESPECTRAIS DE UV-VISÍVEL

As técnicas de *data mining* (mineração de dados), mais especificamente a machine learning (aprendizado de máquina), têm se popularizado de forma significativa nos últimos anos, incorporando sistemas de informação para apoio à decisão, previsão de eventos e análise de dados (MORAIS et al., 2012). Neste contexto, algoritmos indutores de classificação e predição de objetos, e.g., quadrados mínimos parciais discriminantes (PLS-DA), k-vizinhos mais próximos (knn) e árvores de decisão (rpart) foram aplicados ao conjunto de dados espectrais UV-Vis dos EHs das amostras de própolis em estudo. Como podemos observar na Tabela 3, os modelos PLS-DA, knn e rpart apresentaram valores de precisão de 67,50%, 77,50% e 81,43%, respectivamente, na análise preditiva de sazonalidade. O índice *kappa* de cada algoritmo, indicador do grau de concordância entre dois classificadores assumindo-se a aleatoriedade desta, também é mostrado na Tabela 3.

Tabela 3- Índices de precisão e *kappa* dos modelos preditivos dos algoritmos PLS-DA, knn e (rpart) para os dados espectrais (UV-vis, $\lambda=280-400\text{nm}$) de extratos hidroalcoólicos de amostras de própolis catarinense (São Joaquim, 2014/2015)

	Precisão	Kappa	PrecisãoSD	KappaSD
pls	0.67497	0.505735	0.09191405	0.134006
knn	0.774857	0.6698484	0.07873972	0.11435
rpart	0.814349	0.7246686	0.08598415	0.125946

Além disso, a análise de importância de variável revelou que os comprimentos de onda mais representativos aos modelos de predição pertencem à janela espectral dos compostos fenólicos (e.g, $\lambda = 284-288\text{nm}$; $342-343\text{nm}$; e $364-366\text{nm}$ - Tabela 4). Assim, a análise de *machine learning* foi repetida considerando apenas o conjunto de dados da região espectral de compostos fenólicos ($\lambda = 280-400\text{nm}$). Diferentemente do observado nos modelos prévios de classificação via PCA e HCA, o desempenho preditivo dos modelos derivados do conjunto de dados da região de *fingerprint* de compostos fenólicos (Tabela 5), foi ligeiramente inferior aquele resultante do perfil espectral total (Tabela 3). Contudo, tomados conjuntamente, os modelos preditivos e de classificação sugerem que apenas os sinais de absorvância na região de compostos fenólicos parecem ser suficientes à discriminação/prognóstico de amostras de própolis frente a sazonalidade.

Tabela 4- Comprimentos de onda (λ) mais representativos à análise preditiva de amostras de EHs de própolis catarinense (São Joaquim, 2014/2015).

λ	Geral	Significância
286	100	100
287	100	100
284	81.175	81.175
285	81.175	81.175
288	81.175	81.175
365	44.696	44.696
364	37.225	37.225
366	37.225	37.225
342	29.194	29.194
343	29.194	29.194

Tabela 5- Índices de precisão e *kappa* dos algoritmos PLS-DA, *knn* e árvore de decisão (*rpart*) como indutores de classificação de amostras de própolis catarinense (São Joaquim, 2014/2015), consoante aos dados espectrais de UV-vis ($\lambda= 280-400$ nm).

	Precisão	Kappa	PrecisãoSD	KappaSD
pls	0.6669141	0.4775043	0.06197739	0.09703098
knn	0.7425768	0.6153978	0.08084770	0.11902507
rpart	0.7898912	0.6899306	0.08383243	0.12181896

Nesse contexto, o melhor algoritmo à análise preditiva de sazonalidade à própolis de São Joaquim foi a árvore de decisão (*rpart*), apresentando 81,43% e 78,98% de precisão para os dados de UV-Vis na região espectral de $\lambda= 280-800$ nm e na região de *fingerprint* de compostos fenólicos $\lambda= 280-400$ nm, respectivamente.

O algoritmo *rpart* está relacionado aos algoritmos indutores de árvores de classificação, que implementa a metodologia CART (do inglês, Classification and Regression Trees - BREIMAN, et al. 1984), o

qual permite a incorporação de custos distintos de erros de classificação nas classes, possibilitando o aumento da sensibilidade do classificador às classes minoritárias. As árvores são binárias e o seu crescimento é limitado a 31 (trinta e um) níveis de profundidade, o algoritmo também implementa o processo de poda para minimizar a estimativa de erro. Uma das vantagens deste tipo de algoritmo é que, uma vez que a árvore é construída e validada, tende a ser interpretada com relativa facilidade, sem a necessidade de conhecimento prévio sobre o algoritmo (FRIZZARINI, 2013). O algoritmo PLS-DA (do inglês, Partial least square-discriminant analysis) é muitas vezes comparado aquele da PCA quanto à capacidade de classificação dos dados ou discriminação entre diferentes grupos. O PCA identifica a variabilidade bruta e não diferencia variações dentro dos grupos ou entre grupos. Porém, se a variação dentro do grupo é maior ao observado entre os grupos, a PLS-DA torna-se preferível à PCA em função de um maior desempenho (BARKER; RAYENS, 2003). Já o algoritmo *k*-vizinhos mais próximos (kNN, do inglês *k-Nearest Neighbors*) é um dos métodos de classificação mais antigos e simples (COVER; HART, 1967). Para o knn, quando um novo objeto é apresentado à classificação, um conjunto de exemplos similares é recuperado do conjunto de treinamento, sendo utilizados para classificar o novo objeto. Estes exemplos similares possuem a menor distância no espaço dimensional, sendo por isso o knn conhecido como “vizinho mais próximo” (GALVÃO; JÚNIOR, 2004).

A espectrofotometria de varredura UV-Vis tem sido cada vez mais aplicada à análise de matrizes complexas como é o caso de extratos de própolis e de plantas em estudos metabolômicos. Características dos espectros de absorção são indicativas da composição química da amostra e podem ser utilizadas como base à construção de modelos descritivos e preditivos através de técnicas de machine learning, por exemplo. Sendo assim, a seleção de determinadas características da amostra pode ser utilizada para melhorar a precisão e classificação do modelo através do estabelecimento de um subconjunto de classes com características discriminantes (MARASCHIN et al., 2012). Estudos de Paganotti et al. (2014) utilizando dados espectrais de varredura UV-Vis para EHs de própolis verificaram uma precisão de 100% em modelo utilizando o algoritmo PLS-DA à predição da região de origem da própolis (i.e., sul e sudeste do Brasil).

O perfil da própolis é conhecido por sua alta heterogeneidade química, considerando a enorme biodiversidade de espécies de plantas encontradas em algumas regiões produtoras (WATSON et al., 2006) no Brasil, por exemplo, da Mata Atlântica no Estado de Santa Catarina.

Devido a isso, o efeito da composição da flora no perfil químico das própolis tem grande influência na qualidade desta, podendo-se esperar uma heterogeneidade química elevada entre amostras provenientes de regiões geográficas distintas.

5.4 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONOÍDICOS E BÁLSAMO

Através da normativa nº 3 de janeiro de 2001, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estabeleceu uma série de parâmetros físico-químicos para a garantir a qualidade da própolis e dos seus extratos para a comercialização. Dentre as características físico-químicas avaliadas, destacam-se os teores mínimos e máximos de fenólicos, flavonoides e extrato seco (bálsamo). Neste estudo, os conteúdos médios de fenólicos totais (mg/g e %), flavonoides (mg/g e %) e bálsamo (%) de setenta e três extratos hidoralcoólicos de própolis coletadas nos anos de 2014 e 2015, foram determinados por espectrofotometria UV-Vis. Os resultados são mostrados na Tabela 6. Teores discrepantes desses compostos foram identificados de acordo com a sazonalidade em questão, claramente indicando que a qualidade daquela matéria-prima é heterogênea ao longo do ano.

Os EHs de amostras de própolis coletadas no verão/2014 apresentaram a maior concentração e compostos fenólicos totais ($67,24 \text{ mg/g} \pm 5,12$), diferindo estatisticamente ($P < 0,05$) das demais estações. Os EHs das própolis coletadas no verão de 2015 ($43,12 \text{ mg/g} \pm 3,71$) e outono 2014 ($43,10 \text{ mg/g} \pm 2,88$) apresentaram as menores concentrações destes metabólitos. De modo geral, todas as amostras analisadas apresentaram conteúdos de fenólicos dentro dos parâmetros mínimos exigidos pelo MAPA (2001), i.e., 0,5% m/m.

Com relação aos teores de flavonoides, amostras do outono/2014 evidenciaram as menores concentrações ($3,75 \text{ mg/g} \pm 0,41$), diferindo estatisticamente de todas as demais ($P < 0,05$). Por outro lado, mais uma vez os maiores teores destes metabólitos secundários foram identificados em amostras de estação de verão 2014 ($12,08 \text{ mg/g} \pm 1,24$). De interesse, amostras de todas as estações apresentaram teores de flavonoides dentro dos valores mínimos exigidos pelo MAPA (2001), i.e., 0,25% m/m.

Estudos de Castro et al. (2007) identificaram teores semelhantes de compostos fenólicos totais (81,70 e 94,98 mg/g.) e flavonoides (43,00 e 47,31 mg/g) para amostras de própolis originárias de Minas Gerais, entre os meses de agosto e setembro, respectivamente. Também

foi identificada uma correlação positiva entre os teores de fenólicos e flavonoides com os resultados da atividade antibacteriana (*Streptococcus mutans*), onde as concentrações inferiores de fenólicos e flavonoides estiveram associadas a menor atividade antibacteriana. A própolis europeia é conhecida por ter nos flavonoides seus principais compostos bioativos, ao contrário da própolis brasileira aonde teores inferiores destes metabólitos são encontrados (MARCUCCI, 2006). Como exemplo, amostras de própolis da Bulgária apresentaram teores de flavonoides 42% (m/m) (KUJUMGIEV et al., 1999), enquanto no presente estudo o maior conteúdo detectado foi 1,20% (m/m) (verão/2014). Entretanto, os resultados reportados por Souza et al. (2010) assemelham-se ao observado às amostras de própolis catarinense com valores de concentração de 0,4 a 1,7% (m/m) de flavonoides totais para a própolis produzida em Botucatu (SP), sendo que não foram detectadas diferenças estatísticas ao longo das estações do ano àquela variável. Marcucci et al. (1998b) também identificaram valores reduzidos de flavonoides totais (0,84% m/m) em amostras de própolis do município de Mogi das Cruzes (SP). Em amostras de própolis do estado da Paraíba, Silva et al. (2006) identificaram baixos teores destes metabólitos (0,19 a 0,38% m/m), de forma similar ao detectado em amostras de própolis mineira, oriundas da região de Passo (0,12 e 2,11% m/m - Sousa et al., 2007).

Por último, os valores de conteúdos de bálsamo neste estudo (Tabela 6) também se mostraram discrepantes ao longo das estações. Enquanto amostras coletadas na primavera/2014, verão/2014 e outono/2015 apresentaram os maiores teores de bálsamo ($36,90\% \pm 4,04\%$ m/m a $38,82\% \pm 8,69\%$ m/m), a menor concentração de bálsamo foi detectada na amostra de outono/2014, ($19,37\% \pm 4,99\%$ m/m), a qual diferiu estatisticamente das demais ($P < 0,05$). Pode-se observar que os teores mais elevados de compostos fenólicos e flavonoides totais das própolis estudadas corresponderam também aos maiores conteúdos de bálsamo, corroborando Kujumgiev et al. (1999), que correlacionaram os maiores conteúdos de bálsamo em própolis aos baixos teores de cera e material solúvel e, conseqüentemente, a conteúdo mais elevados de compostos bioativos. Por fim, independente da estação de coleta, as amostras oriundas de São Joaquim (SC) apresentaram teores de bálsamo acima do valor mínimo (11% m/m) requerido pela legislação brasileira em vigor (MAPA, 2001). Estudos de Souza et al. (2010) também demonstraram que a própolis produzida durante a estação de verão no município de Botucatu (SP) apresentou maior porcentagem de bálsamo em comparação às demais estações, independente da técnica de coleta

daquela biomassa utilizada (e.g., coletor de própolis inteligente, raspagem ou tela). De interesse, a produção de própolis durante a estação do inverno não é recomendada por Lima (2006), a fim de evitar o enfraquecimento do enxame, com consequentes perdas na produção e menor qualidade da matéria-prima.

Tabela 6 - Concentração média* (mg/g e % \pm desvio padrão) de compostos fenólicos totais**, flavonoides*** e bálsamo em extrato hidroalcoólico de amostras de própolis (n = 73) oriundas do município de São Joaquim - SC.

Estações	Fenólicos (mg/g)	Fenólicos (%)	Flavonoides (mg/g)	Flavonoides (%)	Bálsamo (%)
Verão (2014)	67,24 \pm 5,12 a	6,72 \pm 0,51	12,08 \pm 1,24 a	1,20 \pm 0,12	37,72 \pm 12,12 a
Outono (2014)	43,10 \pm 2,88 b	4,31 \pm 0,28	3,75 \pm 0,41 b	0,37 \pm 0,04	19,37 \pm 4,99 b
Primavera (2014)	46,58 \pm 4,32 b	4,65 \pm 0,43	11,92 \pm 2,01 a	1,19 \pm 0,20	38,82 \pm 8,69 a
Inverno (2014)	52,71 \pm 4,28 b	5,27 \pm 0,42	9,12 \pm 0,72 a	0,91 \pm 0,07	34,89 \pm 8,47 ab
Verão (2015)	43,12 \pm 3,71 b	4,31 \pm 0,37	10,11 \pm 0,68 a	1,01 \pm 0,06	33,51 \pm 7,34 ab
Outono (2015)	47,75 \pm 3,74 b	4,77 \pm 0,37	11,14 \pm 0,72 a	1,11 \pm 0,07	36,90 \pm 4,04 a

* Média de três extrações \pm SD (desvio padrão da média);

** Determinado por espectrofotometria UV-visível (765 nm) e curva de calibração externa de ácido gálico ($r^2=0,99$)

*** Determinado por espectrofotometria UV-visível (420 nm) e curva de calibração externa de quercetina ($r^2=0,99$)

Cada coluna representa uma análise ANOVA separada.

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey (P <0,05).

Tendo em vista o que foi observado à campo quanto a predileção das abelhas *Apis mellifera* pela resina da espécie vegetal identificada como *B. dracunculifolia*, os teores de fenólicos totais e flavonoides também foram determinados às amostras de tecido foliar (ápices vegetativos) desta espécie (Figura 17). A partir da seleção e marcação de determinados indivíduos a campo, amostras de biomassas foram coletadas destes na primavera/2014, verão/2015 e outono/2015, no município de São Joaquim, em áreas circunvizinhas às colméias doadoras de própolis. Pode-se constatar teores de compostos fenólicos totais discrepantes (P<0,05) ao longo das estações, onde o verão/2015 apresentou teores mais elevados do metabólito de estudo (40,36 mg/g \pm 0,04), seguido do outono 2015 (32,56mg/g \pm 0,11) e primavera 2014 (31,46 mg/g \pm 0,12). De forma semelhante, os teores de flavonoides totais dos EHs diferiram estatisticamente (P<0,05) entre todas as estações, sendo que novamente o verão/2015 apresentou o maior teor (7,97mg/g \pm 0,016), seguido mais uma vez do outono/2015 (7,82 mg/g \pm

0,023) e primavera/2014 (7,71 mg/mg \pm 0,04). Sousa et al. (2011) cultivaram durante um ano amostras de *B. dracunculifolia* oriundas de 10 regiões dos estados do Paraná, Minas Gerais e São Paulo. Os autores detectaram variações na concentração de compostos entre as amostras das regiões de estudo e também o efeito da época de coleta sobre as variáveis de interesse. Por exemplo, as concentrações de Artepillin C foram mais elevadas nos meses de novembro e dezembro e no período de janeiro a abril.

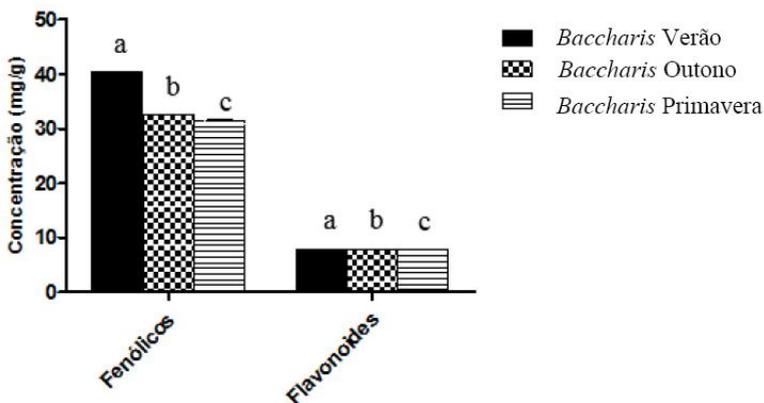
As diversas atividades biológicas descritas à própolis também foram identificadas em extratos de *B. dracunculifolia*. Todavia, o maior desafio à padronização dos efeitos biológicos da própolis, e consequentemente de sua composição química, considera o domínio da influência da sazonalidade sobre o fenótipo bioquímico da planta doadora de resina (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Figueiredo (2010) avaliou o efeito da sazonalidade no perfil químico e na atividade antioxidante de extratos de *B. dracunculifolia*. Irrelevante discrepância dos perfis químicos qualitativo foi detectada nas amostras, ainda que com relação ao perfil quantitativo, diferenças bastante acentuadas tenham sido observadas. Os maiores valores de atividade antioxidante foram detectados em extratos de biomassa coletada no mês de maio, em contrapartida, apresentando a menor concentração da maioria dos compostos fenólicos estudados, evidenciando que tais compostos não foram os maiores responsáveis pela atividade biológica do material vegetal.

Para além do efeito da sazonalidade sobre a composição química da resina vegetal, a interação planta-inseto também é fator regulador do perfil metabólico daquele biofluido e, consequentemente, da própolis. Segundo Bastos et al. (2011), as abelhas não coletam o material resinoso de *B. dracunculifolia* quando a planta está em época de floração, mas sim durante o seu crescimento, período este responsável pela produção de metabólitos secundários no vegetal, importante para a interação com insetos predadores.

Através dos dados meteorológicos disponibilizados pela Epagri/Ciram (Tabela suplementar 1) podemos verificar que a estação de verão/2014 apresentou os maiores valores de temperaturas médias máxima (24,56 °C) e mínima (14,92 °C). Adicionalmente, o verão/2014 também apresentou um maior índice de insolação (664,7 h) quando comparada às demais estações. Em contrapartida, para a precipitação total e velocidade do vento, o inverno/2014 apresentou os maiores índices, 634mm e 2,64 km, respectivamente. De modo geral, o metabolismo secundário vegetal é conhecido por apresentar variações

quali/quantitativas ao longo das estações do ano. Determinados metabólitos sofrem variações em seus conteúdos em função de variações de temperatura, precipitação pluviométrica, tipo de solo, intensidade e duração da luz solar, influenciando a qualidade das safras apícolas (ISLA et al., 2001; AHN et al. 2007; AGUERO et al., 2011). O estudo de Olszewska (2011), por exemplo, demonstrou em folhas de *S. aucuparia* tal fato, revelando maior atividade antioxidante dos compostos fenólicos nos meses de verão em detrimento às demais estações.

