



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - CCT
CURSO DE GRADUAÇÃO DE QUÍMICA INDUSTRIAL**

ROSSANA OLIVEIRA DA NÓBREGA

**APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA NIR PARA A DETERMINAÇÃO DE
POLIFENÓIS TOTAIS EM PÓLEN DE ABELHA PRODUZIDO NA PROVÍNCIA DE
BUENOS AIRES – ARGENTINA**

**CAMPINA GRANDE - PB
2018**

ROSSANA OLIVEIRA DA NÓBREGA

**APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA NIR PARA A DETERMINAÇÃO DE
POLIFENÓIS TOTAIS EM PÓLEN DE ABELHA PRODUZIDO NA PROVÍNCIA DE
BUENOS AIRES – ARGENTINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Química Industrial da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Química Industrial.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. José Germano Vêras Neto.

**CAMPINA GRANDE – PB
2018**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

N337a Nóbrega, Rossana Oliveira da.
Aplicação da espectroscopia NIR para a determinação de polifenóis totais em pólen de abelha produzido na província de Buenos Aires – Argentina [manuscrito] : / Rossana Oliveira da Nobrega. - 2018.
40 p. : il. colorido.

Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologia, 2018.
"Orientação : Prof. Dr. José Germano Vêras Neto , Departamento de Química - CCT."

1. Pólen de abelha . 2. Polifenóis totais. 3. Espectroscopia.
4. Quimiometria.

21. ed. CDD 660

ROSSANA OLIVEIRA DA NÓBREGA


APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA NIR PARA A DETERMINAÇÃO DE
POLIFENÓIS TOTAIS EM PÓLEN DE ABELHA PRODUZIDO NA PROVÍNCIA
DE BUENOS AIRES – ARGENTINA

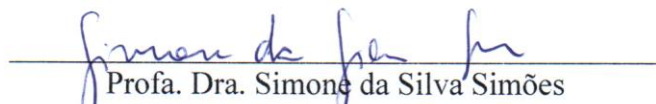
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de graduação em
Química Industrial da Universidade
Estadual da Paraíba, como requisito
parcial à obtenção do título de bacharel
em Química Industrial.

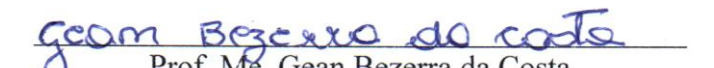
Área de concentração: Química
Analítica.

Aprovada em: 13 / 06 / 2018 .

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. José Germano Vêras Neto (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Prof. Dra. Simone da Silva Simões
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Prof. M^c. Gean Bezerra da Costa
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

A minha mãe, pela dedicação, companheirismo e amizade, **DEDICO**.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu bondoso Pai, por nunca ter me deixado desistir, mesmo nas dificuldades no decorrer da graduação e por me permitir chegar até aqui. Obrigada, por tudo.

Ao professor Germano Véras, por ter me iniciado na pesquisa científica e por ter me acolhido no LQAQ; e por todas as orientações e apoio durante a vida acadêmica e para finalização deste trabalho.

Ao professor Marcelo Pistonesi e toda sua equipe pela parceria e desenvolvimento desta pesquisa.

À minha família, em especial a minha mãe e irmã, pelo apoio, paciência, compreensão e motivação. Sou grata por tudo, por ter me mostrado o caminho certo e o que eu sou hoje devo a ti, Mãe.

Ao meu namorado, Ronaldo Filho, por todo cuidado e paciência. Pelo incentivo prestado em momentos de tristezas e desânimo. E por me proporcionar momentos inesquecíveis ao seu lado. Obrigada, por viver esse amor lindo entre nós.

Aos meus colegas de curso, em especial a Bárbara, Juliana e Gizelly, que foram de extrema importância na minha vida como também no meu desempenho acadêmico, todas as lembranças ficarão guardadas, quero vocês comigo até o fim.

A minhas amigas Amélia, Thaisy Anne, Vivi, Irla, Ivia, Jéssica, Bárbara Letícia, pelos momentos de amizade e companheirismo.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

*“Corações gratos e felizes até atravessando
obstáculos encontram razões para agradecer a Deus”
(Autor Desconhecido)*

RESUMO

O pólen de abelha é considerado um importante suplemento alimentar por conter características terapêuticas e nutricionais, que entre seus principais constituintes estão os polifenóis totais que podem atuar como potentes antioxidantes, prevenindo doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer. Desta forma, a fim de estimar a qualidade do pólen de abelha as análises de referência são utilizadas e, em algumas delas, são demoradas e trabalhosas. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi utilizar uma metodologia alternativa, a Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR), para determinar teores de polifenóis totais em pólen de abelha da região do sudoeste de Buenos Aires associado à ferramenta quimiométrica de calibração multivariada, Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS), empregando diferentes técnicas de pré-processamento (SNV, MSC e Suavização Savitzky-Golay) utilizando o software The Unscrambler 9.7. O modelo PLS foi construído com 77 amostras, divididas em conjunto de calibração (57 amostras) e conjunto de predição (20 amostras) com o auxílio do algoritmo Kennard-Stone (KS). Obteve-se o melhor modelo com combinação do pré-processamento SNV, visto que, em geral houve uma diminuição do RMSEC e RMSEP, e uma maximização do R^2_{pred} e com baixo erro relativo, quando comparados com a abordagem do PLS espectros brutos. Assim, pode-se concluir que a metodologia proposta é uma ferramenta analítica promissora para o monitoramento da qualidade do pólen de abelha analisado quanto aos teores de polifenóis totais.