Figura 17- Concentração de fenólicos totais e flavonoides (médias mg/g \pm desvio padrão, n=3) de extratos hidroalcoólicos de *B. dracunculifolia* determinadas por espectrofotometria UV-visível. Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste Tukey ($P < 0,05$).



5.5 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PRÓPOLIS E DE ÁPICES VEGETATIVOS DE *BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA* VIA CCD E CLAE

Os extratos hidroalcoólicos de própolis foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD), visando à classificação das amostras de própolis em função da sazonalidade, a partir de seus perfis de composição química. Posteriormente, consoante à discrepância, algumas destas amostras foram escolhidas e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), onde seus constituintes

químicos foram identificados e quantificados, conforme mostrado detalhadamente na Tabela 7.

Os resultados da CCD para os extratos hidroalcoólicos de própolis demonstraram perfis cromatográficos bastante variados às amostras durante as estações: verão 2014/2015, outono 2014/2015, primavera/2014, e inverno/2014, sugerindo que os resultados de CLAE podem evidenciar diferenças igualmente acentuadas entre as estações, mas também para amostras de uma mesma estação, ainda que coletada em anos consecutivos.

As amostras de própolis coletadas no verão/2014 (Figura 18) apresentaram três perfis cromatográficos (CCD), sendo o primeiro visualmente caracterizado pela presença de uma banda azul fluorescente com $R_f = 0,66\text{cm}$ (e.g., mostrado abaixo com marcação em amarelo), sendo identificado em 72,42% dos EHs de própolis analisados nesta estação (amostras: V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V9, V10, V11, V13, V14, V15, V16, V17, V18, V19, V20, V22 e V23). Tal composto mostrou ser majoritário para a estação de verão 2014.

O segundo perfil cromatográfico em camada delgada caracterizou-se por apresentar bandas de coloração alaranjada com fatores de retenção (R_f s) de 0,82cm, 0,75cm, 0,66cm, e 0,56cm (Figura 18, destaque em vermelho). As amostras com este perfil cromatográfico, e.g., V8, V12, V21, V24, e V27, apresentaram diferentes intensidades de cor, ocorrendo em uma frequência em 17,85% dos extratos analisados. Por último, o terceiro perfil foi identificado nas amostras V25 e V26, caracterizando-se pela presença de uma banda verde fluorescente ($R_f = 0,62\text{cm}$) entre duas bandas pretas (R_f s= 0,66cm e 0,56cm) - Figura 18, destaque em azul - correspondendo a 7,14% dos extratos de própolis analisados nesta estação. O perfil cromatográfico da amostra V28 não apresentou intensidade de cor suficiente para sua classificação.

Tabela 7- Concentração média (mg/g) de fenólicos em extratos hidroalcoólicos de própolis (EtOH70%) de São Joaquim determinados por CLAE*

Estação	Amostras TR (min)**	Pico 1 10,43	p-cumarico 12,7	Pico 3 17,54	Pico 4 20,43	Pico 5 22,05	Quercetina 23,99	Pico 7 25,19	Pico 8 26,26
Verão 2014	V6	<i>n.q</i>	15,82 ± 0,05	<i>n.q</i>	15,61 ± 0,04	13,65 ± 0,02	0	0	<i>n.q</i>
	V9	<i>n.q</i>	13,54 ± 0,16	<i>n.q</i>	12 ± 0,15	12,72 ± 0,13	0	0	<i>n.q</i>
	V25	0	5,48 ± 0,013	0	2,63 ± 0,01	4,91 ± 0,03	4,73 ± 0,04	2,83 ± 0,24	0
	V8	5,14 ± 0,03	10,44 ± 0,26	<i>n.q</i>	13,49 ± 0,1	0	4,34 ± 0,03	0	0
Verão 2015	V35	1,77 ± 0,03	11,13 ± 1,32	<i>n.q</i>	0	0	13,6 ± 0,67	0	<i>n.q</i>
	V36	0	16,98 ± 0,03	<i>n.q</i>	6,93 ± 1,14	6,24 ± 0,92	5,74 ± 1,45	2,21 ± 0,09	0
	V39	0,83 ± 0,01	1,14 ± 0,32	<i>n.q</i>	<i>n.q</i>	0	0	0	0
	V40	1,07 ± 0,02	4,18 ± 0,09	0	1,1 ± 0,04	2,55 ± 0,02	3,24 ± 0,33	2,77 ± 0,09	0
Outono 2014	O3	<i>n.q</i>	3,88 ± 0,01	<i>n.q</i>	2,48 ± 0,01	2,39 ± 0,02	0	0,61 ± 0,09	0,8 ± 0,01
	O5	1,15 ± 0,02	8,35 ± 0,07	0	2,09 ± 0,26	2,67 ± 0,01	12,72 ± 2,34	0	1,23 ± 0,03
Outono 2015	O6	1,02 ± 0,01	11,64 ± 0,02	<i>n.q</i>	5,15 ± 0,53	3,05 ± 0,22	2,19 ± 0,61	1,14 ± 0,01	0
	O8	2,83 ± 0,01	8,09 ± 0,02	<i>n.q</i>	0	0	14,61 ± 0,01	0	<i>n.q</i>
	O10	1,57 ± 0,01	11,16 ± 0,14	<i>n.q</i>	2,46 ± 0,29	2,01 ± 0,0	6,2 ± 0,43	0	0
Primavera 2014	P2	6,78 ± 0,239	23,32 ± 5,83	1,26 ± 0,05	<i>n.q</i>	0	15,62 ± 0,71	0	0
	P7	0,42 ± 0,01	1,72 ± 0,03	0,15 ± 0,01	<i>n.q</i>	0	1,43 ± 0,02	0	0,57 ± 0,02
	P10	0,47 ± 0,01	1,06 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0	0	0,53 ± 0,01	0	0,38 ± 0,01
Inverno 2014	I3	4,96 ± 0,02	2,39 ± 0,02	0,97 ± 0,01	<i>n.q</i>	0	1,29 ± 0,01	0	<i>n.q</i>
	I5	6,51 ± 0,07	17,36 ± 0,44	<i>n.q</i>	<i>n.q</i>	0	34,58 ± 0,39	0	0
	I7	8,53 ± 0,01	6,44 ± 0,14	<i>n.q</i>	0	0	19,12 ± 0,05	0	0
<i>Baccharis</i>	Bac Ver	<i>n.q</i>	8,91 ± 0,12	<i>n.q</i>	13,12 ± 1,18	10,35 ± 0,11	<i>n.q</i>	<i>n.q</i>	0
	Bac Pri	<i>n.q</i>	4,28 ± 0,01	<i>n.q</i>	6,05 ± 0,05	4,42 ± 0,34	<i>n.q</i>	<i>n.q</i>	0
	Bac Out	<i>n.q</i>	4,82 ± 0,03	<i>n.q</i>	3,59 ± 0,03	4,57 ± 0,04	<i>n.q</i>	0	0
Verde MG	VMG	<i>n.q</i>	16 ± 2,3	<i>n.q</i>	11,09 ± 0,23	17,73 ± 0,33	9,26 ± 7,44	4,94 ± 0,28	0

* Determinado por CLAE (280 nm) e quantificação realizada através de curva padrão externa de artepillin C; *n.q* – Presente, mas não quantificável.

** TR= Tempo de Retenção em minutos.

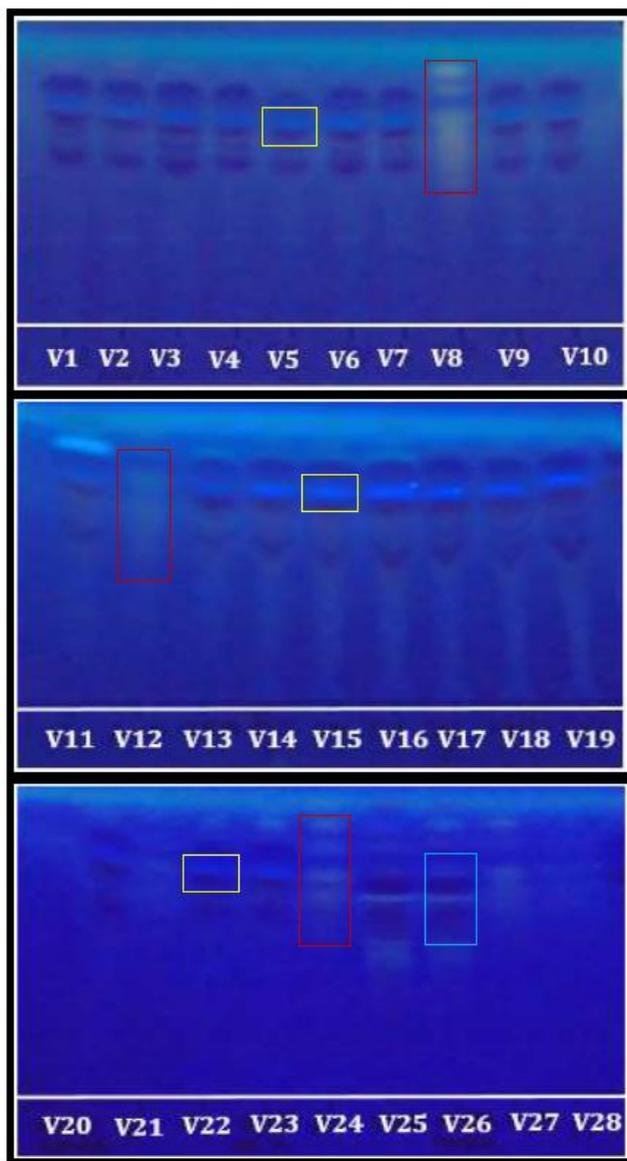
Tabela 8-Concentração média (mg/g) de fenólicos em extratos de própolis (EtOH70%) de São Joaquim determinados por CLAE* (Continuação).

Estação	Amostras TR(min)**	Pico 9 30,69	Pinocebrina 32,41	Crisina 33,90	Pico 12 34,8	Pico 13 36,21	Pico 14 40,67	Pico 15 43,70	Pico 16 46,98	ArtepillinC 52,55
Verão 2014	V6	<i>n.q</i>	<i>n.q</i>	15,58 ± 0,03	0	25,27 ± 0,07	0	<i>n.q</i>	<i>n.q</i>	45,09 ± 0,38
	V9	<i>n.q</i>	0	14,98 ± 0,14	<i>n.q</i>	20,44 ± 0,23	0	0	0	68,55 ± 1,25
	V25	9,28 ± 0,11	26,02 ± 0,3	17,19 ± 0,2	7,51 ± 1,63	13,88 ± 0,25	0	<i>n.q</i>	<i>n.q</i>	12,68 ± 0,07
	V8	0	1,19 ± 0,03	3,18 ± 0,02	0	0	0	0	1,35 ± 0,01	0
Verão 2015	V35	0	12,48 ± 0,51	0	2,89 ± 0,1	0	0	0	2,14 ± 0,4	0
	V36	0	2,78 ± 0,03	2,87 ± 0,02	0,93 ± 0,14	20,11 ± 0,06	3,43 ± 0,37	0	2,74 ± 0,0	68,96 ± 0,62
	V39	0	0,85 ± 0,01	0	0,32 ± 0,03	3,68 ± 0,11	0	0	1,36 ± 0,48	7,94 ± 0,12
	V40	12,97 ± 0,18	28,63 ± 1,61	14,32 ± 0,17	6,96 ± 0,33	11,96 ± 0,01	7,07 ± 0,35	0	8,86 ± 1,08	2,41 ± 0,28
Outono 2014	O3	0	1,03 ± 0,0	2,69 ± 0,0	1,05 ± 0,06	3,96 ± 0,01	<i>n.q</i>	0	0,78 ± 0,11	9,68 ± 1,42
	O5	0	2,93 ± 0,01	1,14 ± 0,02	2,25 ± 0,02	5,43 ± 0,01	<i>n.q</i>	0	1,87 ± 0,19	17,48 ± 0,08
Outono 2015	O6	0	4,87 ± 0,47	1,18 ± 0,11	1,02 ± 0,06	12,82 ± 0,13	0	0	1,24 ± 0,01	31,44 ± 0,1
	O8	0	13,86 ± 0,01	0	3,16 ± 0,0	0	0	0	2,23 ± 0,01	1,48 ± 0,01
	O10	0	19,85 ± 0,82	0	2,25 ± 0,08	6,61 ± 0,32	0	0	1,51 ± 0,01	21,18 ± 0,22
Primavera 2014	P2	0	6,63 ± 0,12	4,94 ± 0,0	0	<i>n.q</i>	0	0	2,87 ± 0,03	1,5 ± 0,21
	P7	0	0,69 ± 0,01	1,13 ± 0,01	0,53 ± 0,02	<i>n.q</i>	0	0	0,46 ± 0,01	<i>n.q</i>
	P10	0	0,41 ± 0,02	0,64 ± 0,02	0,29 ± 0,02	0	0	0	0,44 ± 0,01	<i>n.q</i>
Inverno 2014	I3	0	4,98 ± 0,04	0,33 ± 0,04	1,79 ± 0,19	2,08 ± 0,02	0	0	1,29 ± 0,03	3,38 ± 0,06
	I5	0	5,4 ± 0,09	8,07 ± 0,11	0	0	0	0	3,61 ± 0,05	0
	I7	0	5,5 ± 0,04	6,83 ± 0,03	0	0	0	0	2,86 ± 0,02	0
<i>Baccharis</i>	Bac Ver	0	0	7,11 ± 0,21	0	17,28 ± 0,39	1,63 ± 0,35	0	12,28 ± 1,08	15,86 ± 0,43
	Bac Pri	0	0	3,15 ± 0,01	0	4,92 ± 0,01	1,29 ± 0,01	0	11,88 ± 0,15	10,76 ± 2,31
	Bac Out	0	0	32,18 ± 0,210	0	14,79 ± 0,16	7,08 ± 0,01	0	8,86 ± 2,01	36,82 ± 0,18
Verde MG	VMG	0	0	9,85 ± 0,97	0	4,97 ± 0,38	7,3 ± 0,748	6,17 ± 0,28	0	59,36 ± 0,63

* Determinado por CLAE (280 nm) e quantificação realizada através de curva padrão externa de artepillin C; *n.q* – Presente, mas não quantificável.

** TR= Tempo de Retenção em minutos.

Figura 18 - Perfis de composição química em cromatografia de camada delgada (CDD) de extratos hidroalcoólicos de própolis (coletadas no verão 2014, no município de São Joaquim (SC)).



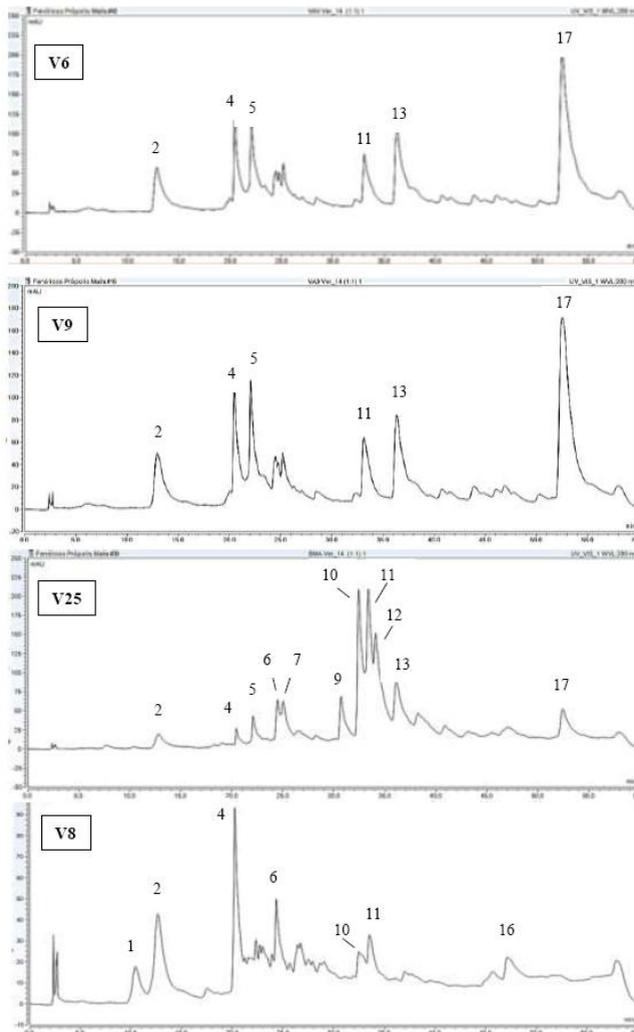
Tendo em vista os resultados de CCD para as amostras da estação de verão/2014, aonde três perfis cromatográficos distintos foram identificados, quatro amostras (V6, V8, V9 e V25) para subsequente análise cromatográfica (CLAE) foram selecionadas. Nesta etapa, para além da caracterização química da biomassa em estudo, objetivou-se determinar a confiabilidade da técnica de CCD em detectar diferenças/semelhanças de perfis de composição química dos EHs da própolis catarinense. A semelhança da espectrofotometria UV-Vis, a CCD também é uma técnica analítica rápida, barata e usualmente robusta, sendo de interesse do setor produtivo afim ao tema em estudo para fins de controle de qualidade da matéria-prima, por exemplo. A figura 19 demonstra que, assim como observado via CCD, as amostras V6 e V9 exibiram o mesmo perfil na cromatografia líquida de alta eficiência. Nestas amostras, o composto majoritário foi a Artepillin C (pico 17), sendo os maiores teores detectados nas amostras V9 ($68,55 \text{ mg/g} \pm 1,25$), seguido de V6 ($45,09 \text{ mg/g} \pm 0,38$). O ácido *p*-cumárico (pico 2) e a crisina (pico 11) foram outros dois compostos identificados com concentrações relevantes nas amostras, a saber: V6 $15,82 \text{ mg/g} \pm 0,05$ e $15,58 \text{ mg/g} \pm 0,03$, respectivamente, e V9 concentrações de $13,54 \text{ mg/g} \pm 0,16$ e $14,98 \text{ mg/g} \pm 0,14$, respectivamente. Outros compostos, e.g., pico 4 (TR = 20,4 min), pico 5 (TR = 22,02 min) e pico 3 (TR = 36,24 min) foram detectados nas amostras em estudo, porém ainda não identificados.

Com relação ao segundo perfil cromatográfico identificado por CCD, a amostra V8 foi selecionado à análise de CLAE. Em contrapartida as amostras oriundas do perfil 1 de CCD, o composto Artepillin C não foi observado para V8, a qual teve como majoritário um composto não identificado: pico 4 (TR = 20,24 min) com concentração de $3,49 \text{ mg/g} \pm 0,1$. Adicionalmente, foram identificados nesta amostra o ácido *p*-cumárico ($10,44 \text{ mg/g} \pm 0,26$), a quercetina ($4,4 \text{ mg/g} \pm 0,03$), a pinocembrina ($1,19 \text{ mg/g} \pm 0,03$) a crisina ($3,18 \text{ mg/g} \pm 0,02$), bem como outros compostos, i.e., pico 1 (TR = 10,43 min), e pico 16 (TR = 47,12 min) não identificados até o momento.