Palavras-Chave: Pólen de abelha, Polifenóis totais, Espectroscopia, Quimiometria.

ABSTRACT

Bee pollen is considered an important food supplement because it contains therapeutic and nutritional characteristics, which among its main constituents are the total polyphenols that can act as potent antioxidants, preventing cardiovascular diseases and some types of cancer. Thus, in order to estimate the quality of bee pollen, the reference analyzes are used and in some cases they are time-consuming and laborious. Therefore, the objective of this work was to use an alternative methodology, the Near Infrared Spectroscopy (NIR), to determine the total polyphenol content in bee pollen in the southwestern region of Buenos Aires associated to the multivariate calibration chemometric tool, Least Squares Regression Partial (PLS), using different preprocessing techniques (SNV, MSC and Savitzky-Golay Smoothing) using The Unscrambler 9.7 software. The PLS model was constructed with 77 samples, divided into calibration set (57 samples) and prediction set (20 samples) with the aid of the Kennard-Stone algorithm (KS). Then, we obtained the best model with combination of pre-processing SNV, since in general there was a decrease of RMSEC and RMSEP, and a maximization of R^2_{pred} and with low relative error, when compared to the approach of PLS spectra gross. Thus, it can be concluded that the proposed methodology is a promising analytical tool for monitoring the quality of bee pollen.

Keywords: Bee pollen, Total polyphenols, Spectroscopy, Chemometrics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Calibração Multivariada	17
Figura 2 – Locais de Amostragem de pólen de abelha	23
Figura 3 – Coletor de pólen de abelha	24
Figura 4 - Espectrofotômetro FTIR-NIR Thermo Scientific Nicolet iS50	25
Figura 5 - Suporte para centralizar a amostra sob a fonte de radiação	26
Figura 6 - Espectros NIR brutos das amostras de polén de abelha	28
Figura 7 – Gráfico de Influência.....	29
Figura 8 – Espectros NIR brutos das amostras de pólen de abelha.....	29
Figura 9 – Espectros NIR com pré-tratamento SNV das amostras de pólen de abelha.....	30
Figura 10 – Gráfico do valor predito versus valor de referência para o conjunto de calibração.....	31
Figura 11 – Gráfico do valor predito versus valor de referência para o conjunto de predição.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estrutura dos principais polifenóis totais encontrados no pólen de abelha	22
Tabela 2 – Teor de Polifenóis totais em amostras de pólen de abelha pelo método Folin-Ciocalteu	27
Tabela 3 – Resultados das determinações de polifenóis totais em amostras de pólen de abelha usando espectroscopia NIR e PLS.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CG	Cromatografia Gasosa
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
FIT - IR	Infravermelho-Transformadora de <i>Fourier</i>
GAE	Equivalente em Ácido gálico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
KS	Algoritmo <i>Kennard-Stone</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MSC	Correção de Espalhamento Multiplicativo
NIRS	Espectroscopia no Infravermelho Próximo
PCR	Regressão de Componentes Principais
PLS	Regressão por Mínimos Quadrados Parciais
R^2_C	Coefficiente de determinação de calibração
R^2_P	Coefficiente de determinação de predição
RMSEC	Raiz quadrada do erro quadrático médio de calibração
RMSEP	Raiz quadrada do erro quadrático médio de previsão
SNV	Desvio Normal Padrão
SG	Suavização <i>Savitzky-Golay</i>
UV-Visível	Ultravioleta-Visível
VL	Variável Latente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3	REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1	Espectroscopia Infravermelho Próximo	15
3.2	Quimiometria	16
3.2.1	Calibração Multivariada	17
3.2.2	Regressão por Mínimo Quadrado Parciais	18
3.3	Pólen	20
3.3.1	Polifenóis Totais	20
3.4	Metodologias de análise na determinação de polifenóis totais	22
4	METODOLOGIA	23
4.1	Aquisição de amostra	23
4.2	Procedimento	24
4.2.1	Método de Referência	24
4.2.2	Espectroscopia NIR	25
4.2.3	Tratamento de Dados	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1	Determinação de Polifenóis totais	27
5.2	Análise Multivariada	27
6	CONCLUSÃO	34
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da demanda por medicamentos de qualidade e alimentos saudáveis tem gerado uma procura extrema de análises quantitativas de compostos bioativos em produtos alimentícios e/ou matérias-primas. Diversos métodos analíticos são empregados nas análises quantitativas e qualitativas. Porém, esses métodos normalmente exigem muitas etapas de pré-processamento antes e durante a análise. No entanto, nos últimos anos, a espectroscopia NIR tem sido uma ferramenta alternativa para quantificação de componentes bioativos, tais como polifenóis totais, carotenóides, glicosinolatos (ALI *et al.*, 2018).