O terceiro e último perfil detectado na análise de CCD às amostras de verão 2014 teve a amostra V25 selecionada à análise de CLAE. Comparando os quatro cromatogramas da Figura 19, constata-se uma quantidade superior de compostos identificados nesta amostra, com destaque à Artepillin C (pico 17 – $12,68 \text{ mg/g} \pm 0,07$), porém com uma concentração bastante inferior ao encontrado nas amostras V6 e V9. Nesse caso, o composto majoritário foi identificado como pinocembrina (pico 10), apresentando teor de $26,02 \text{ mg/g} \pm 0,3$, seguido da crisina

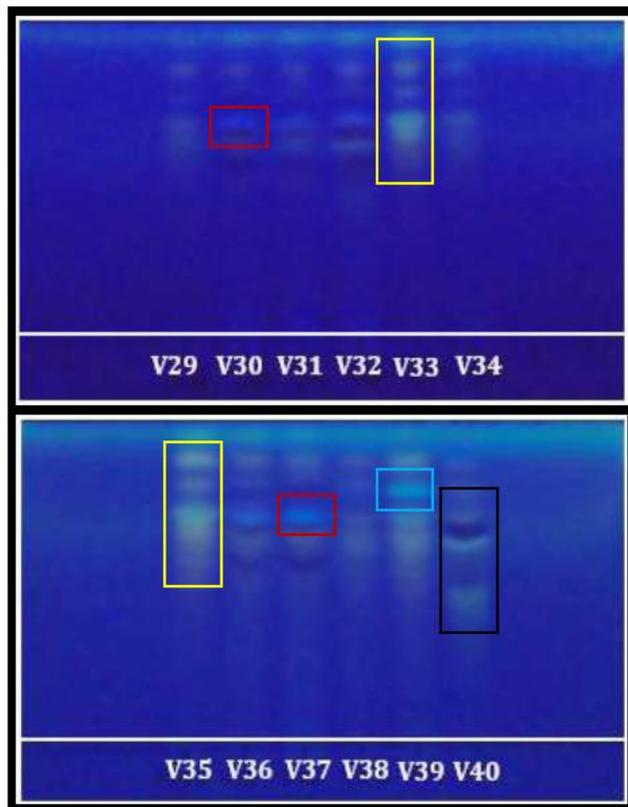
(pico 11) com $17,19\text{mg/g} \pm 0,2$, do ácido *p*-cumárico (pico 2) com $5,48\text{mg/g} \pm 0,013$ e da quercetina (pico 6) com $4,73\text{mg/g} \pm 0,04$.

Figura 19 - Perfis cromatográficos (CLAE, 280nm) dos extratos hidroalcoólicos de própolis (EtOH 70%) coletada novembro/2014 em São Joaquim (SC). Picos detectados: 1 = *n.i.*; 2= ácido *p*-cumárico; 4= *n.i.*; 5= *n.i.*; 6= quercetina; 7= *n.i.* 9= *n.i.*; 10= pinocembrina; 11= crisina; 12= *n.i.*; 13= *n.i.*; 14= *n.i.*; 16= *n.i.*; 17= Artepillin C. Números em comum representam os mesmos compostos. *n.i.* = compostos não identificados.



As amostras de própolis coletadas no verão/2015 geraram quatro perfis composicionais detectados via CCD (Figura 20). O primeiro grupo caracterizou-se pela predominância de bandas alaranjadas (R_f = 0,88cm; 0,81cm; 0,71cm; 0,57cm), identificadas na figura abaixo com marcação em amarelo. Novamente, as amostras com este perfil: V29, V33, V34, V35, e V38, apresentaram-se com diferentes intensidades de cor e ocorreram em 41,6% dos EHs analisados para o verão/2015. O segundo grupo de perfis cromatográficos (destaque em vermelho, Fig. 20) caracterizou-se pela presença de uma banda de coloração azul fluorescente (R_f = 0,68cm), identificado em 41,6% dos EHs de própolis coletados no verão/2015, incluindo as amostras: V30, V31, V32, V36 e V37. Com relação ao terceiro grupo, este apresentou-se similar ao primeiro, porém com a presença de uma banda azul fluorescente (R_f = 0,78cm) proeminente na amostra V39 (destaque em azul), a qual foi detectada em apenas um dos extratos analisados. Por último, o quarto perfil cromatográfico foi identificado na amostra V40 (destaque em preto), correspondendo a 8,3% dos extratos analisados, o qual visualmente aparenta ser similar ao identificado na amostra V25 (verão/2014).

Figura 20 - Cromatografia em Camada Delgada (CDD) dos extratos hidroalcoólicos de própolis (EtOH70%) coletada no verão/2015



Através dos resultados de CCD, foram selecionados quatro extratos de própolis da estação de verão 2015 para as análises de CLAE, i.e., uma amostra representativa de cada grupo de perfil identificado. Na Figura 21 são mostrados os cromatogramas das amostras selecionadas: V35, V36, V39 e V40.

Na amostra V35, representante do primeiro perfil detectado na CCD, o composto majoritário foi a quercetina (pico 6) com a concentração de $13,6\text{mg/g} \pm 0,67$, porém outros compostos como o ácido *p*-cumárico (pico 2) e a pinocembrina (pico 10) também foram identificados.

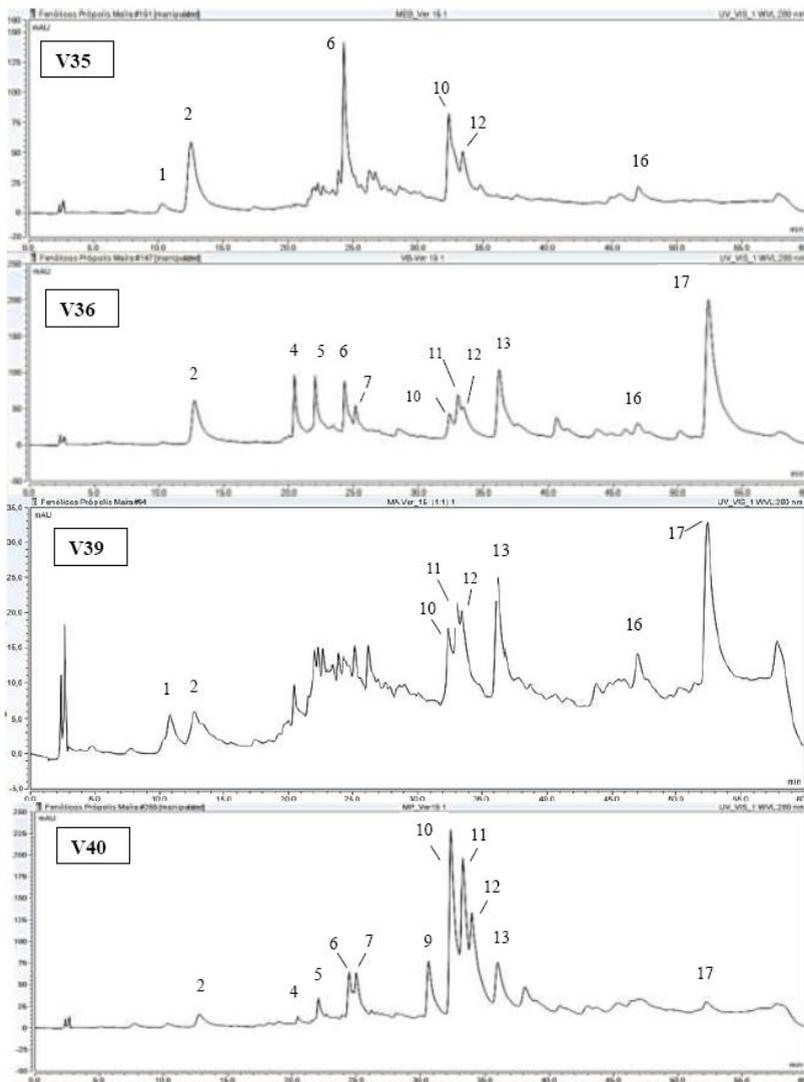
No segundo perfil cromatográfico identificado por CCD, i.e., na amostra V36, o composto majoritário foi identificado como Artepillin C

(pico 17) com o teor de $68,96 \text{ mg/g} \pm 0,62$, seguido pelo ácido *p*-cumárico (pico 2), quercetina (pico 6), crisina (pico 11) e pinocembrina (pico 10). Outros compostos, i.e, pico 4 (TR= 20,42 min), pico 5 (22,01 min), pico 7 (25,13 min), pico 12 (TR= 33,43 min), pico 13 (TR= 36,2 min), e pico 16 (TR= 46,9 min), não foram identificados até o momento. Comparativamente aos demais extratos em estudo, a amostra V36 apresentou maior riqueza de compostos em sua constituição, o que sugere tratar-se de uma biomassa com diversas fontes botânicas de resinas.

A amostra V39, selecionada a partir do terceiro perfil detectado na CCD apresentou a Artepillin C como metabólito majoritário (pico 17) com teor de $7,94 \text{ mg/g} \pm 0,12$ e os compostos ácido *p*-cumárico (pico 2 - $11,4 \text{ mg/g} \pm 0,32$) e pinocembrina (pico 10 - $0,85 \text{ mg/g} \pm 0,01$).

Por último, a amostra V40 foi selecionada no quarto perfil químico identificado via CCD para as própolis coletadas no verão/2015. A amostra apresentou a pinocembrina como composto majoritário (pico 10) com uma concentração de $28,63 \text{ mg/g} \pm 1,61$. Também foram identificados a crisina (pico 11), o ácido *p*-cumárico (pico 2), a quercetina (pico 6) e o Artepillin C (pico 17). Conforme observado na CCD, as amostras V25 (Figura 18) e V40 (Figura 20) também apresentaram perfis cromatográficos similares na CLAE.

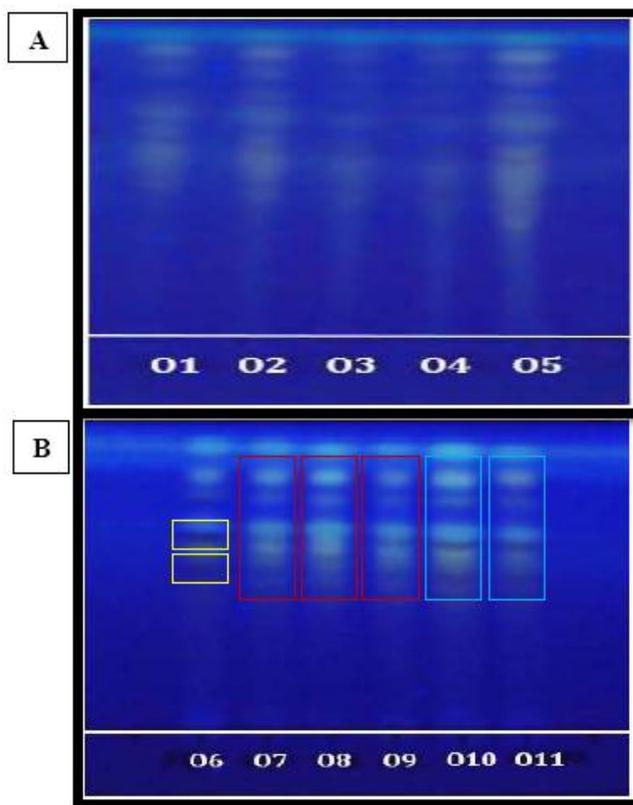
Figura 21 - Perfis cromatográficos (CLAE, 280nm) dos extratos hidroalcoólicos de própolis (EtOH 70%) coletadas na região serrana catarinense (São Joaquim) no verão/2014. Picos detectados: 1 = *n.i.*; 2= ácido *p*-cumárico; 4= *n.i.*; 5= *n.i.*; 6= quercetina; 7= *n.i.*; 9= *n.i.*; 10= pinocembrina; 11= crisina; 12= *n.i.*; 13= *n.i.*; 14= *n.i.*; 16= *n.i.*; 17= Artepillin C. Números em comum representam os mesmos compostos. *n.i.* = compostos não identificados.



As amostras de outono coletadas em 2014 e 2015 também foram analisadas via CCD. Os EHS das amostras de outono/2014 (Figura 22A) geraram perfis cromatográficos bastante semelhantes, sendo que eventuais discrepâncias foram destacadas quanto à quantidade e intensidade de bandas das amostras O1, O2 e O5, comparativamente às amostras O3 e O4.

Para a própolis produzida no outono/2015 (Figura 22B), as amostras foram agrupadas de acordo com suas particularidades, sendo possível dividi-las em três grupos de perfis cromatográficos (CCD). O primeiro grupo caracterizou-se pela presença de duas bandas de coloração preta acentuadas (R_f s = 0,62cm e 0,51cm), sendo detectadas apenas na amostra O6. O segundo grupo amostral assemelhou-se pela predominância de bandas de coloração alaranjada (R_f s = 0,81cm; 0,74cm; 0,64cm e 0,55cm) ao longo da corrida das amostras O7, O8 e O9. Por último, o terceiro perfil foi identificado nas amostras O10 e O11, as quais parecem apresentar, via análise visual dos cromatogramas, perfis de composição química intermediários entre o primeiro e o segundo perfis.

Figura 22 - Cromatografia em camada delgada (CDD) dos extratos hidroalcoólicos de própolis (EtOH70%), oriundos do município de São Joaquim (SC). A – Outono/2014 e B – Outono/2015.



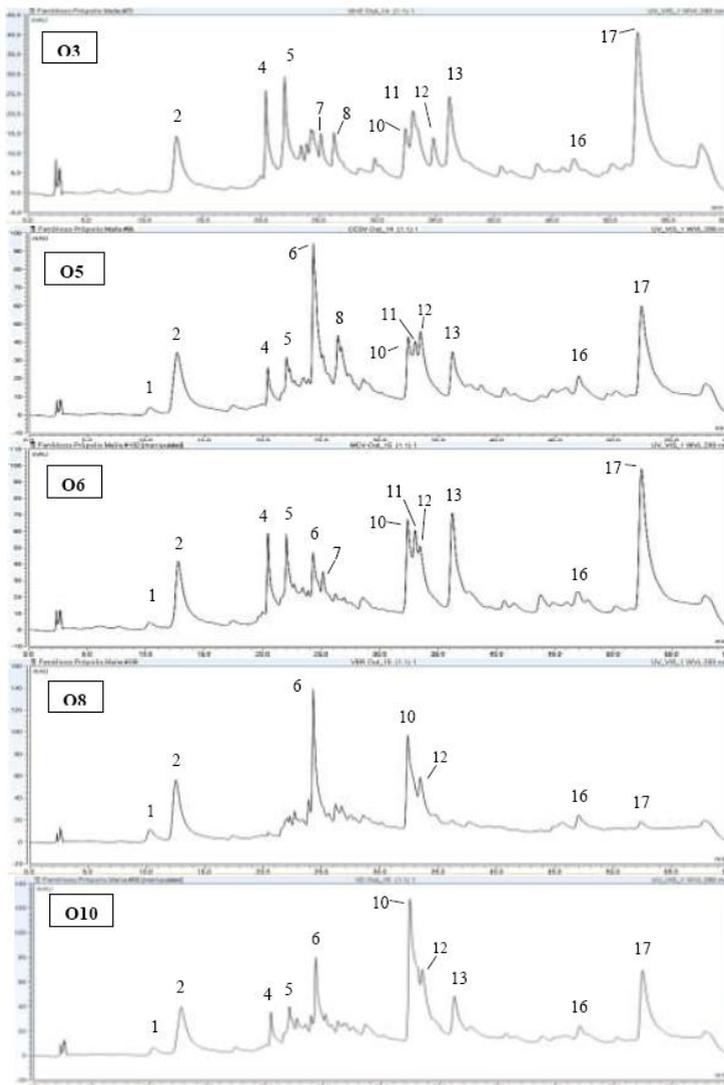
De acordo com os resultados da CCD, foram selecionados dois EHs de própolis outono/2014 e três EHs de amostras coletadas naquela estação em 2015 às análises de CLAE. A Figura 23 mostra os cinco cromatogramas das amostras em estudo: O3 e O5 (outono/2014) e O6, O8 e O10 (outono/2015).

Podemos verificar que os EHs de outono/2014, assim como observado por CCD, apresentaram um perfil de compostos bastante similar quando analisados por CLAE. Com relação a amostra O3, verifica-se o Artepillin C (pico 17) como composto majoritário (9,68 mg/g \pm 1,42), entretanto compostos como o ácido *p*-cumárico (3,88 mg/g \pm 0,01), a pinocembrina (1,03 mg/g \pm 0,0) e a crisina (2,69 mg/g \pm

0,0) também foram identificados. Já para a amostra O5, novamente o composto majoritário foi o Artepillin C (17,48 mg/g \pm 0,08), porém a quercetina (12,72 mg/g \pm 2,34), o ácido *p*-cumárico (8,35 mg/g \pm 0,07), a pinocembrina (2,93 mg/g \pm 0,01) e a crisina (1,14 mg/g \pm 0,02) também foram identificados.

Com relação aos extratos oriundos da estação de outono/2015, verificamos para a amostra O6 diversos constituintes químicos, similares ao observado na amostra O3 do outono/2014, porém em concentrações mais elevadas. Novamente, o Artepillin C (pico 17) foi identificado como majoritário (31,44 mg/g \pm 0,1), sendo também identificados os compostos ácido *p*-cumárico (11,64 mg/g \pm 0,02), quercetina (2,19 mg/g \pm 0,61), pinocembrina (4,87mg/g \pm 0,47) e a crisina (1,18 mg/g \pm 0,11). Em contrapartida, na amostra 08 um baixo conteúdo de Artepillin C foi detectado (1,48 mg/g \pm 0,01), sendo identificado como composto majoritário a quercetina (14,61 mg/g \pm 0,01), seguido pela pinocembrina (13,86 mg/g \pm 0,01) e pela crisina (8,09 mg/g \pm 0,02). Por último, a terceira amostra outonal analisada para 2015 foi a O10 que, assim como observado pela técnica de CCD, apresentou um perfil na CLAE intermediário entre as amostras O6 e O8, sendo o composto Artepillin C identificado como majoritário (21,18 mg/g \pm 0,22), seguido da picocembrina (19,85 mg/g \pm 0,82), do ácido *p*-cumárico (11,16 mg/g \pm 0,14) e da quercetina (6,2 mg/g \pm 0,43).