Neste sentido, a Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIRS, do inglês Near InfraRed Spectroscopy) destaca-se por ser uma alternativa viável, rápida, não invasiva e não destrutiva da amostra, além de, em diversas condições, não necessitar de pré-tratamentos na amostra. A NIRS é uma técnica que está de acordo com os princípios da química verde, gerando baixa quantidade de resíduos e sem uso de reagentes químicos.

Por outro lado, visto que os espectros NIRS são complexos, torna-se de difícil interpretação o seu uso direto, havendo a necessidade de técnicas apropriadas para extração de informações relevantes para determinação quantitativa e qualitativa da amostra que está se trabalhando no momento.

Deste modo, a NIRS requer o uso de ferramentas quimiométricas para tratar os dados. Deste modo, a construção de um modelo quimiométrico deve correlacionar o conhecimento químico sobre a amostra e as características espectrais, para estimar a concentração ou propriedade física de uma determinada amostra.

Então, pode-se fazer uso da espectroscopia NIRS para estimar a qualidade do pólen de abelha que é composto por substâncias bioativas, em especial os polifenóis totais, que estão associadas diretamente a atividade antioxidante.

Devido a esta propriedade antioxidante, o pólen de abelha tem obtido grande destaque em todo o mundo, visto que os polifenóis possuem a capacidade de interromper a ação dos radicais livres, prevenindo a autoxidação, e reduzindo o risco a doenças cardiovasculares, diabetes e alguns cânceres (MACHADO, 2015).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi propor o desenvolvimento de um método alternativo aos convencionais, para determinação da quantidade polifenóis totais em pólen de abelha utilizando NIRS com Regressão por Mínimos Quadrados Parciais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o uso da Espectroscopia NIR para determinação da qualidade de amostras de pólen de abelha em termos de polifenóis totais.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar medidas espectrométricas das amostras de pólen de abelha na região do espectro eletromagnético no infravermelho próximo (NIR).
- Utilizar técnicas de pré-processamento que auxiliem na capacidade preditora dos modelos construídos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Espectroscopia Infravermelho Próximo

A região do infravermelho próximo foi descoberta por Herschel, um astrônomo e músico, que revelou a existência desta radiação invisível ao olho nu, através da medição da temperatura nas regiões fora do espectro visível, e a partir disto observou-se que na região subsequente à cor vermelha, a temperatura era superior, no qual a classificou como “raios caloríficos” e mais tarde esta região ficou conhecida como infravermelho, no qual o prefixo grego “infra” significa “abaixo” (FRANCA e NOLLET, 2017; PASQUINI, 2003).

A técnica NIR é utilizada para investigar amostras a fim de extrair informações qualitativas e/ou quantitativas procedentes da interação das ondas eletromagnéticas do infravermelho próximo com seus constituintes. Trata-se de uma associação entre as transições vibracionais com as variações de energia molecular, devido à absorção ou emissão de fóton, o que corresponde à faixa de comprimento de onda de 750 a 2500 nm, número de onda: 13000-4000 cm^{-1} (PASQUINI, 2003; LIMA *et al.*, 2009).

A intensidade de uma determinada banda de absorção depende da mudança de dipolo durante a transição vibracional na região do infravermelho e do seu grau de anarmonicidade, ou seja, o fóton é só absorvido quando decorre de uma variação no momento de dipolo da molécula devido à sua vibração, porque, nesta situação, o campo elétrico da radiação eletromagnética é capaz de interagir com a molécula, elevando a amplitude do movimento vibracional, estes fenômenos estão presentes entre as ligações envolvendo o átomo de hidrogênio (o mais leve) e outro elemento (mais pesado) como, carbono, enxofre e nitrogênio, o que corresponde às respectivas ligações, C-H, N-H e S-H que exibe maiores transições vibracionais e maiores desvios do comportamento harmônico (PASQUINI, 2003; BLANCO e VILARROYA, 2002). Logo, os sinais obtidos correspondem aos sobretons e combinações de bandas das vibrações fundamentais C-H, O-H, N-H e S-H das moléculas presentes na amostra, devido à interação da matéria com a radiação, gerando espectros com informações sobrepostas.

Além dos espectros NIR possuírem bandas pouco intensa e sobreposta, também a presença de vários outros fatores que aumentam a complexidades destes, tais como, bandas de absorção de água, efeito de dispersão, ruído instrumental, complexidades das amostras e efeitos ambientais. Portanto, os métodos de análise multivariados acoplados a técnica de pré-processamento são fundamentais para extração de informações relevantes contidas nos espectros, já que não é possível sua interpretação direta (SANTOS *et al.*, 2013).

Com o aumento da demanda por medicamentos de qualidade e alimentos saudáveis tem gerado uma procura extrema de análises quantitativas de compostos bioativos em produtos alimentícios e/ou matérias-primas. Diversos métodos analíticos são empregados nas análises quantitativas e qualitativas, dispondo de informações concretas. Porém, esses métodos normalmente exigem muitas etapas de pré-processamento antes e durante a análise. No entanto, nos últimos anos, a espectroscopia NIR tem sido uma ferramenta alternativa para quantificação de componentes bioativos, tais como polifenóis totais, carotenóides, glicosinolatos (ALI *et al.*, 2018).

3.2 Quimiometria

O termo quimiometria foi utilizado formalmente na primeira metade da década de 70, porém só se firmou permanentemente quando o instrumento de medição invadiu o laboratório químico (NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2006). A partir da década de 80 com o crescente uso dos computadores e sofisticação de “hardware” e “software” atingiu-se um ponto bastante promissor para quimiometria no tratamento de dados químicos mais complexos do ponto de vista matemático e estatístico (FERREIRA *et al.*, 1999).

A Quimiometria é a ciência que envolve a aplicação de métodos estatísticos, matemáticos e computacionais para interpretar, investigar os dados de interesse químicos, isto é, extrai informações relevantes dos dados químicos através das ferramentas matemáticas e estatísticas (VARMUZA e FILZMOZER, 2009; SOUSA e POPPI, 2012).

Os avanços das técnicas instrumentais em analítica permitiram um aumento significativo na quantidade de dados gerados, em que uma única amostra analisada fornecia um grande número de dados, exemplo disso, é a intensidade de absorção em mil ou mais comprimentos de onda em um único espectro. Diante desta quantidade de dados de natureza multivariada, a quimiometria tem auxiliado bastante para o tratamento desses dados de forma rápida e eficiente (NASCIMENTO, 2013; FERREIRA *et al.*, 1999).

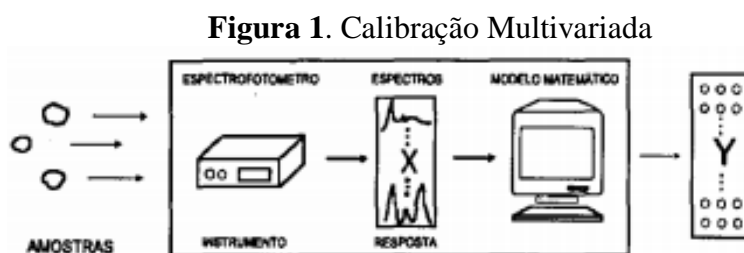
Os métodos multivariados possuem quatro vantagens quando comparados com os métodos univariados. Uma primeira vantagem diz respeito à redução de ruído que pode ser obtida quando múltiplas variáveis redundantes são analisadas simultaneamente por métodos multivariados apropriados. Uma segunda vantagem importante é que as medidas parcialmente seletivas podem ser usadas e, por meio dos métodos multivariados apropriados, podem ser obtidos resultados sem o efeito dos interferentes. Uma terceira vantagem é que as amostras anômalas podem ser facilmente descobertas, como exemplo, análise espectroscópica. Para qualquer método quimiométrico bem caracterizado, as propriedades de interesse das amostras

reais medidas no futuro podem ser explicadas por combinações lineares do conjunto de treinamento. Espécies químicas estranhas, apresentam sinais espectroscópio diferentes do esperado, que podem ser detectadas nos resíduos espectrais como amostras anômalas ou *outlier*. As vantagens da quimiometria é consequência do uso frequente de métodos multivariados (BRO, 2003).

Os métodos e aplicações em quimiometria podem ser agrupadas e classificadas em diversas áreas, como: planejamento e otimização de experimentos; calibração multivariada, pré-processamento dos dados espectrais, métodos de reconhecimento padrões/classificação de amostras e seleção de amostras e variáveis espectrais (BEEBE, PELL e SEASHOLTZ, 1998).

3.2.1 Calibração Multivariada

Calibração Multivariada é o procedimento que consiste em desenvolver modelos para quantificar uma propriedade de interesse da amostra (FERREIRA, 2015). Na determinação da propriedade da amostra, a concentração, não é gerada diretamente pelo instrumento laboratorial como resposta, o espectrofotômetro registra as absorbâncias que depende da concentração do analito e com o auxílio de um modelo matemático e estatístico é possível prever a propriedade do analito (FERREIRA *et al*,1999). A figura 1 representa as etapas de uma calibração multivariada



Fonte: Ferreira *et al*,1999.

Na análise multivariada, os parâmetros do modelo podem ser estimados quando as respostas dependem do analito alvo além de outras variáveis químicas ou físicas, corrigindo tais efeitos interferentes (DINIZ, 2010). No entanto, os comprimentos de onda além de serem seletivos para o analito, podem também responder a outras substâncias químicas nas amostras. Sendo que o espectro do analito deve ser parcialmente diferente dos outros espectros de todas as amostras respondentes. Além disso, deve ser selecionado um conjunto padrão de calibração que contenha amostras com qualquer espécie interferente, ou melhor, as espécies interferentes devem estar no conjunto de calibração em quantidades variáveis para que seja possível construir um modelo de calibração que compense o efeito das espécies interferentes com o método multivariado, Regressão por Mínimos Quadrados (GEMPERLINE, 2006).

A utilização dos métodos de calibração multivariada é válida para extrair informações químicas dos espectros, no qual pode ser aplicada a vários métodos instrumentais, tais como, UV-Visível, Raman, Infravermelho Médio, Fluorescência, RMN e Espectros de massa, mas sua importância tem se destacado na espectroscopia do infravermelho próximo. Os métodos multivariados mais comumente empregados para análise química são Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLS) e Regressão de Componentes Principais (PCR), onde os fatores que se relacionam com a variação nas medições de resposta são regredidos em relação às propriedades de interesse. Assim, cada fator adicionado ao modelo descreveria a variação relevante para a previsão dos valores da propriedade em questão (FEUDALE *et al*, 2002).