Figura 23 - Perfis cromatográficos (CLAE, 280nm) comparativos dos extratos hidroalcoólicos de própolis (EtOH 70%) serrana catarinense (município de São Joaquim). Amostras O3 e O5 coletadas no outono/2014. Amostras O6, O8 e O10 coletadas no outono/2015. Picos detectados: 1 = *n.i.*; 2= ácido *p*-cumárico; 4= *n.i.*; 5= *n.i.*; 6= quercetina; 7= *n.i.*; 8= *n.i.*; 10= pinocembrina; 11= crisina; 12= *n.i.*; 13= *n.i.*; 14= *n.i.*; 16= *n.i.*; 17= Artepillin C. Números em comum representam os mesmos compostos. *n.i.* = compostos não identificados.



As amostras de inverno e primavera 2014 também foram analisados por CCD. Para os EHs de amostras de inverno/2014 (Figura 24) foram detectados perfis cromatográficos semelhantes, sendo apenas detectadas diferenças de intensidade de cor das bandas. Da mesma forma, as amostras oriundas da primavera/2014 (Figura 25) mostraram-se homogêneas, exceção feita aos EHs P7 e P8, aonde uma banda diferenciada de coloração azul fluorescente ($R_f = 0,82\text{cm}$), identificadas com marcações em amarelo, foi detectada.

Figura 24 - Perfil cromatográfico em camada delgada (CDD) de extratos hidroalcoólicos de própolis (EtOH70%) invernal (2014), oriundas de São Joaquim (SC).

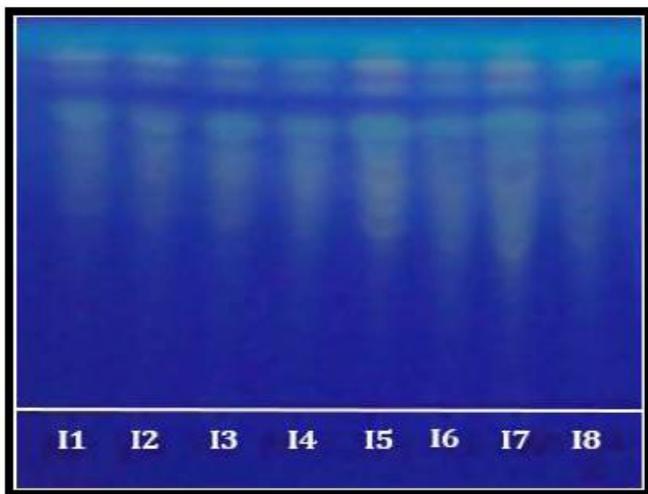
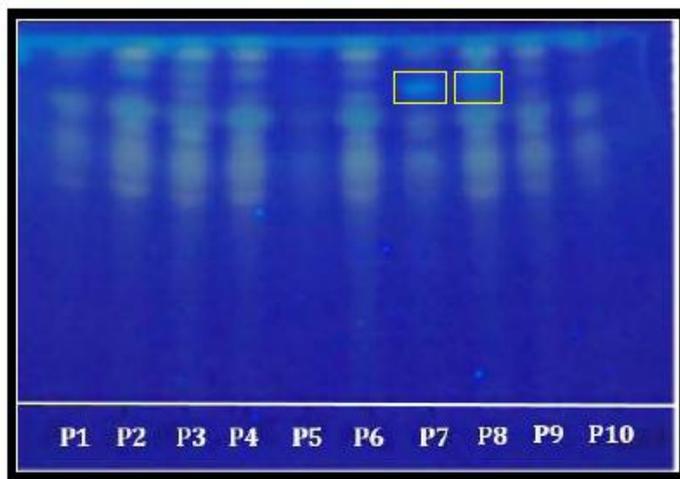


Figura 25 - Cromatografia em Camada Delgada (CDD) dos extratos hidroalcoólicos de própolis (EtOH70%) da estação de primavera (2014), oriundos do município de São Joaquim (SC).



Na Figura 26 podemos observar os três cromatogramas das amostras de inverno/2014 selecionadas às análises de CLAE: I5, I7 e I3. As amostras I5 e I7 apresentaram perfis químicos idênticos, diferindo apenas quantitativamente. Para ambas, o composto identificado como majoritário foi a quercetina (pico 6), com teores mais elevados detectados nas amostras I5 ($34,58 \text{ mg/g} \pm 0,39$) e I7 ($19,12 \text{ mg/g} \pm 0,05$). Adicionalmente, o ácido *p*-cumárico (pico 2), a pinocembrina (pico 10) e a crisina (pico 11) também foram identificados. A terceira amostra analisada para essa estação foi a I3, cujo EH evidenciou um perfil cromatográfico (CLAE) algo distinto em relação às amostras supracitadas, sendo a pinocembrina (pico 10) o composto majoritário ($4,98 \text{ mg/g} \pm 0,04$), com acréscimo de Artepillin C ($3,38 \text{ mg/g} \pm 0,06$), ácido *p*-cumárico ($2,39 \text{ mg/g} \pm 0,02$), quercetina ($1,29 \text{ mg/g} \pm 0,01$) e crisina ($0,33 \text{ mg/g} \pm 0,04$).

Com relação a estação de primavera/2014, as amostras P2, P7 e P10 foram selecionadas à análise de CLAE (Figura 27). De modo geral, assim como detectado por CCD, as amostras apresentaram um perfil químico bastante similar, com maiores conteúdos dos compostos em estudo detectados na amostra P2, e.g., ácido *p*-cumárico ($23,32 \text{ mg/g} \pm 5,83$ - composto majoritário), quercetina ($15,62 \text{ mg/g} \pm 0,71$), pinocembrina ($6,63 \text{ mg/g} \pm 0,12$), crisina ($4,94 \text{ mg/g} \pm 0,0$) e Artepillin

C ($1,5 \text{ mg/g} \pm 0,21$). Para a amostra P7, identificou-se o mesmo perfil químico, sendo o ácido *p*-cumárico (pico 2) o composto majoritário ($1,72 \text{ mg/g} \pm 0,03$), seguido pela quercetina ($1,43 \text{ mg/g} \pm 0,02$), a crisina ($1,13 \text{ mg/g} \pm 0,01$) e a pinocembrina ($0,69 \text{ mg/g} \pm 0,01$). Da mesma forma, a amostra P10 apresentou o ácido *p*-cumárico (pico 2) como majoritário ($1,06 \text{ mg/g} \pm 0,02$), posteriormente a quercetina ($0,53 \text{ mg/g} \pm 0,01$), a crisina ($0,64 \text{ mg/g} \pm 0,02$) e a pinocembrina ($0,41 \text{ mg/g} \pm 0,02$).

Figura 26 - Perfis cromatográficos (CLAE, 280nm) de extratos hidroalcoólicos de própolis (EtOH 70%) coletados na região serrana catarinense (São Joaquim) no inverno/2014. Picos detectados: 1 = *n.i.*; 2= ácido *p*-cumárico; 3 = *n.i.*; 6= quercetina; 10= pinocembrina; 11= crisina; 12= *n.i.*; 13= *n.i.*; 14= *n.i.*; 16= *n.i.*; 17= Artepillin C. Números em comum representam os mesmos compostos. *n.i.* = compostos não identificados.

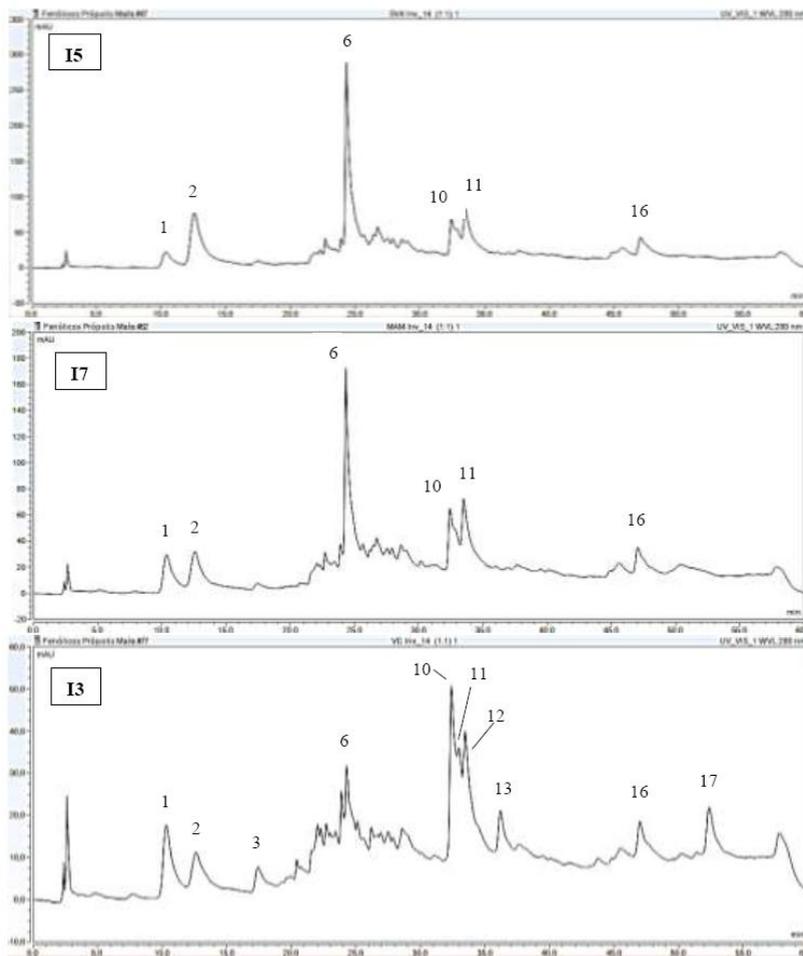
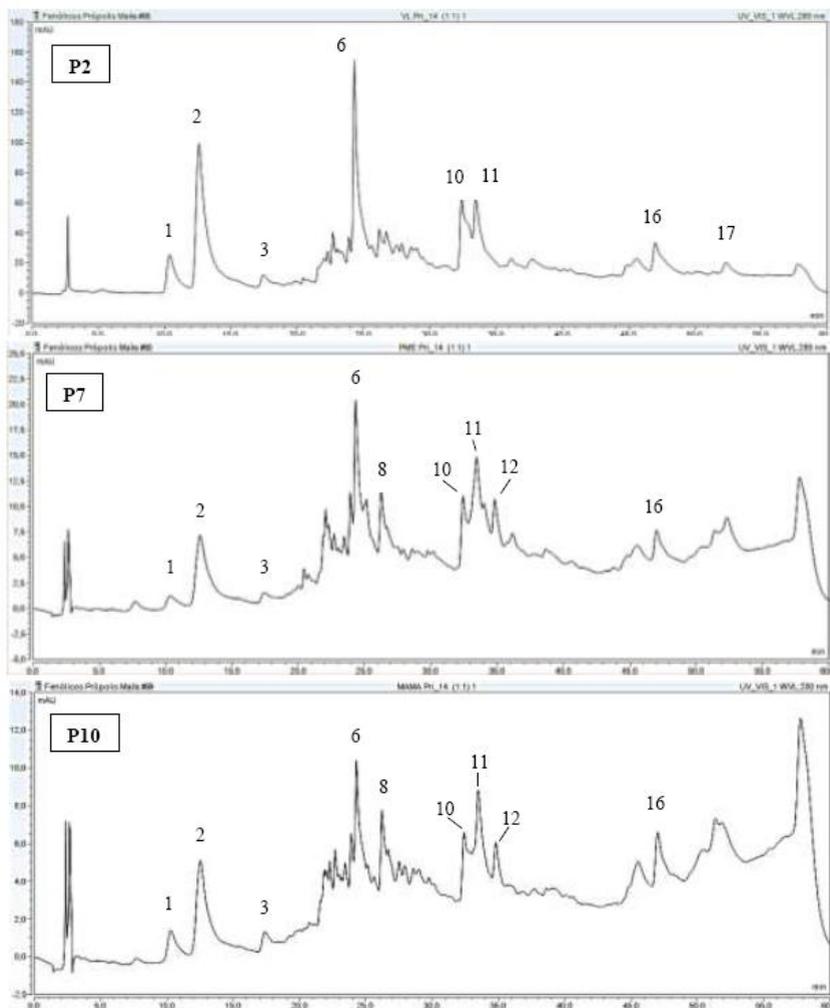
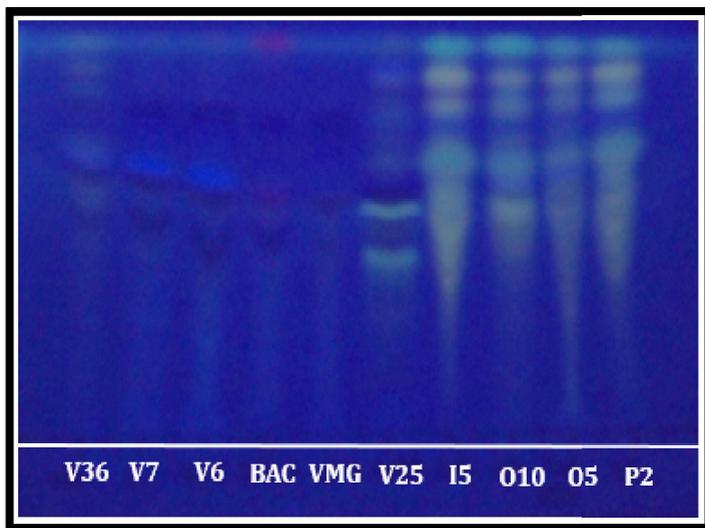


Figura 27 - Perfis cromatográficos (CLAE, 280nm) de extratos hidroalcoólicos de própolis (EtOH 70%) coletadas na primavera/2014 em São Joaquim (SC). Picos detectados: 1 = *n.i.*; 2= ácido *p*-cumárico; 3 = *n.i.*; 6= quercetina; 8= *n.i.*; 10= pinocembrina; 11= crisina; 12= *n.i.*; 13= *n.i.*; 14= *n.i.*; 16= *n.i.*; 17= Artepillin C. Números em comum representam os mesmos compostos. *n.i.* = compostos não identificados.



Podemos observar na Figura 28 a abundância de perfis cromatográficos (CCD) das amostras de própolis ao longo das estações dispostas entre os anos de 2014 e 2015 no município de São Joaquim. Entre as amostras de própolis, encontram-se os *spots* dos extratos hidroalcoólicos de *B. dracunculifolia* (BAC) e também de uma amostra de própolis verde de Minas Gerais (VMG). A cromatografia em camada delgada revela perfis semelhantes de composição às amostras de BAC, VMG e as amostras V36, V7 e V6 de São Joaquim.

Figura 28 - Cromatograma em camada delgada (CDD) de extratos hidroalcoólicos de própolis (EtOH70%). V36= verão/2015; V7, V6 e V25= verão/2014; I5= inverno/2014; O10= outono/2015; O5= outono/2014; P2= primavera/2014; BAC= *Baccharis dracunculifolia*; VMG= própolis verde de Minas Gerais.



Os perfis químicos dos ápices vegetativos das amostras de *Baccharis dracunculifolia* coletadas na primavera/2014, verão/2015 e outono/2015 também foram analisados via CLAE. A Figura 29 revela perfis cromatográficos de *B. dracunculifolia* semelhantes, independente das estações de coleta. Como descrito anteriormente para os perfis químicos das amostras de própolis de verão (Figura 19), mais uma vez é evidente que o ácido *p*-cumárico, a crisina e a artepillin C são os compostos fenólicos dominantes para esta espécie vegetal. Adicionalmente, quantidades relevantes de compostos fenólicos não

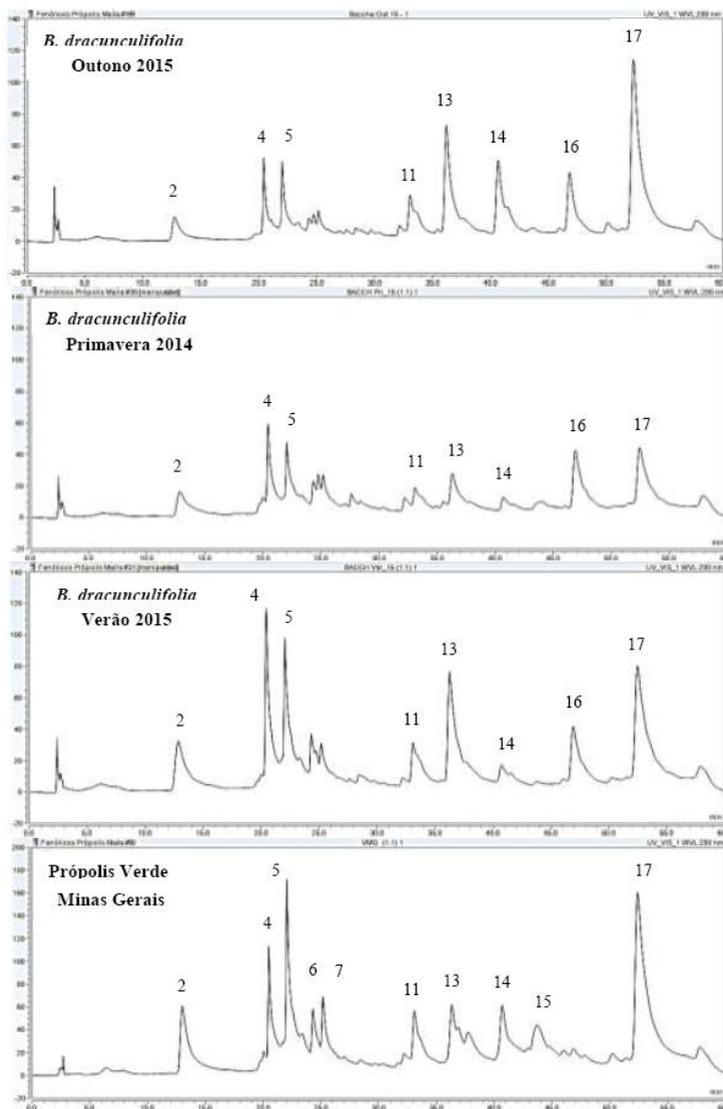
identificados (picos 4, 5 e 13) foram detectadas, ocorrendo tanto nas amostras de própolis de verão como na biomassa de *B. dracunculifolia*.

As maiores diferenças entre as amostras de biomassas vegetais referem-se aos teores dos compostos ao longo das estações. De maneira geral, as biomassas vegetais com maiores teores de artepillin C foram coletadas no outono ($36,82 \text{ mg/g} \pm 0,18$), corroborando com estudos de Simões-Ambrosio et al. (2010) que detectaram aumentos nos teores de artepillin C em biomassas de populações de *B. dracunculifolia* no período fevereiro-abril. Além disso, de acordo com Lima (2005), considerando a interação *Apis mellifera*-*Baccharis dracunculifolia*, a melhor época à produção de própolis verde no Brasil ocorre entre dezembro a abril.

Para efeitos comparativos, uma amostra de própolis verde de Minas Gerais também foi analisada por CLAE. A Figura 21 demonstra uma similaridade de perfis químicos entre as própolis serrana catarinense e a mineira, com destaque para o ácido *p*-cumárico, a crisina e o artepillin C.

A análise visual comparativa dos cromatogramas das amostras de própolis catarinense (verão/2014 de São Joaquim), de *B. dracunculifolia* e da própolis verde de Minas Gerais indica elevada similaridade. De forma específica, os teores de Artepillin C dos EHs das amostras de própolis serrana catarinense (verão, São Joaquim) e da própolis verde mineira mostraram-se bastante próximos, i.e., $68,96 \text{ mg/g} \pm 0,62$ e $59,36 \text{ mg/g} \pm 0,36$, respectivamente. Semelhanças de perfis químicos de própolis do sudeste do Brasil e *Baccharis dracunculifolia* foram relatadas por Park et al. (2002). Os autores relacionaram a fonte de resina à produção da própolis àquela espécie botânica, entretanto o estudo não identificou a presença de Artepillin C nas amostras.

Figura 29 - Perfis cromatográficos (CLAE, 280nm) dos extratos hidroalcoólicos de *Baccharis dracunculifolia* (EtOH 70%) coletada primavera/2014, verão/2015 e outono/2015. Picos detectados: 1 = *n.i.*; 2= ácido *p*-cumárico; 3=*n.i.*; 4= *n.i.*; 5= *n.i.*; 6= quercetina; 7= *n.i.*; 11= crisina; 13= *n.i.*; 14= *n.i.*; 15= *n.i.*; 16= *n.i.*; 17=Artepillin C. Números em comum representam os mesmos compostos. = compostos não identificados.



Numa abordagem analítica final, os dados de concentrações de compostos determinados por CLAE foram utilizados em estudos quimiométricos, via análises dos componentes principais (PCA) e de agrupamentos hierárquica (HCA). Objetivou-se identificar padrões de similaridade amostral em função da sazonalidade, utilizando-se técnicas estatísticas multivariáveis que reduzem número de dimensões determinantes da variação dos dados, porém sem perder constituintes relevantes das informações. Os três primeiros componentes principais, e.g., PC1 (30%), PC2 (23,98%) e PC3 (13,42%) explicam 67,4% da variabilidade amostral do conjunto de dados em estudo (Figura 30). Adicionalmente, identificou-se o agrupamento de duas amostras de verão, V25 e V40, em PC1 e PC2 negativos.

Subsequentemente foi aplicado ao conjunto de dados a análise hierárquica (HCA), sendo as similaridades entre objetos definidas com base na distância euclidiana, utilizando o método de agrupamento UPGMA. Esta abordagem permitiu identificar três grupos principais (Figura 31) de amostras. O primeiro grupo englobou as amostras V25 e V40, coletadas no verão de 2014 e 2015, respectivamente. Tais amostras, quando analisadas por CCD e CLAE, apresentaram perfis cromatográficos idênticos, porém distintos em relação às demais. O segundo grupo constituiu-se das amostras de *B. dracunculifolia* e de própolis V6 (verão/2014), V9 (verão/ 2014), V36 (verão/2015) e O6 (outono/2014). Tais amostras evidenciaram perfis cromatográficos (CCD e CLAE) similares principalmente no que diz respeito aos compostos: ácido *p*-cumárico, pico 4 (não identificado), pico 5 (não identificado), crisina, pico 13 (não identificado) e artepillin C. Por último, no terceiro grupo temos a presença de amostras originárias das quatro estações em estudo, entretanto, se observarmos a formação dos clusters menores dentro do grupo, vemos o agrupamento de amostras da mesma estação.

Tomados em conjunto, os resultados das análises cromatográficas, i.e., CCD e CLAE, e quimiométrica aplicados ao conjunto de dados de CLAE para fenólicos, sugerem que a principal origem botânica para a própolis produzida no município de São Joaquim, em especial durante a estação de verão, é *Baccharis dracunculifolia*. Ao contrário da própolis encontrada em zonas temperadas, onde as resinas de álamo (*Populus nigra*) predominam como fonte à produção de própolis, no Brasil há maior número de espécies vegetais fontes de resinas à produção de própolis, dificultando a elucidação sobre o critério de escolha das abelhas das fontes resiníferas (BANKOVA et al., 1998).

Figura 30 - Análise de componentes principais (PCA) e escores de dispersão de dados cromatográficos (CLAE) de extratos hidroalcoólicos de própolis (EtOH 70%) coletadas em 2014 (verão, outono, inverno e primavera) e 2015 (verão e outono).

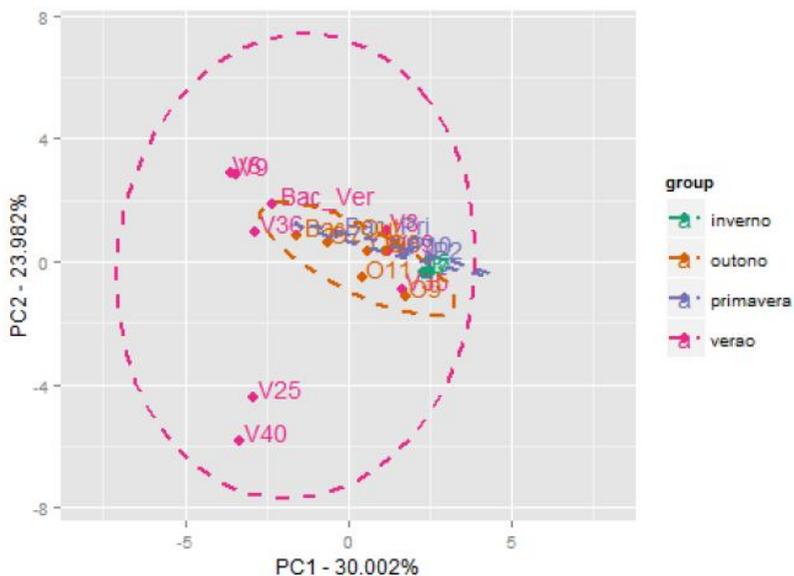
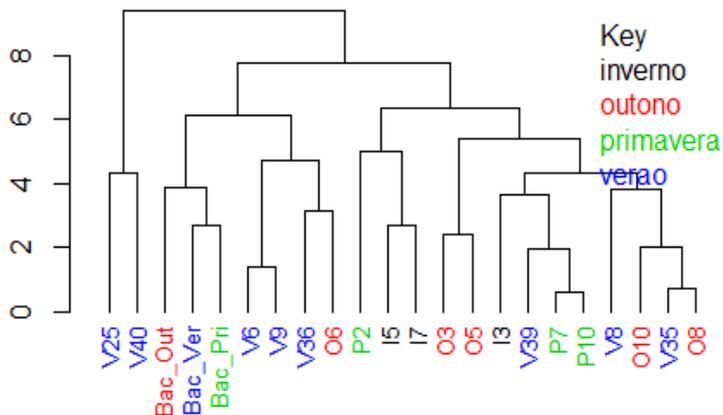


Figura 31 - Análise hierárquica de cluster (método UPGMA) de dados cromatográficos (CLAE) de extratos hidroalcoólicos de própolis (EtOH 70%) coletadas no verão/2014 e 2015, outono/2014 e 2015, inverno/2014 e primavera/2014.



A relação entre o perfil químico da própolis com a sazonalidade também foi estudada por Nunes e Guerreiro (2012), onde oito classes comerciais de própolis verde tiveram seus perfis químicos determinados por técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massa (HS-GC/MS e LC/MS), analisados via análise exploratória multivariada. A análise de componentes principais (PCA) dos compostos identificados permitiu a separação das amostras em três grupos principais, de acordo com suas respectivas estações de coleta, i.e., verão, primavera e outono. Os autores detectaram diferenças nos perfis de compostos voláteis e polifenólicos das amostras de própolis ao longo das estações. Composições químicas semelhantes foram observadas às amostras de própolis de alta qualidade ao longo de todas as estações estudadas, enquanto maiores discrepâncias quali/quantitativas foram detectadas nos perfis químicos das amostras de própolis de baixa qualidade. Durante a primavera e no verão também foi observado que a própolis de qualidade mais baixa apresentou uma composição similar à própolis de qualidade superior.

Os compostos majoritários encontrados nos EHs da própolis do município de São Joaquim mostraram-se heterogêneos em sua composição química de acordo com a estação do ano. Este resultado era esperado, uma vez que a composição daquela biomassa está diretamente relacionada ao metabolismo da planta doadora da resina, o qual sabidamente responde aos efeitos de variação sazonal de fatores (a)bióticos. Ademais, é possível considerar que *Apis mellifera* tenha, em dada condição ecológica, mais de uma fonte de resina vegetal à produção da própolis.

Ao longo das estações de verão e outono, o ácido 4-hidroxi-3, 5-diprenil cinâmico (Artepillin C) foi identificado nos EHs como um dos compostos majoritários. De forma concordante, este composto foi identificado como majoritário por Castro et al. (2007) em própolis produzida no estado de Minas Gerais, para além dos ácidos cumárico, ferrúlico e canferide. Os ácidos cumárico e cinâmico e a Artepillin C também foram identificados em própolis por Simões-Ambrosio et al. (2010) que avaliaram o efeito da sazonalidade ao longo de um ano na composição química daquela biomassa produzida na região de Cajuru, São Paulo. Tais compostos, foram detectados em amostras coletadas em quase todos os períodos amostrais, diferindo apenas quantitativamente. Artepillin C foi detectada em maiores teores nas amostras coletadas nos meses de novembro e dezembro. De modo geral, os compostos prenilados e derivados de ácido cinâmico foram identificados como as

substâncias mais abundantes em amostras de própolis para a região sul e sudeste do Brasil (MARCUCCI et al., 2000).

Para as amostras de própolis coletadas nas estações de primavera e inverno no município de São Joaquim, os teores de Artepillin C apresentaram-se com concentrações muito baixas ou inexistentes. Todavia, entre os compostos identificados, a quercetina se destacou como o composto majoritário em pelo menos duas amostras de inverno e com teores relevantes nas amostras de primavera. A quercetina corresponde a um flavonoide comumente encontrado na própolis europeia (MARCUCCI et al., 1998b). Ademais, um estudo recente objetivou determinar os efeitos do extrato hidro-alcoólico de própolis, coletado no outono (2010) em Santa Catarina, sobre a angiogênese de células endoteliais, utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*. As culturas de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) foram utilizadas para avaliar os efeitos da própolis na viabilidade, proliferação, e migração de células, bem como a formação do tubo capilar, verificando-se que o extrato de própolis diminuiu significativamente os parâmetros avaliados. Através das análises de CLAE, RMN-1D e 2D foi possível identificar a quercetina como o componente majoritário para a classe de flavonoides e os ácidos gálico, protocatecuico e clorogênico como compostos predominantes de ácido fenólicos (MENEGHELLI et al., 2013). A quercetina também foi encontrada em estudos de composição química e origem botânica da própolis vermelha do Brasil, típica dos estados da Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco e Paraíba. Tal própolis tem origem de exudatos resinosos de coloração vermelha, secretado a partir da espécie vegetal *Dalbergia escastophyllum* (DAUGSCH et al., 2008). Outro estudo relacionando amostras de própolis produzidas no sul do Brasil com um perfil químico similar à própolis europeia, identificou uma composição rica em flavonoides, contendo pinobancsina, pinocembrina, pinobancsina 3-acetato, crisina e galangina (PARK et al., 2002b).

Nesse trabalho o ácido fenólico mais frequente nas amostras de própolis analisadas foi o ácido *p*-cumárico, um composto identificado como um dos marcadores à própolis verde de Minas Gerais por Marcucci (2006). Além das propriedades antioxidantes e quimioprotetoras, o ácido *p*-cumárico também atua como percussor de fenilpropanóides, entre eles a Artepillin C comumente encontrada na própolis verde (MARCUCCI et al., 2000). A pinocembrina foi outra substância de destaque neste estudo, estando presente ao longo das quatro estações estudadas. Anteriormente, a pinocembrina foi identificada em amostras de própolis do município de Santa Cruz em

Santa Catarina, com origem botânica relacionada a espécie vegetal *Populus alba*, uma planta exótica para região, porém que é considerada a maior doadora de resina à produção de própolis no hemisfério norte (PARK et al., 2002a). A pinocembrina também foi detectada em amostras de própolis do estado do Rio Grande do Sul, que além dessa substância, apresentou a crisina, acacetina e a galangina como componentes majoritários (KOO et al., 1999).

Estudos sobre composição química da própolis e de substâncias resinosas coletadas por abelhas *Apis mellifera* tem sido relatado por diversos autores. Alencar et al. (2005) prospectaram o perfil químico da própolis e de *Baccharis dracunculifolia* produzidos nos estados de São Paulo e Minas Gerais, através de análises de espectrofotometria de UV-Visível, cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e, cromatografia gasosa. Os autores detectaram características comuns entre a planta e a própolis, tais como a alta proporção de Artepillin C e outros derivados do ácido cinâmico. Além disso, a cromatografia em camada delgada identificou perfis semelhantes entre os extratos de própolis e da espécie vegetal quando irradiado a 366nm. Com base em todas as evidências fitoquímicas encontradas, a espécie *B. dracunculifolia* foi identificada como a principal fonte de resina para a produção das própolis nos estados de São Paulo e Minas Gerais. O composto denominado de Artepillin C corresponde a um fenilpropanoide prenilado (4-hidroxicinâmico 3,5-ácido diprenil) com alto valor no mercado (BANKOVA et al., 2000), possuindo uma série de efeitos benéficos à saúde humana, entre eles o tratamento de tumores (KUMAZAWA et al., 2003; PARK et al., 2004). De interesse, ressalta-se, portanto que a principal fonte de Artepillin C está relacionada a uma planta nativa do Brasil, i.e., *Baccharis dracunculifolia* (ALENCAR et al., 2005; HATA et al., 2012).

Outro estudo envolvendo a composição química e origem botânica da própolis vermelha do nordeste brasileiro observou o comportamento de abelhas *A. mellifera* na coleta de exudados resinosos de coloração vermelha em *Dalbergia ecastophyllum* (Leguminosae). Os flavonoides presentes na própolis vermelha e nos exudados resinosos foram investigados através de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RF-CLAE) e cromatografia em camada delgada de fase reversa (RF-CCD). Perfis cromatográficos idênticos foram observados para própolis e para o material resinífero vegetal, indicando claramente ser *D. ecastophyllum* a origem botânica daquela própolis (DAUGSCH et al., 2008).

7 CONCLUSÕES

A *Baccharis dracunculifolia* foi identificada como espécie preferencial pelas abelhas *Apis mellifera* na coleta de resina vegetal para a produção de própolis em São Joaquim.

O Artepillin C foi identificado como composto majoritário nas amostras de própolis das estações de verão e outono.

Verificou-se que outras espécies vegetais, não identificadas taxonomicamente, também são doadas de resina à produção de própolis na região em estudo, especialmente durante as estações de primavera e inverno.

As análises de varredura de UV-visível, quimiométricas e de bioinformática permitiram identificar o efeito da sazonalidade no perfil químico da própolis de São Joaquim (SC).

Verificou-se que a região espectral de absorção dos compostos fenólicos ($\lambda = 280-400 \text{ nm}$) foi a mais determinante para os modelos de classificação obtidos, sendo que o melhor algoritmo para a análise preditiva de sazonalidade foi a árvore de decisão (rpart).

Apesar dos conteúdos de compostos fenólicos totais, flavonoides e bálsamo apresentarem significativas flutuações ao longo das estações estudadas, os valores observados situaram-se acima dos mínimos exigidos pelo MAPA.

A própolis produzida no município de São Joaquim, especialmente na estação de verão, mostrou-se com potencial elevado para uma produção de própolis visando conteúdos superiores de Artepillin C. Adicionalmente, este tipo de própolis apresentou elevada qualidade ao longo todas as estações estudadas, inferindo perspectivas promissoras para a sua produção e comercialização na região.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M.; NAKAJIMA, S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.58, n.5, p.945–946, 1994.
- AGUERO, M. B.; SVETAZ, L.; SÁNCHEZ, M.; LUNA, L.; LIMA, B.; LÓPEZ, M. L.; ZACCHINO, S.; PALERMO, J.; WUNDERLIN, D.; FERESIN, G. E.; TAPIA, Argentinean Andean propolis associated with the medicinal plant *Larrea nitida* Cav. (Zygophyllaceae). HPLC–MS and GC–MS characterization and antifungal activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p.1970-1978, 2011.
- AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M.; ZHU, F.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1383-1392, 2007.
- ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L.; PAREDES-GUZMÁN, J. F.; PARK, Y. K. Chemical composition of *Baccharis dracunculifolia*, the botanical source of propolis from the states of São Paulo and Minas Gerais, Brazil. **Ciência Rural**, v.35, p.909-915, 2005.
- BANKOVA V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v.2, p.29–32, 2005.
- BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p.3–15, 2000.
- BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G., POPOV, S., SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, v.4, p.361-367, 1998.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J. K.; MATSUSHIGE, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**, v.61, p.896-900, 1998.

BARROSO, G.M.; O.L. BUENO. **Plantas Compostas- Subtribo: Baccharidinae. Flora Ilustrada Catarinense**, 2002. 304 p.

BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. *Journal of Chemometrics*, v. 17, p.166-173, 2003.

BASTOS, E. M. A. F.; SANTANA, R. A.; CALAÇA-COSTA, A. G. F.; THIAGO, P. S. Interaction between *Apis mellifera* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC, that favours green propolis production in Minas Gerais. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 3, p.727-734, 2011.

BAUER, R.; TITTEL, G. Quality Assessment of Herbal Preparations as a Precondition of Pharmacological and Clinical Studies. **Phytomedicine**, v.2, n.3, p. 193-198, 1996.

BELEITES, C. **Import and Export of Spectra Files**, p.1–20, 2011.
BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2015). Indicação Geográfica (IG). Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/desenvolvimento-sustentavel/indicacao-geografica>>. Acesso em: 10 agosto 2015.

BRASIL. Portaria nº 1138, de 13 de maio de 2011. **Institui denominação de origem no estado de minas gerais no âmbito da produção de própolis verde**. Instituto Mineiro de Agropecuária, 2011.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v.56, p.317-333, 1998.

BREIMAN, L.; FRIEDMAN, J.; STONE, C. J.; OLSHEN, R. A. **Classification and Regression Trees**. Chapman and Hall, 1984. 368 p.

CABRAL, I. S. R. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira**. 2008. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2008.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEM, 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. 1512-1517, 2007.

CHITARRA, M. I. F. CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de Frutas e Hortaliças: Fisiologia e Manuseio**. Lavras: UFLA, 2005. 783p.

COSTA, P.S.C. **Produção e Processamento de Própolis e Cera**. 1. ed. Viçosa: Centro de Produções Técnicas, 2007. 216p.

COVER, T.; HART, P. Nearest neighbor pattern classification. **IEEE Transactionson Information Theory**, v. 13, p.21–27, 1967.

DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian red propolis - Chemical composition and botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.5, n. 4, p.434-441, 2008.

EBDA - EMPRESA BAIANA DE DESENVOLVIMENTO AGRÍCOLA (2011). **EBDA estimula produção de própolis vermelha no Sul da Bahia**. Disponível em: <<http://www.conquistanews.com.br/ebda-estimula-producao-de-propolis-vermelha-no-sul-da-bahia/>>. Acesso em: 03 agosto 2015.