A razão da calibração multivariada acoplada à espectroscopia NIR ser considerado um importante método analítico é por ser uma técnica rápida, barata e o suficiente para solucionar os problemas reais. Sendo aplicada em matrizes reais complexas, no qual os procedimentos de separação e tratamento químico para calibração univariada são demorados e caros (FORINA, LANTERI e CASALE, 2007).

3.2.2 Regressão por Mínimo Quadrado Parciais (PLS)

A regressão por mínimos quadrados parciais foi desenvolvida por Herman Hold em 1975 para a modelagem de conjunto de dados complexos (ZIMMER e ANZANELLO, 2014). No decorrer da década de 70, os grupos liderados por S. Wold e H. Martens popularizaram o uso deste método para aplicações químicas. Possuindo duas aplicações diferentes, PLS1 e PLS2. Em PLS1, são construídos modelos de calibração separados para cada coluna em Y. Em PLS2, um único modelo de calibração é construído para todas as colunas em Y simultaneamente (DINIZ, 2010).

A regressão PLS busca relacionar a matriz X (composta por informações, como os espectros NIR) à matriz Y (composta por propriedades das respectivas amostras, como propriedades químicas, reatividade, atividade biológica), permitindo analisar dados com forte correlação, com presença de ruídos (WOLD, SJÖSTRÖM e ERIKSSON, 2001).

O método PLS geralmente consiste em duas etapas. Primeiro, a construção do modelo a partir das características do método ou instrumento analisado no intuito de obter um comportamento em relação a $Y = f(X)$ entre dois grupos de variáveis, chamado de variáveis dependentes Y, por meio de um conjunto de variáveis independentes X. Nesta etapa, é construído o conjunto de calibração ou treinamento, seguido da etapa de previsão ou teste para prever valores para variáveis dependentes (GELADI e KOWALSKI, 1986). A regressão

PLS transforma as variáveis de resposta e de processo em um número reduzido de combinações lineares (ZIMMER e ANZANELO, 2014).

Ambas as matrizes são decompostas em novas variáveis, denominadas variáveis latentes, uma forma similar à análise de componentes principais, em que descreve a direção de máxima variância que se correlaciona com a propriedade de interesse, concebendo duas matrizes de variações: Pesos e escores (DINIZ, 2010). Como nas equações a seguir:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (1)$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}^T + \mathbf{F} \quad (2)$$

Onde \mathbf{T} e \mathbf{U} são matrizes de escores (scores) das matrizes \mathbf{X} e \mathbf{Y} , respectivamente; \mathbf{P} e \mathbf{Q} são as matrizes de pesos (loadings) ou fatores das respectivas matrizes \mathbf{X} e \mathbf{Y} ; e \mathbf{E} e \mathbf{F} são os resíduos (DINIZ, 2010). Então, uma relação linear é obtida pelo coeficiente de regressão entre os scores de \mathbf{X} e os scores de \mathbf{Y} para cada VL:

$$\hat{\mathbf{u}}_h = \mathbf{b}_h \mathbf{t}_h \quad (3)$$

em que “h” representa as variáveis latentes, sendo que na matriz diagonal \mathbf{B} são agrupados os valores de \mathbf{b}_h , que contém os coeficientes de regressão entre a matriz de “scores” \mathbf{U} de \mathbf{Y} e a matriz de “scores” \mathbf{T} de \mathbf{X} . A melhor relação linear possível entre os “scores” desses dois blocos é obtida a partir de pequenas rotações das variáveis latentes dos blocos de \mathbf{X} e \mathbf{Y} (POPPI et al, 2000). A matriz \mathbf{Y} pode ser calculada de \mathbf{u}_h :

$$\mathbf{Y} = \mathbf{TBQ}' + \mathbf{F} \quad (4)$$

Assim, as concentrações das novas amostras são previstas através dos novos scores, \mathbf{T}^* , substituindo na equação 4

$$\mathbf{Y} = \mathbf{T}^* \mathbf{BQ}' \quad (5)$$

Uma vez que é necessário encontrar o número ótimo de variáveis latentes no modelo construído para melhor previsão das amostras dependente, normalmente, é utilizada a calibração cruzada, no qual o erro mínimo de previsão é determinado (POPPI et al., 2000).

3.3 Pólen

Pólen de abelha ou pólen apícola é um produto obtido por abelhas operárias, através da aglutinação do pólen das flores, ou seja, as abelhas coletam o pólen presente nas flores para sua sobrevivência, e é umedecido com a secreção das glândulas salivares ou néctar para serem aglutinados produzindo pequenos grânulos que são compactados em uma estrutura especial no qual é transferido para a colmeia através do seu terceiro par de pernas chamado corbículo, razão pela qual eles são chamados de cargas corbiculares, e estas são chamadas de cargas de pólen (KOMOSINSKA-VASSEV *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2017; RIBEIRO e SILVA, 2007).