FERRACINI, V.; PARAIBA, L. C.; LEITÃO FILHO, A. G.; DA SILVA, L. R.; NASCIMENTO, E; MARSAIOL, A. J. Essencial oils of seven Brazilian *Baccharis* species. **Journal of Essential Oil Research**, v.7, p.355-367, 1995.

FIGUEIREDO, A. S. G. **Efeito da sazonalidade no perfil químico e na atividade antioxidante de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) e ação modulatória desta planta sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos**. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo, Centro de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2010.

FRIZZARINI, C. **Algoritmo para Indução de Árvores de Classificação para Dados Desbalanceados**. 2013. 96f. Dissertação (Mestrado em Sistemas de Informação), Universidade de São Paulo, Escola de Artes, Ciências e Humanidades. São Paulo, 2013.

FUJIMOTO, T.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M. Diversity of propolis. Part 1. Propolis from the world. **Honeybee Science**, v.22, p.9–16, 2001.

GALVÃO, S. D. C. O.; JÚNIOR, E. R. H. Ponderação do Knn utilizando-se de métodos tradicionais de seleção de atributos. **da Vinci**. v. 1. n.1, p.115-125, 2004.

GARDANA, C.; SCAGLIANTI, M.; PIETTA, P.; SIMONETTI, P. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v.45, p.390-399, 2007.

GHISALBERTI, E.L. Propolis—review. **Bee World**, v.60, p.59–84, 1979.

GHISALBERTI, E.L.; JEFFERIES, P.R.; LANTERI, R.; MATISONS, J. Constituents of propolis. **Experientia**, v.34, p.157-158, 1978.

GIULIETTI, A. M.; MENEZES, N.L.; PIRANI, J.R.; MEGURO, M.; WANDERLEY, M.G.L. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: caracterização e lista das espécies. **Boletim de Botânica**, v.9, p.1 - 151, 1987.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GONZÁLEZ-ZAMORA, A. G.; SIERRA-CAMPOS, E.; PÉREZ-MORALES, R.; VÁZQUEZ-VÁZQUEZ, C.; ROBLES-GALLEGOS, M. A.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, J. D.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, J. L. Measurement of Capsaicinoids in Chiltepin Hot Pepper: A Comparison Study between Spectrophotometric Method and High Performance Liquid Chromatography Analysis. **Journal of Chemistry**, v.2015, p.1-11, 2015.

HANSON, B. A. **ChemoSpec: An R Package for Chemometric Analysis of Spectroscopic Data and Chromatograms (Package Version 2.0-2)**, p.1–41, 2014.

HATA, T.; TAZAWA, S.; OHTA, D.; RHYU, M.; MISAKA, T.; ICHIHARA, K. Artepillin C, a major ingredient of Brazilian propolis, induces a pungent taste by activating TRPA1 Channels. **PLoS ONE**, v.7, p.1-9, 2012.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (2015). **São Joaquim: Dados gerais do município**.

Disponível em:

<<http://cidades.ibge.gov.br/painel/painel.php?codmun=421650>>. Acesso em: 20 agosto 2015.

ISLA, M. I.; MORENO, M. I. N.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 2, p. 165-170, 2001.

ITO, J.; CHANG, F.R.; WANG, H.K.; PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; KILGORE, N.; LEE, H. K. Anti-AIDS Agents. 48 Anti-HIV Activity of Moronic Acid Derivatives and the New Melliferone-Related Triterpenoid Isolated from Brazilian Propolis. **Journal of Natural Products**, v.64, p.1278–1281, 2001.

JULIÃO, G.R.; FERNANDES, G.W.; NEGREIROS, D.; BEDÊ, L.; ARAÚJO, R.C. Insetos galhadores associados a duas espécies de plantas invasoras de áreas urbanas e peri - urbanas. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.49, p.97 - 106, 2005.

JÚNIOR, A. F.; LOPES, M. M. R.; COLOMBARI, V.; MONTEIRO, A. C. M.; VIEIRA, E. P. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.1, p.294-297, 2006.

KIMOTO, T.; ARAI, S.; KOHGUCHI, M.; AGA, M.; NOMURA, Y.; MICALLEF, M.J.; KURIMOTO, M., MITO, K. Apoptosis and suppression of tumor growth by artepillin C extracted from Brazilian propolis. **Cancer Detection and Prevention**, v.22, p.506–515, 1998.

KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; SATTTLER, A. Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. **Caries Research**, v.5, n.33, p.393-400, 1999.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v.64, n.3, p. 235–240, 1999.

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

KUMAZAWA, S.; HAYASHI, K.; KAJIYA, K.; ISHII, T.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Studies of the constituents of Uruguayan propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.4777–4782, 2002.

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. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.51, p.740-742, 2003.

LIMA, K. G. **Efeito de variáveis ambientais, rainhas selecionadas e sistemas coletores na produção de própolis por abelhas africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apoidea)**. 2005. 73 f. Tese (Doutorado), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2005.
Lima, M.G. **A produção de própolis no Brasil**. São Paulo: São Sebastião, 2006. 120 p.

LOTFY, M. Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.7, p.22-31, 2006.

MAPA. **Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001**. Aprovar os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Brasília, 2001.

MARASCHIN, M.; SOMENSI-ZEGGIO, A.; OLIVEIRA, S. K.; KUHNEN, S.; TOMAZZOLI, M. M.; ZERI, A. C. M.; CARREIRA, R.; ROCHA, M. A Machine Learning and Chemometrics Assisted Interpretation of Spectroscopic Data – A NMR- Based Metabolomics Platform for the Assessment of Brazilian Propolis. **Lecture Notes In Computer Science**, v. 7632, p.129-140, 2012.

- MARCUCCI, M. C. Própolis Tipificada: um novo caminho para a elaboração de medicamentos de origem natural, contendo este produto apícola. **Revista Fitos**, v. 1, n. 3, p.36-46, 2006
- MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; CUSTÓDIO, A. R.; FERREIRA, M. M.; BANKOVA, V. S.; GARCÍA-VIGUEIRA, C. BRETZ, W. A. Evaluation of phenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 1-2, n. 55, p.76-81, 2000.
- MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. **Mensagem doce**, v. 46, 1998a.
- MARCUCCI, M.; RODRIGUEZ, J.; FERRERES, F. Chemical composition of Brazilian propolis from São Paulo State. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 3, p. 117-119, 1998b.
- MARCUCCI, M.C. Biological and therapeutic properties of chemical propolis constituents. **Química Nova**, v.19, p.529-336, 1996.
- MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v.26, p.83-99, 1995.
- MARKHAM, K.R.; MITCHELL, K.A.; WILKINS, A.L.; DALDY, J.A.; LU Y. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis, **Phytochemistry**, v.42, n.1, p.205–211, 1996.
- MATSUNO T. **O efeito terapêutico da propolis**. New York: Columbia, 1997a.
- MATSUNO, T., MATSUMOTO, Y., SAITO, N., MORIKAWA, J. Isolation and characterization of cytotoxic diterpenoid isomers from propolis. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v.52, p.702–704, 1997b.
- MENDONÇA, R.C.; FELFILI, J.M.; WALTER, B.M.T.; SILVA, M.C.; REZENDE, A.R.; FIGUEIRAS, T.S.; NOGUEIRA, P.E., FAGG, C.W. **Flora vascular do bioma Cerrado: checklist com 12356 espécies**. 2. Ed.Cerrado: Ecologia e Flora - Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p.423 - 1279.

MENEGHELLI, C.; JOAQUIM, L. S. D.; FÉLIX, G. L. Q.; SOMENSI, A.; TOMAZZOLI, M.; SILVA, D. A.; BERTI, F. V.; VELEIRINHO, M. B. R.; RECOUVREUX, D. O. S.; ZERI, A. C. M.; DIAS, P. F.; MARASCHIN, M. Southern Brazilian autumnal propolis shows anti-angiogenic activity: an in vitro and in vivo study. **Microvascular Research**, v. 88, p.1-11, 2013.

MORAIS, D.C.S.; MORAIS, B.C.S.; MENEZES JUNIOR, J.V.; GUSMÃO, C.M.G. Sistema Móvel de Apoio a Decisão Médica Aplicado ao Diagnóstico de Asma - InteliMED. **VIII Simpósio Brasileiro de Sistemas de Informação**, São Paulo, 2012.

MORESCO, R.; UARROTA, V. G.; PEREIRA, A.; TOMAZZOLI, M. M.; NUNES, E. C.; PERUCH, L. A. M.; COSTA, C.; ROCHA, M.; MARASCHIN, M. Carotenoid Analysis of Cassava Genotypes Roots (*Manihot Esculenta* Crantz) Cultivated in Southern Brazil Using Chemometric Tools. **Advances in Intelligent Systems and Computing**, v. 375, p. 11-18, 2015.

NEGREIROS, D.; ESTEVES, D.; FERNANDES, G. W.; VICHATO, M.; OKI, Y.; ROSA, B. M. D. **Desenvolvimento de plântulas de *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae) em um gradiente nutricional**. Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil, São Lourenço (MG), 2009.

NUNES, C. A.; GUERREIRO, M. C. Characterization of Brazilian green propolis throughout the seasons by headspace GC/MS and ESI-MS. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.92, p.433–438, 2012.

NUNES, L. C. C.; GALINDO, A. B.; DEUS, A. S. O.; RUFIO, D. A.; RANDAU, K. P.; XAVIER, H. S.; CITÓ, M. G. L.; NETO, P. J. R. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p.46-50, 2009.

OLIVEIRA, V.D.C.; BASTOS, E.M. Aspectos morfo-anatômicos da folha de *Baccharis dracunculifolia* Dc. (Asteraceae) visando à identificação da origem botânica da própolis. **Acta Botanica Brasilica**, v.12, p.431-439, 1998.

OLSZEWSKA, M. A. Variation in the phenolic content and in vitro antioxidant activity of *Sorbus aucuparia* leaf extracts during vegetation. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 68, n.6, p. 937-944, 2011.

PAGANOTTI, R. S. N.; REZENDE, J. C.; BARBEIRA, P. J. D. Discrimination Between Producing Regions of Brazilian Propolis by UV-VIS Spectroscopy and Partial Least Squares Discriminant Analysis. **Current Analytical Chemistry**, v. 10, p.537-544, 2014.

PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.1100-1103, 2004.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.2502-2506, 2002a.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; AGUIAR, C. L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v.32, p.997-1003, 2002b.

PARK, Y. K.; KOO, M. H.; IKEGAKI, M.; CONTADO, J. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. **Arquivos de biologia e tecnologia**, v. 40, p. 97-106, 1997.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO NETO, F. R. Propolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v.25, n.2, p. 321–326, 2002.

POPOVA, M; BANKOVA, V.; BUTOVSKA, D.; PETROV, V.; DAMYANOVA, B. N.; SABATINI, G.; MARCAZZAN, L.; BOGDANOV, D. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar- type propolis. **Phytochemical Analysis**, v.5, p.235-240, 2004.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, p. 755-760, 2006.

SALATINO, A. TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2, p.33-38, 2005.

SALOMÃO, K.; DANTAS, A. P.; BORBA, C. M.; CAMPOS, L. C.; MACHADO, D. G. AQUINO NETO, F. R.; DE CASTRO, S. L. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. **Letters in Applied Microbiology**, v.38, p.87-92, 2004.

SEAPA-MG. SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO DE MINAS GERAIS (2012).

Minas fortalece produção de própolis verde para aumentar exportação. Disponível em:

<<http://www.agricultura.mg.gov.br/servicos/story/1476-minas-fortalece-producao-de-propolis-verde-para-aumentar-exportacao>>. Acesso em: 03 agosto 2015.

SEELEY, T. D.; MORSE, R. A. The nest of the honey bee (*Apis mellifera* L.). **Insectes Sociaux**, v.23, n.4, p.495-512, 1976.

SFORCIN, J. M.; SOUSA, J. P. B.; FILHO, A. A.; BASTOS, J. K.; BÚFALO, M. C.; TONUCCI, L. R. S. **Baccharis dracunculifolia: uma das principais fontes vegetais da própolis brasileira**. 1. ed. São Paulo: Editora Unesp, 2012. 100p.

SHI, H.; YANG, H.; ZHANG, X.; YU, L. Identification and quantification of phytochemical composition and anti-inflammatory and radical scavenging properties of methanolic extracts of chinese propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60(50), p. 12403-12410, 2012.

SHETTY, N. P.; LYNGS, H. J. J.; JENSEN, J. D.; COLLINGE, D. B.; SHETTY, S. Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. **Europeans Journal of Plant Pathology**, v. 121, p. 267-280, 2008.

SILICI, S., KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of Ethnopharmacology**, v.99, p.69–73, 2005.

SILVA, R.A.; RODRIGUES, A. E.; RIBEIRO, M. C. M. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, p.1842-1848, 2006.

SIMÕES-AMBROSIO, L.M.C.; GREGÓRIO, L.E.; SOUSA, J.P.B.; FIGUEIREDO-RINHEL, A.S.G.; AZZOLINI, A.E.C.S.; BASTOS, J.K.; LUCISANO-VALIM, Y.M. The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. **Fitoterapia**, v.81, p.1102–1108, 2010.

SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, M. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2.ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2000.

SOUSA, P.B.; NIEGE, A. J. C.; FURTADO, R. J.; SOARES, A. E. E.; BASTOS, J. K. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 17, p.85-93, 2007.

SOUSA, J. P.B.; LEITE, M. F.; JORGE, R. F.; RESENDE, D. O.; FILHO, A. A. S.; FURTADO, N. A. J. C.; SOARES, A. E. E.; SPADARO, A. C. C.; MAGALHÃES, P. M.; BASTOS, J.K. Seasonality Role on the Phenolics from Cultivated *Baccharis dracunculifolia*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2011, p. 1-8, 2011.

SOUZA, E. A.; INOUE, H. T.; GOMES, S. M. A.; FUNARI, S. R. C.; ORSI, R. O. Propriedade físico-química da própolis em função da sazonalidade e método de produção. **Archivos de zootecnia**. v. 59, n. 228, p.571-576, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, F. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: ARTMED, 2004. 719p.

TEIXEIRA, E. W. NEGRI, G.; MEIRA, R. M.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v.2, p.85-92, 2005.

THOMÉ, V. M. R.; ZAMPIERI, S.; BRAGA, H. J.; PANDOLFO, C.; SILVA JÚNIOR, V. P. B.; LAUS NETO, J.; SOLDATELI, D.; GEBLER, E.; ORE, D.; ECHEVERRIA, L.; MATTOS, M.; SUSKI, P. P. **Zoneamento Agroecológico e Socioeconômico de Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri, 1999. v1000. p.1000. CD-ROOM.

TOMAS-BARBERAN, F. A.; GARCIA-VIGUERA, C.; VIT-OLIVIER, P.; FERRERES, F.; TOMAS-LORENTE, F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. **Phytochemistry**, v.34, n.1, p.191-196, 1993.

TORETI, V. C.; SATO, H. H.; PASTORE, G. M.; PARK, Y. K. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2013, p.1-13, 2013.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M. C.; MIORIN, P. L.; PASIN, F. D. R.; TSVETKOVA, I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.3, n.2, p. 249–254, 2006.

TSAO, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. **Nutrients**, v.2, p.1231-1246, 2010.

VICINI, L.; Souza, A. M. **Análise multivariada da teoria à prática**. Santa Maria, Brasil: UFSM, 2005.

WATSON, D.G.; PEYFOON, E.; ZHENG, L.; LU, D.; SEIDEL, V.; JOHNSTON, B.; PARKINSON, J.A.; FEARNLEY, J.: Application of principal components analysis to ¹H-NMR data obtained from propolis samples of different geographical origin. **Phytochemical Analysis**, v.17, p.323–331, 2006.

WOLLENWEBER, E; BUCHMANN, S.L. Feral honeybees in the Sonoran Desert: Propolis sources other than poplars (*Populus* spp.). **Zeitschrift für Naturforschung C**, v.52, p.530-535, 1997.

XU, Y.; LUO, L.; CHEN, B.; FU, Y. Recent development of chemical components in propolis. **Frontiers of Biology in China**, v.4, n.4, p. 385–391, 2009.

ZEGGIO, A. R. S. **Estudo da própolis Catarinense, com ênfase na sua composição fenólica: uma estratégia a tipificação ao regional.** 2014. 101f. Doutorado (qualificação). Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2014.

APÊNDICES

Tabela suplementar 1: Dados meteorológicos disponibilizados pela Epagri/Ciram para os anos de 2014 e 2015 para o município de São Joaquim – SC.

Estação	Temp. média máxima (°C)	Temp. média mínima (°C)	Precipitação total (mm)	Velocidade do vento (km)	Umidade relativa (%)	Insolação (hs)
Verão (2014)	24,56	14,92	565,6	2,13	76,6	664,7
Outono (2014)	18,41	10,22	486,8	1,73	85,84	487,7
Inverno (2014)	15,68	6,64	634,0	2,64	79,14	450,6
Primavera (2014)	19,89	10,31	575,2	2,12	77,65	526,6
Verão (2015)	22,89	12,35	634,7	1,97	82,37	499,4
Outono(2015)	18,43	9,78	347,7	1,68	83,56	488,3

Script varredura de Uv-visível - PROSPECÇÃO DE FONTES BOTÂNICAS E AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SAZONALIDADE NO PERFIL QUÍMICO DA PRÓPOLIS DE SÃO JOAQUIM (SANTA CATARINA)

R script para análises de varredura de Uv-visível

```
uv.propmaira.metadata.file = "UV_meta_comp_prop_s_epagr.csv"
uv.propmaira.data.file = "data_uv_comp_prop_s_epagr.csv"

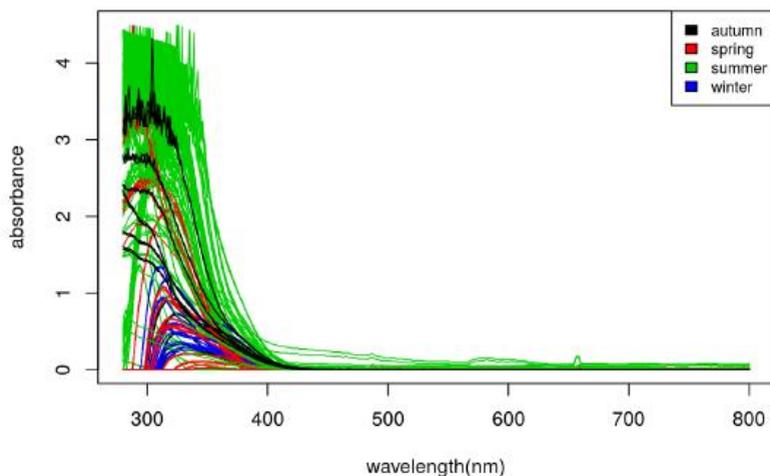
label.x = "wavelength(nm)"
label.val = "absorbance"
uv.propm.ds = read.dataset.csv(uv.propmaira.data.file, uv.propmaira.metadata.file,
                             description = "UV data for propolis", type = "uvv-spectr
a",
                             format = "row", label.x = label.x, label.values = labe
l.val,
                             sep.meta = ";", sep = ";")
uv.propm.ds = convert.to.factor(uv.propm.ds, "year")
indexes = which(uv.propm.ds$data > 100000, arr.ind = T)
indexes
uv.propm.ds$data[indexes]
uv.propm.ds$data[indexes] = 0
```

Inspeção preliminar dos dados

```
sum.dataset(uv.propm.ds)
```

```
## Dataset summary:
## Valid dataset
## Description: UV data for propolis
## Type of data: uvv-spectra
## Number of samples: 219
## Number of data points 521
## Number of metadata variables: 6
## Label of x-axis values: wavelength(nm)
## Label of data points: absorbance
## Number of missing values in data: 0
## Mean of data values: 0.2240798
## Median of data values: 0
## Standard deviation: 0.6750979
## Range of values: 0 4.5
## Quantiles:
## 0% 25% 50% 75% 100%
## 0.00 0.00 0.00 0.02 4.50
```

```
plot.spectra(uv.propm.ds, "seasons")
```



```
table(uv.propm.ds$metadata$seasons)
```

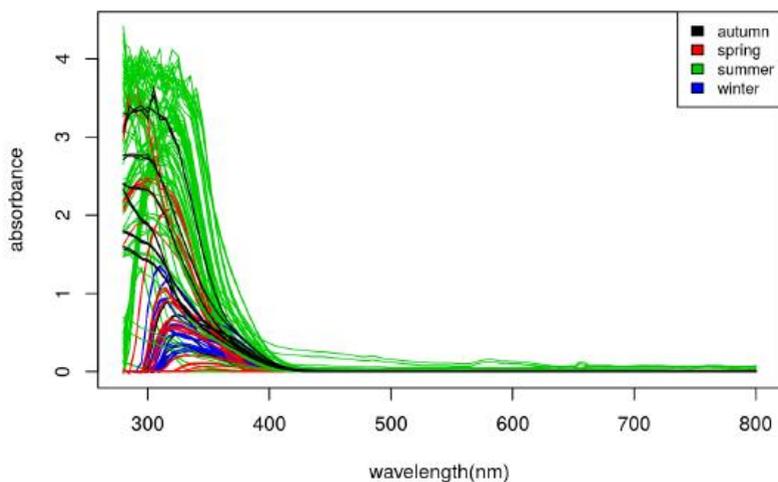
```
##
## autumn spring summer winter
## 33 42 108 36
```

```
uv.propm.sc = metabolomicsUM::scaling(uv.propm.ds)

uv.propm.wavelens = get.x.values.as.num(uv.propm.ds)
x.axis.sm = seq(min(uv.propm.wavelens), max(uv.propm.wavelens), 5)
uv.propm.smooth = smoothing.interpolation(uv.propm.ds, method = "loess", x.axis = x.axis.sm)
```

```
## Loading required package: hyperSpec
## Loading required package: lattice
## Loading required package: grid
## Loading required package: ggplot2
## Loading required package: mvtnorm
## Package hyperSpec, version 0.98-20150304
##
## To get started, try
##   vignette("introduction", package = "hyperSpec")
##   package?hyperSpec
##   vignette(package = "hyperSpec")
##
## If you use this package please cite it appropriately.
##   citation("hyperSpec")
## will give you the correct reference.
##
## The project homepage is http://hyperspec.r-forge.r-project.org
```

```
uv.propm.smooth$metadata$seasons = factor(uv.propm.smooth$metadata$seasons, levels=c("autumn", "spring", "summer", "winter"))
plot.spectra(uv.propm.smooth, "seasons")
```



```
uv.propm.smooth.sc = metabolomicsSUM::scaling(uv.propm.smooth)

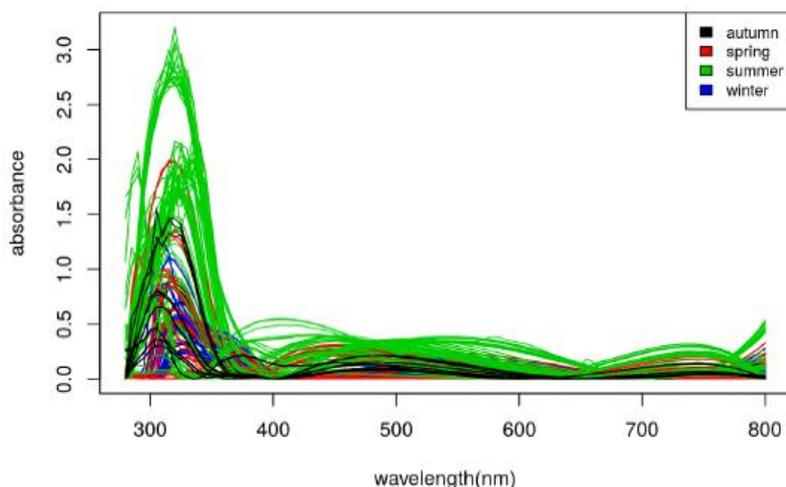
uv.propm.bg = data.correction(uv.propm.smooth, "background")
uv.propm.offset = data.correction(uv.propm.bg, "offset")
uv.propm.baseline = data.correction(uv.propm.offset, "baseline")
```

```
## Loading required package: baseline
##
## Attaching package: 'baseline'
##
## The following object is masked from 'package:stats':
##
##   getCall
```

```
sum.dataset(uv.propm.baseline)
```

```
## Dataset summary:
## Valid dataset
## Description: UV data for propolis-smoothed with hyperSpec spc.loess; background cor
rection; offset correction; baseline correction
## Type of data: undefined
## Number of samples: 219
## Number of data points 105
## Number of metadata variables: 6
## Label of x-axis values: wavelength(nm)
## Label of data points: absorbance
## Number of missing values in data: 0
## Mean of data values: 0.1620225
## Median of data values: 0.05383692
## Standard deviation: 0.3311234
## Range of values: -0.003467899 3.206558
## Quantiles:
##          0%          25%          50%          75%          100%
## -0.003467899 0.015854277 0.053836917 0.167053610 3.206557549
```

```
plot.spectra(uv.propm.baseline, "seasons")
```

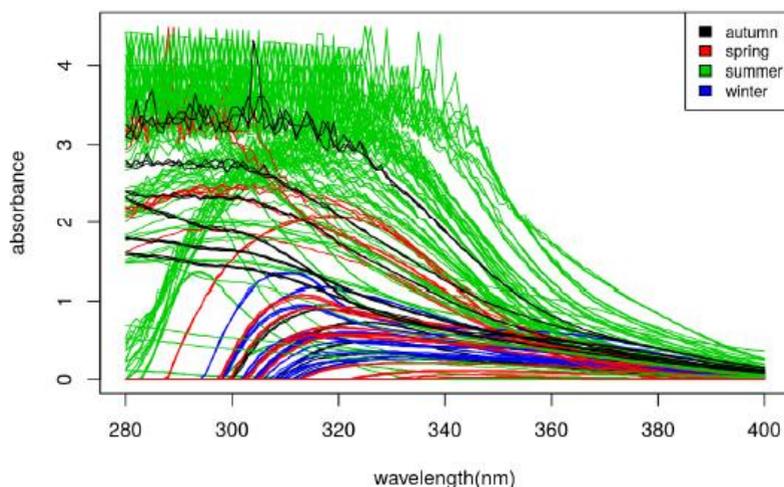


** Região de absorção de fenólicos**

```
uv.propm.pheno = subset.x.values.by.interval(uv.propm.ds, min.value = 280, max.value =
400)
sum.dataset(uv.propm.pheno)
```

```
## Dataset summary:
## Valid dataset
## Description: UV data for propolis
## Type of data: uvv-spectra
## Number of samples: 219
## Number of data points 121
## Number of metadata variables: 6
## Label of x-axis values: wavelength(nm)
## Label of data points: absorbance
## Number of missing values in data: 0
## Mean of data values: 0.9478094
## Median of data values: 0.42
## Standard deviation: 1.130949
## Range of values: 0 4.5
## Quantiles:
## 0% 25% 50% 75% 100%
## 0.00 0.11 0.42 1.52 4.50
```

```
uv.propm.pheno$metadata$seasons = factor(uv.propm.pheno$metadata$seasons,
                                          levels=c("autumn", "spring", "summer", "winter"))
plot.spectra(uv.propm.pheno, "seasons")
```



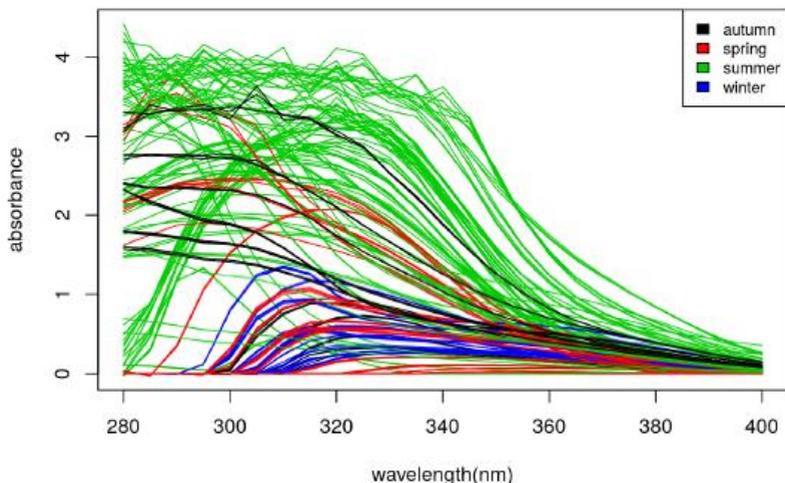
```

uv.propm.pheno.sc = metabolomicsSUM::scaling(uv.propm.pheno)

uv.propm.pheno.wavelens = get.x.values.as.num(uv.propm.pheno)

x.axis.sm = seq(min(uv.propm.pheno.wavelens), max(uv.propm.pheno.wavelens), 5)
uv.propm.pheno.smooth = smoothing.interpolation(uv.propm.pheno, method = "loess",
                                                x.axis = x.axis.sm)
uv.propm.pheno.smooth$metadata$seasons = factor(uv.propm.pheno.smooth$metadata$seasons,
                                                levels=c("autumn", "spring", "summer", "winter"))
plot.spectra(uv.propm.pheno.smooth, "seasons")

```



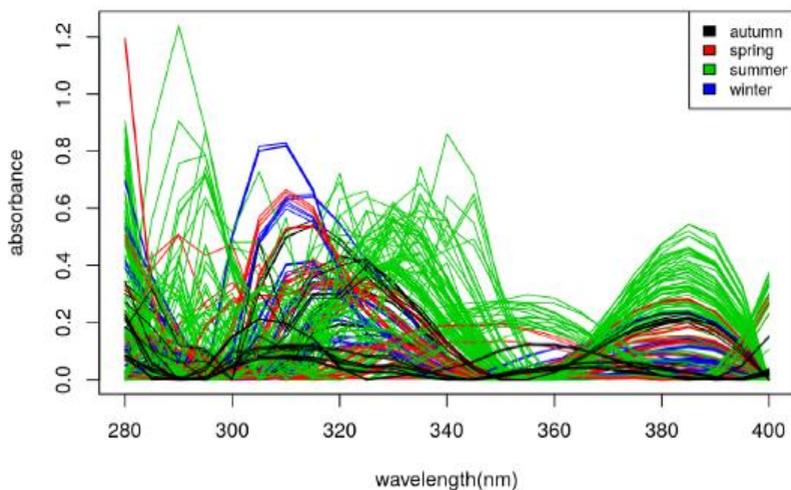
```

uv.propm.pheno.bg = data.correction(uv.propm.pheno.smooth, "background")
uv.propm.pheno.offset = data.correction(uv.propm.pheno.bg, "offset")
uv.propm.pheno.baseline = data.correction(uv.propm.pheno.offset, "baseline")
sum.dataset(uv.propm.pheno.baseline)

```

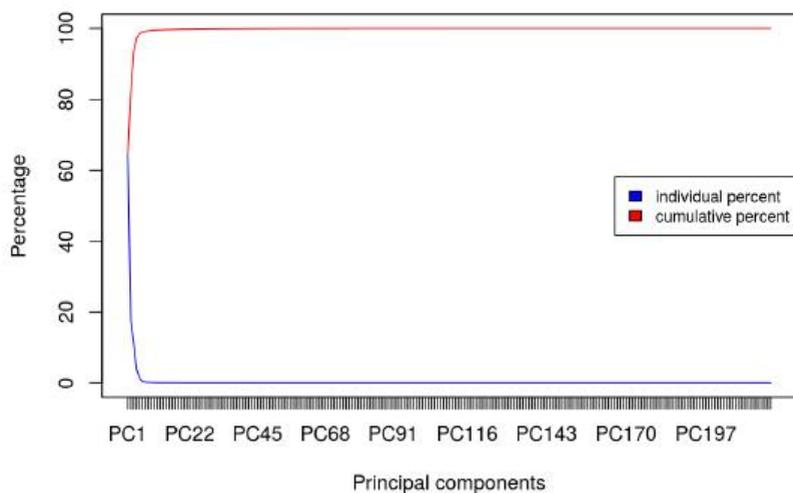
```
## Dataset summary:
## Valid dataset
## Description: UV data for propolis-smoothed with hyperspec spc.loess; background cor
rection; offset correction; baseline correction
## Type of data: undefined
## Number of samples: 219
## Number of data points 25
## Number of metadata variables: 6
## Label of x-axis values: wavelength(nm)
## Label of data points: absorbance
## Number of missing values in data: 0
## Mean of data values: 0.1229141
## Median of data values: 0.06609889
## Standard deviation: 0.1495509
## Range of values: -0.0005556006 1.238765
## Quantiles:
##          0%          25%          50%          75%          100%
## -0.0005556006 0.0138188123 0.0660988895 0.1800677399 1.2387648250
```

```
plot.spectra(uv.propm.pheno.baseline, "seasons")
```



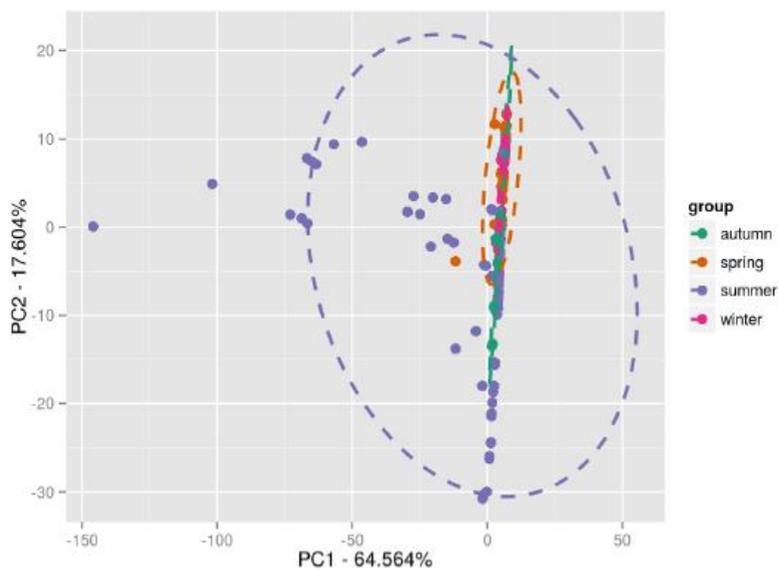
Análises Multivariadas - PCA e HCA

```
uv.propm.pca = pca.analysis.dataset(uv.propm.ds)
pca.screplot(uv.propm.pca)
```



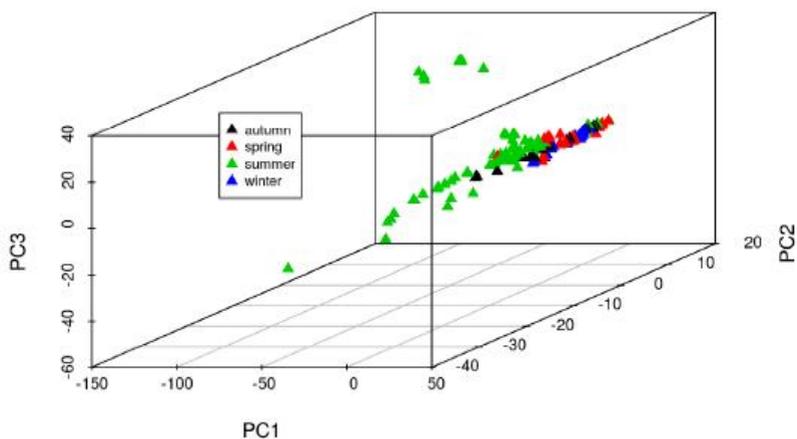
```
pca.scoresplot2D(uv.propm.ds, uv.propm.pca, "seasons", ellipses=T, palette=2)
```

```
## Loading required package: ellipse
```

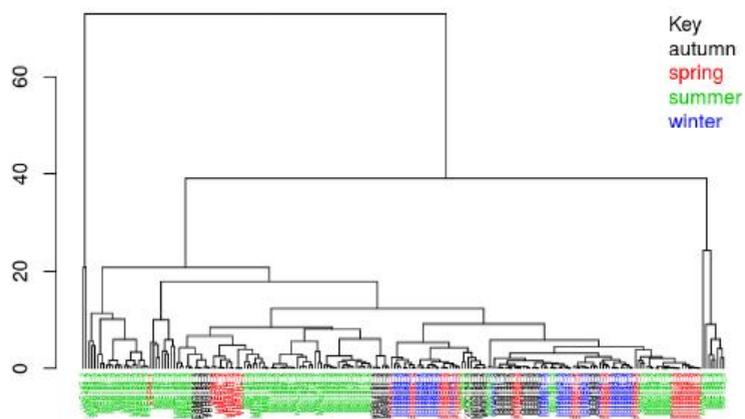


```
pca.scoresplot3D(uv.propm.ds, uv.propm.pca, "seasons")
```

```
## Loading required package: scatterplot3d
```

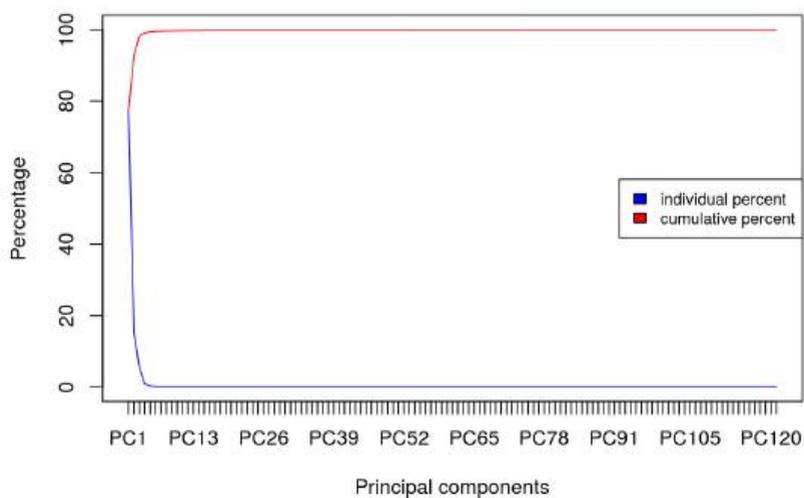


```
uv.propm.hc = clustering(uv.propm.smooth.sc, method = "hc", distance = "euclidean")  
dendrogram.plot.col(uv.propm.smooth.sc, uv.propm.hc, "seasons", lab.cex = 0.4)
```