O pólen de abelha é um produto natural que há muitos anos vem ganhando grande destaque nas áreas da medicina tradicional, na nutrição suplementar e em dietas alternativas, devidos às características nutricionais e benéficas a saúde humana (NEVES, ALENCAR e CARPES, 2009). Sua composição química depende fortemente da planta, origem geográfica, como também, das condições climáticas e o tipo da abelha, existindo uma grande variedade nas cargas de pólen (KOMOSINSKA-VASSEV *et al.*, 2015).

Os principais componentes do pólen de abelha são os carboidratos, aminoácidos, lipídeos, proteínas e entre os componentes minoritários estão às vitaminas, pigmentos, enzimas e minerais (NEVES, ALENCAR e CARPES, 2009). Além disso, contém quantidades consideráveis de substâncias polifenólicas que podem atuar como potentes antioxidantes (KROYER e HEGEDUS, 2001).

Os polifénóis totais são considerados um dos principais componentes responsáveis pela atividade antioxidante, através da ação de sequestrar os radicais livres prevenindo das doenças cardiovasculares e de alguns tipos de câncer. A determinação desses compostos está diretamente relacionada ao potencial antioxidante do pólen de abelha, de modo que sua determinação permitira classificar-se antes da comercialização, agregando valor a este produto (MÃRGHITAS *et al.*, 2009; NEVES, ALENCAR e CARPES, 2009).

A comercialização do pólen de abelha no Brasil é autorizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, no qual estabelece padrões de identidade e qualidade do produto (MAPA, 2001).

3.3.1 Polifenóis Totais

Nos últimos anos, o polén de abelha vem despertando o interesse tanto dos pesquisadores quanto da sociedade, devido as suas propriedades bioativas, como atividade

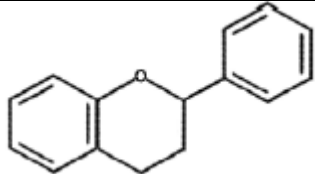
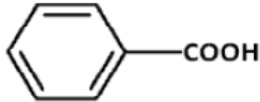
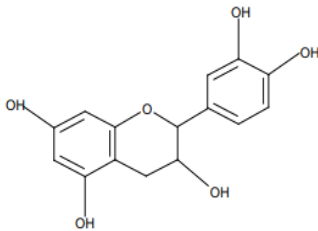
antimicrobiana, antifúngica e anti-inflamatória, e principalmente sua atividade antioxidante que atua inibindo a ação lesiva dos radicais livres (ARES *et al.*, 2018; DENISOW, 2016).

Os polifenóis totais compõem um dos maiores grupos de compostos antioxidantes naturais que compreendem uma variedade de moléculas das mais simples a grandes e complexas (MACHADO, 2015). Sua estrutura básica possui pelo menos um núcleo benzênico ligado a um ou mais grupos hidroxila e ainda pode ligar-se a outras substâncias naturais, em especial os monossacarídeos (glicose, galactose, ramnose, xilose e arabinose) e também associados a outros compostos, como ácidos carboxílicos e orgânicos, aminas e lipídios (BRAVO, 1998).

A atividade antioxidante dos polifenóis totais refere-se a sua estrutura química e a capacidade redutora (NEVES, ALENCAR e CARPES, 2009). Sendo assim, estas propriedades previnem e retardam as reações de oxidação, na qual a oxidação nos sistemas biológicos é decorrente das reações dos radicais livres no organismo, que são moléculas onde em sua estrutura química a presença de elétrons desemparelhados e bastante reativos (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2000).

Os polifenóis totais do pólen de abelha se enquadram em diversas categorias, como flavonoides, ácidos fenólicos e catequinas (Tabela 1). Entre os flavanóides mais encontrados em produtos apícolas estão quercetina, isoramnetina, caemferol, (AMÂNCIO, 2014; CARPES *et al.*, 2008; KOMOSINSKA-VASSEV *et al.*, 2015) miricetina, galangina (flavonóis), apigenina, rutina, canferide, crisina (flavonas) e cacetina. (AMÂNCIO, 2014; CARPES *et al.*, 2008). Enquanto que no grupo dos ácidos fenólicos, há principalmente ácido clorogênico (KOMOSINSKA-VASSEV *et al.*, 2015).

Tabela 1 – Estrutura dos principais polifenóis totais encontrados no pólen de abelha

Classe	Estrutura Molecular	Fórmula Estrutural
Flavanóides	$C_6-C_3-C_6$	
Ácidos Fenólicos	C_6-C_1	
Catequinas	$C_{15}H_{14}O_6$	

Fonte: Adaptado de Bravo, 1998.

Os grupos químicos destacados na Tabela I que se fazem presentes na estrutura dos polifenóis totais pode-se fazer uso da análise química, espectroscopia NIR, no qual, os dados coletados na faixa de 11.000 a 3.800 cm^{-1} correspondem a bandas de segundo sobretom do grupo carbonila (5.352 cm^{-1}) e as vibrações de sobretom $-CH_2$ (5.742 cm^{-1}) e $-CH_3$ (5.808 cm^{-1}). No entanto, as vibrações de CH_2 , e do grupo carbonila, são referente aos polifenóis (PICÓ,2015).

3.4 Metodologias de análise de determinação de polifenóis totais

Os polifenóis totais presentes nas amostras de pólen de abelha podem ser quantificados através de várias técnicas, tanto pelo método convencional espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, quanto pela metodologia baseada no sequestro do radical DDPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). Como também pelas técnicas instrumentais, a espectrofotometria de ultravioleta-visível (UV-VIS), a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia gasosa (GC), porém algumas são trabalhosas e longas, na preparação de amostras e soluções padrão, e às vezes requer equipamentos e solventes caros (MACHADO, 2015).

Neste sentido, para superar essas desvantagens, a espectroscopia NIR destaca-se por ser uma alternativa viável, rápida, não invasiva e não destrutiva da amostra, além de, em diversas condições, não necessitar de pré-tratamentos na amostra.

4 METODOLOGIA

4.1 Aquisição de amostra

Um total de 79 amostras de pólen de abelha foram coletadas em 4 diferentes regiões da Argentina (Figura 2), a fim de obter a representatividade populacional da composição do pólen de abelha, destas regiões, três (Hilario Ascasubi, Médanos, Jacinto Araújo) pertence à província fitogeográfica de Espinal e a quarta região (Patagones Viedma-) à província de Monte.

Figura 2. Locais de amostragem de pólen de abelha



Fonte: Vallese, 2017.

As amostras de pólen de abelha foram obtidas através de armadilhas localizadas na entrada das colmeias (Figura 3), durante dois períodos de apicultura (primavera-verão) de 2013-2014 e 2014-2015. Cada amostra é uma mistura de cargas de pólen de abelhas coletadas das colmeias em uma determinada data. Todas as amostras foram mantidas congeladas em recipientes fechados até processamento químico e espectroscópico.

Figura 3. Coletor de pólen de abelha



Fonte: Vallese, 2017.

4.2 Procedimento

4.2.1 Análise Química

O teor de polifenóis totais foi determinado pelo método de referência espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON, 1999). Neste método, foi utilizado o reagente Folin-Ciocalteu que consiste numa solução composta por uma mistura de ácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos de coloração amarela, que são reduzidos em presença de polifenóis, dando origem a óxidos de tungstênio e molibdênio de coloração azul, e em seguida foram realizadas as medidas por espectrofotometria UV-Vis a $\lambda = 765\text{nm}$ (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995).

O procedimento experimental foi dividido em duas etapas:

- Obtenção do extrato etanólico: Cada carga de pólen foi previamente pesada e colocada em um tubo eppendorf, 1,0 mL de etanol a 96% (v / v) foi adicionado e vortexado, em períodos de 15 minutos por 24 horas, utilizando temporizador analógico. Posteriormente, o extrato foi centrifugado e coletado o sobrenadante para o próximo estágio.
- Formação do complexo: Pipetou-se 500 μL do sobrenadante e 500 μL do Reagente de Folin-Ciocalteu em um balão volumétrico de 10 mL, e acrescentou-se 2,0 mL de carbonato de sódio a 10% (m / v) e o restante do volume foi completado com água destilada. Os balões volumétricos foram deixados em repouso por 2 horas ao abrigo da luz e, em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a 765 nm.

Utilizou-se como padrão de referência o ácido gálico em concentrações que variam 1,63 a 16,30 ppm e os resultados foram expressos em mg de equivalente em ácido gálico (GAE)/g de pólen.

4.2.2 Espectroscopia NIR

Neste estudo, utilizou-se um espectrofotômetro FTIR-NIR Thermo Scientific Nicolet iS50 (Figura 4), com 4 repetições para cada amostra, na faixa espectral de 10000 a 4000 cm^{-1} , à temperatura ambiente e mantendo a resolução espectral constante a 4 cm^{-1} . O espectro médio foi utilizado para construir os modelos de regressão.

Figura 4 - Espectrofotômetro FTIR-NIR Thermo Scientific Nicolet iS50



Fonte: Vallese, 2017.

Para o registro dos espectros foi empregado o suporte para amostras, no qual foi construído um cilindro de Teflon (17 mm de altura x 31 mm de diâmetro) para adaptação das amostras de pólen de abelha no percurso óptico (Figura 5).

Figura 5 - Suporte para centralizar a amostra sob a fonte de radiação



Fonte: Vallese, 2017.

4.2.3 Tratamento de dados

Para a determinação da concentração de polifenóis totais presentes nas cargas de pólen de abelha, os dados obtidos foram conduzidos a um modelo quimiométrico de calibração multivariada de primeira ordem, método de regressão por quadrados mínimos parciais (PLS), e o software utilizado foi o The Unscrambler, versão 9.7.

Três diferentes métodos de pré-processamento (Variação Normal Padrão - SNV, Correção Multiplicativa de Sinal - MSC e suavização Savitzky-Golay) foram aplicados aos espectros NIR obtidos, para verificar o efeito destes pré-tratamentos no modelo de regressão PLS. No entanto, não há um padrão que indiquem quais pré-tratamentos podem ser otimizados, portanto, a seleção é inevitavelmente realizada de forma experimental (CHENT e GRANT, 2012). Assim, os dados não processados e os três pré-processamento foram avaliados, e no pré-processamento de suavização Savitzky-Golay foi usado janela de 9 pontos de primeira e segunda ordem.