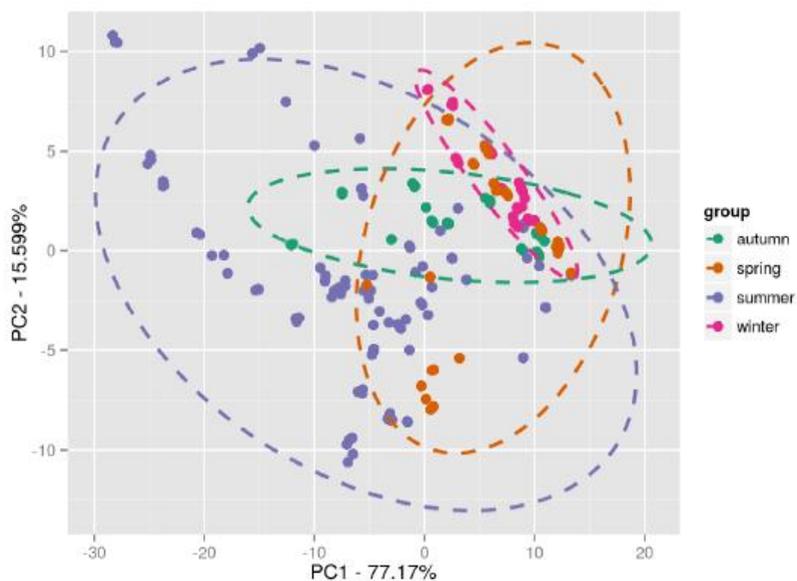


Região de absorção dos fenólicos

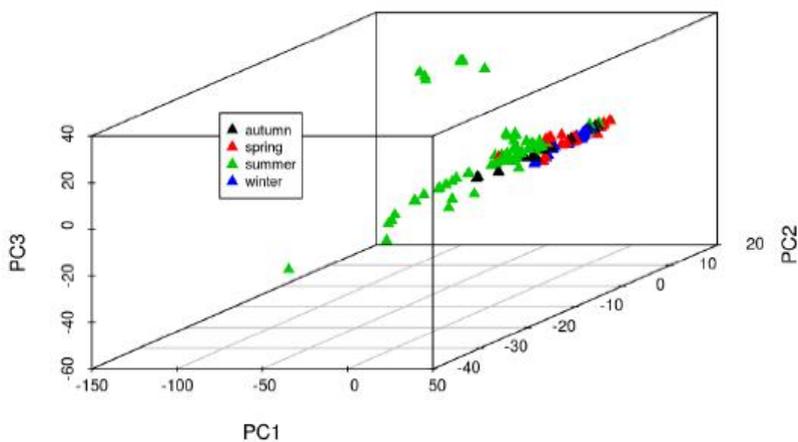
```
uv.prop.pheno.pca = pca.analysis.dataset(uv.propm.pheno)
pca.screepilot(uv.prop.pheno.pca)
```



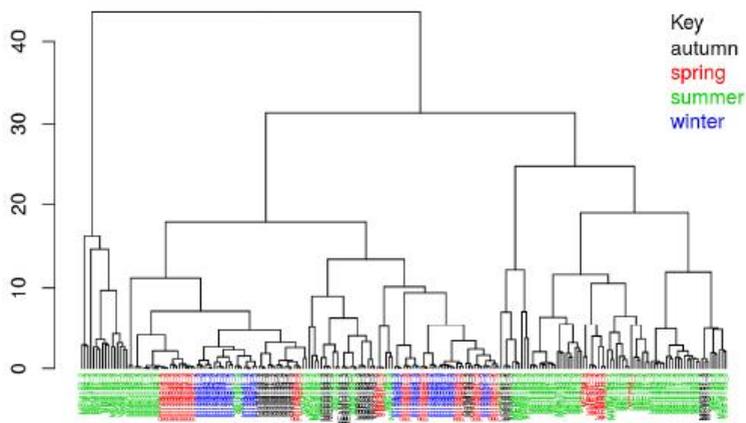
```
pca.scoresplot2D(uv.propm.pheno, uv.prop.pheno.pca, "seasons", ellipses=TRUE, pallett  
e=2)
```



```
pca.scoresplot3D(uv.propm.ds, uv.propm.pca, "seasons")
```



```
uv.propm.pheno.hc = clustering(uv.propm.pheno.sc, method = "hc", distance = "euclidean")
dendrogram.plot.col(uv.propm.pheno.sc, uv.propm.pheno.hc, "seasons", lab.cex = 0.4)
```



Machine Learning

```
uv.propm.ml.sc = train.models.performance(uv.propm.sc, c("pls", "knn", "rpart"),
"seasons", "repeatedcv")
```

```
## Loading required package: caret
## Loading required package: pls
##
## Attaching package: 'pls'
##
## The following object is masked from 'package:caret':
##
##   R2
##
## The following object is masked from 'package:baseline':
##
##   mvrValstats
##
## The following object is masked from 'package:stats':
##
##   loadings
##
## Loading required package: rpart
```

```
uv.propm.ml.sc$performance
```

```
##      Accuracy      Kappa AccuracySD      KappaSD
## pls  0.6963550 0.5452363 0.09629367 0.1419334
## knn  0.7831701 0.6843159 0.08078421 0.1157251
## rpart 0.8141805 0.7244673 0.07537452 0.1104571
```

```
uv.propm.ml.sc$conf
```

```
## $pls
## Cross-Validated (10 fold, repeated 10 times) Confusion Matrix
##
## (entries are percentages of table totals)
##
##           Reference
## Prediction autumn spring summer winter
##   autumn    6.4    0.3    0.9    0.0
##   spring     2.5    8.5    5.3    4.4
##   summer     1.4    5.4   42.7    0.0
##   winter     4.7    5.0    0.5   12.0
##
##
## $knn
## Cross-Validated (10 fold, repeated 10 times) Confusion Matrix
##
## (entries are percentages of table totals)
##
##           Reference
## Prediction autumn spring summer winter
##   autumn   13.2    1.5    6.3    0.5
##   spring    1.1   10.0    0.2    2.0
##   summer    0.5    3.3   41.4    0.1
##   winter    0.3    4.4    1.4   13.7
##
##
## $rpart
## Cross-Validated (10 fold, repeated 10 times) Confusion Matrix
##
## (entries are percentages of table totals)
##
##           Reference
## Prediction autumn spring summer winter
##   autumn   10.9    0.5    1.7    0.4
##   spring    1.0   13.1    3.0    1.7
##   summer    2.3    2.2   43.2    0.0
##   winter    0.8    3.4    1.5   14.3
```

```
uv.propm.ml.sc$vips$rpart[1:10,]
```

```
##           Overall      Mean
## 286 100.00000 100.00000
## 287 100.00000 100.00000
## 284 81.17577 81.17577
## 285 81.17577 81.17577
## 288 81.17577 81.17577
## 365 44.69677 44.69677
## 364 37.22520 37.22520
## 366 37.22520 37.22520
## 342 29.19453 29.19453
## 343 29.19453 29.19453
```

```
uv.propm.ml.sm.sc = train.models.performance(uv.propm.smooth.sc, c("pls", "knn", "rpart"),
                                             "seasons", "repeatedcv")
uv.propm.ml.sm.sc$performance
```

```
##      Accuracy      Kappa AccuracySD      KappaSD
## pls  0.6858798 0.5244083 0.09160295 0.1368303
## knn  0.7744950 0.6719102 0.07550863 0.1062427
## rpart 0.8257309 0.7399869 0.08040353 0.1184615
```

```
uv.propm.ml.sm.sc$conf
```

```
## $pls
## Cross-Validated (10 fold, repeated 10 times) Confusion Matrix
##
## (entries are percentages of table totals)
##
##      Reference
## Prediction autumn spring summer winter
## autumn  5.3  0.3  0.7  0.0
## spring  4.5  7.9  4.7  4.4
## summer  2.6  5.5 43.4  0.0
## winter  2.7  5.5  0.5 12.0
##
##
## $knn
## Cross-Validated (10 fold, repeated 10 times) Confusion Matrix
##
## (entries are percentages of table totals)
##
##      Reference
## Prediction autumn spring summer winter
## autumn 13.3  1.4  6.1  0.8
## spring  1.1  9.8  0.5  2.4
## summer  0.4  3.3 41.3  0.1
## winter  0.3  4.6  1.4 13.0
##
##
## $rpart
## Cross-Validated (10 fold, repeated 10 times) Confusion Matrix
##
## (entries are percentages of table totals)
##
##      Reference
## Prediction autumn spring summer winter
## autumn 11.5  0.0  1.4  0.4
## spring  1.2 13.4  2.4  2.4
## summer  2.1  2.9 44.1  0.0
## winter  0.3  2.9  1.4 13.6
```

```
uv.propm.ml.sm.sc$vips$rpart[1:10,]
```

```
##      Overall      Mean
## 285 100.00000 100.00000
## 290  96.23215  96.23215
## 280  82.61564  82.61564
## 300  75.94550  75.94550
## 295  70.34194  70.34194
## 320  48.65276  48.65276
## 315  48.10031  48.10031
## 385  46.63245  46.63245
## 365  44.16721  44.16721
## 370  42.66544  42.66544
```

Machine Learning Fenólicos

```
uv.propm.ml.pheno.sc = train.models.performance(uv.propm.pheno.sc, c("pls", "knn", "rpart"),
                                                "seasons", "repeatedcv")
uv.propm.ml.pheno.sc$performance
```

```
##      Accuracy      Kappa AccuracySD      KappaSD
## pls  0.6638299  0.4762378  0.07274265  0.1063339
## knn  0.7461225  0.6217162  0.08316891  0.1225783
## rpart 0.7903270  0.6877010  0.07753734  0.1152374
```

```
uv.propm.ml.pheno.sc$conf
```

```

## $pls
## Cross-Validated (10 fold, repeated 10 times) Confusion Matrix
##
## (entries are percentages of table totals)
##
##           Reference
## Prediction autumn spring summer winter
##   autumn    0.0    0.0    0.0    0.0
##   spring     5.0    6.0    4.1    0.2
##   summer     8.2    5.5   44.2    0.0
##   winter     1.8    7.7    1.1   16.2
##
##
## $knn
## Cross-Validated (10 fold, repeated 10 times) Confusion Matrix
##
## (entries are percentages of table totals)
##
##           Reference
## Prediction autumn spring summer winter
##   autumn     9.4    1.1    5.4    0.4
##   spring      1.4   10.0    0.5    2.8
##   summer      3.9    3.3   42.0    0.0
##   winter      0.4    4.8    1.4   13.2
##
##
## $rpart
## Cross-Validated (10 fold, repeated 10 times) Confusion Matrix
##
## (entries are percentages of table totals)
##
##           Reference
## Prediction autumn spring summer winter
##   autumn     8.7    0.5    2.5    0.2
##   spring      0.9   14.0    3.4    1.9
##   summer      4.4    1.8   42.1    0.0
##   winter      1.0    3.0    1.4   14.3

```

Script CLAE - PROSPECÇÃO DE FONTES BOTÂNICAS E AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SAZONALIDADE NO PERFIL QUÍMICO DA PRÓPOLIS DE SÃO JOAQUIM (SANTA CATARINA)

Maira Maciel Tomazzoli

Thursday, August 20, 2015

R script para análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

```
metadata.file = "meta_hplc2.csv"
data.file = "prophplc2.csv"

label.x = "compound"
label.values = "mg/g"

hplc.prop.ds = read.dataset.csv(data.file, metadata.file, sep = ";",
                               description = "Biochemical data of Propolis",
                               type = "concentrations",
                               label.x = label.x, label.values = label.values,
                               sep.meta = ";")

constant.variables <- sapply(data.frame(t(hplc.prop.ds$data)), function(.col){
  all(is.na(.col)) || all(.col[1L] == .col)
})
indexes.to.remove = as.numeric(which(constant.variables))
hplc.prop.ds= remove.data.variables(hplc.prop.ds, variables.to.remove = indexes.to.remove,
                                   by.index = T)

hplc.prop.ds.scal = scaling(hplc.prop.ds, "auto")
```

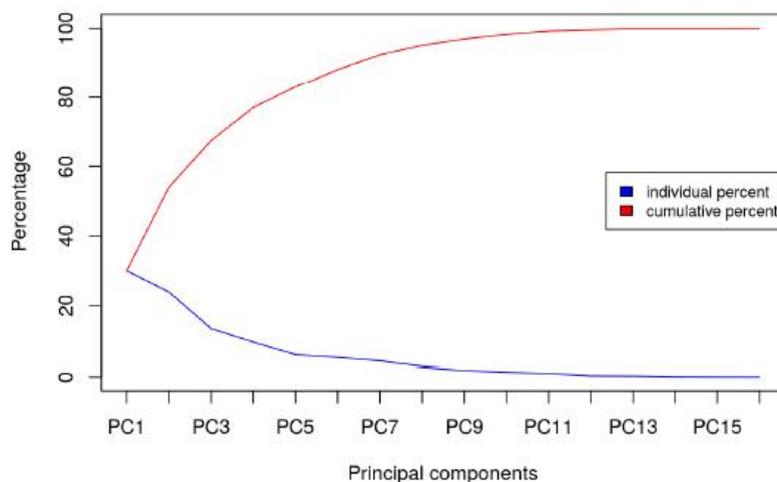
Inspeção preliminar dos dados

```
sum.dataset(hplc.prop.ds)
```

```
## Dataset summary:
## Valid dataset
## Description: Biochemical data of Propolis
## Type of data: concentrations
## Number of samples: 22
## Number of data points 16
## Number of metadata variables: 2
## Label of x-axis values: compound
## Label of data points: mg/g
## Number of missing values in data: 0
## Mean of data values: 4.126637
## Median of data values: 0.7380469
## Standard deviation: 8.131909
## Range of values: 0 68.96533
## Quantiles:
##      0%      25%      50%      75%      100%
## 0.0000000 0.0000000 0.7380469 4.8867669 68.9653258
```

Análise de Componentes Principais (PCA)

```
hplc.prop.scal.pca = pca.analysis.dataset(hplc.prop.ds.scal)
pca.screepot(hplc.prop.scal.pca)
```

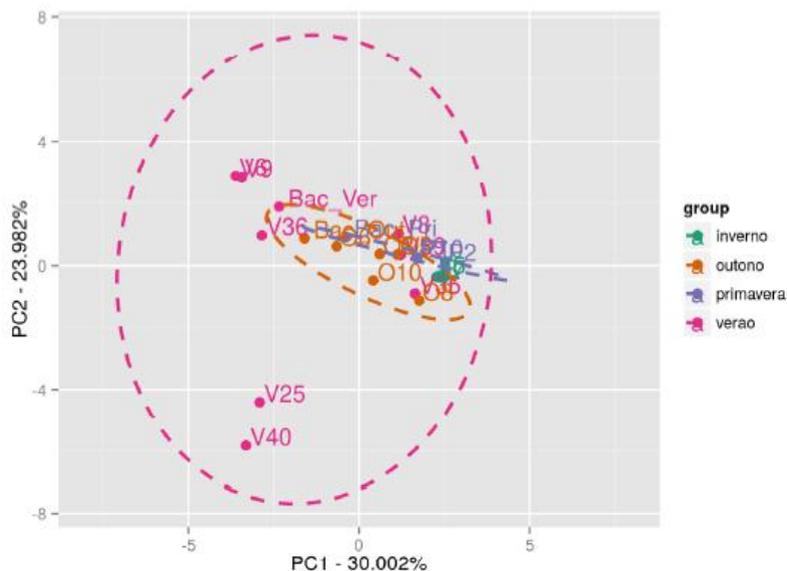


```
summary(hplc.prop.scal.pca)
```

```
## Importance of components:
##
## Standard deviation      PC1  PC2  PC3  PC4  PC5  PC6  PC7
## Proportion of Variance 0.300 0.2398 0.1342 0.09569 0.05994 0.05231 0.04244
## Cumulative Proportion 0.300 0.5399 0.6741 0.76974 0.82968 0.88199 0.92442
##
## Standard deviation      PC8  PC9  PC10  PC11  PC12  PC13
## Proportion of Variance 0.02717 0.01798 0.01326 0.00967 0.0033 0.00274
## Cumulative Proportion 0.95159 0.96957 0.98283 0.99250 0.9958 0.99854
##
## Standard deviation      PC14  PC15  PC16
## Proportion of Variance 0.00085 0.00041 0.00020
## Cumulative Proportion 0.99939 0.99980 1.00000
```

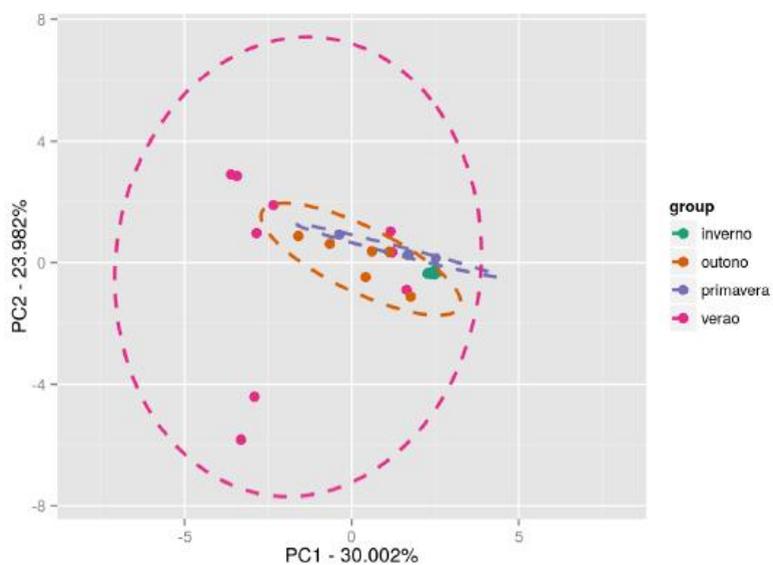
```
pca.scoresplot2D(hplc.prop.ds.scal, hplc.prop.scal.pca, "seasons", ellipses = T,
  labels = T, palette=2, xlim = c(-8, 8))
```

```
## Loading required package: ggplot2
## Loading required package: ellipse
```



```
pca.scoresplot2D(hplc.prop.ds.scal, hplc.prop.scal.pca, "seasons", ellipses = T,
  palette=2, xlim = c(-8, 8))
```

20/08/2016 Script CLAE - PROSPECÇÃO DE FONTES BOTÂNICAS E AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SAZONALIDADE NO PERFIL QUÍMICO DA PRÓPO...



Análise Hierárquica (HCA)

```
hplc.prop.hc = hierarchical.clustering(hplc.prop.ds.scal, distance = 'euclidean')
dendrogram.plot.col(hplc.prop.ds.scal, hplc.prop.hc, "seasons", lab.cex = 0.8)
```