No método PLS é corriqueiro utilizar dois conjuntos de dados: o conjunto de calibração para construir o modelo de regressão, e o conjunto de previsão, para validar o modelo PLS (ALLEGRI e OLIVEIRI, 2013). Então, foi realizada a divisão das amostras em conjunto de calibração (75%) e previsão (25%) usando o algoritmo de Kennard-Stone (KS) no software Matlab, e em seguida foi avaliado a possível presença de outliers.

O desempenho do modelo de calibração e previsão foi analisado a partir de parâmetros, como, raiz do erro quadrático médio de calibração (RMSEC) e o coeficiente de determinação (R^2_C) no conjunto de calibração. O conjunto de previsão foi usado exclusivamente para avaliar e comparar a capacidade preditiva dos modelos de calibração finais em termos da raiz do erro quadrático médio de previsão (RMSEP) e do coeficiente de determinação (R^2_{Pred}).

5 RESULTADOS

5.1 Determinação de Polifenóis Totais

O teor de polifenóis totais das 79 amostras de pólen de abelha coletadas na Zona Sudoeste Bonaerense (Argentina) variou de 3,64 a 36,84 mg GAE/g de pólen, com um teor médio de $14,16 \text{ g} \pm 7,39 \text{ mg GAE/g}$ de pólen descrito na Tabela 2, esta diferença nos intervalos de variação mínima e máxima dos resultados de teor de polifenóis totais também é encontrada em pólen de abelha de outros países em diversas literaturas. No Brasil, Carpes *et al.*, (2008) ao avaliar as 36 amostras desidratadas de pólen de abelha em diferentes localidades da região sul obtiveram resultados que variam entre 19,28 a 48,90 mg GAE/g de pólen, com um teor médio de $30,77 \pm 8,22 \text{ mg GAE/g}$ de pólen.

Um valor médio superior foi encontrado por Aloisi e Ruppel (2014) para 20 amostras de pólen de abelha de duas regiões da província de Chubut, Argentina, com um teor médio de $87,17 \pm 33,9 \text{ mg GAE/g}$ de pólen, com uma variação maior (55,8 a 163,9 mg GAE/g de pólen), salientando a diferença de localização geográfica na composição da matriz.

Tabela 2 – Teor de Polifenóis totais em amostras de pólen de abelha pelo método Folin-Ciocalteau

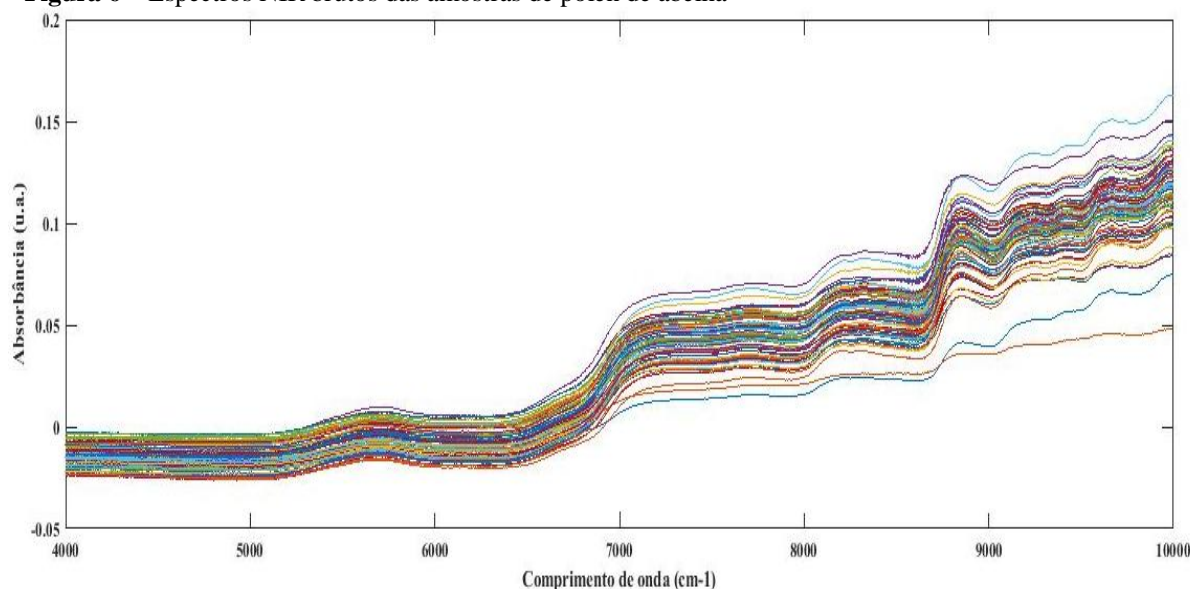
Amostras	Polifenóis Totais (mg GAE*/g de pólen)
Vmin	3,64
Vmax	36,84
Média \pm DP**	$14,16 \text{ g} \pm 7,39$

*GAE: equivalente em ácido gálico; **DP: Desvio padrão; Vmin: Variação mínima; Vmax: Variação máxima.

A variedade nos resultados dos teores de polifenóis totais em pólen de abelha é justificada em função da origem botânica, e entre outros parâmetros como, condições ambientais, espécie vegetal, tempo de armazenamento (KROYER e HEGEDUS, 2001; MENEZES *et al.*, 2010).

5.2 Análise Multivariada

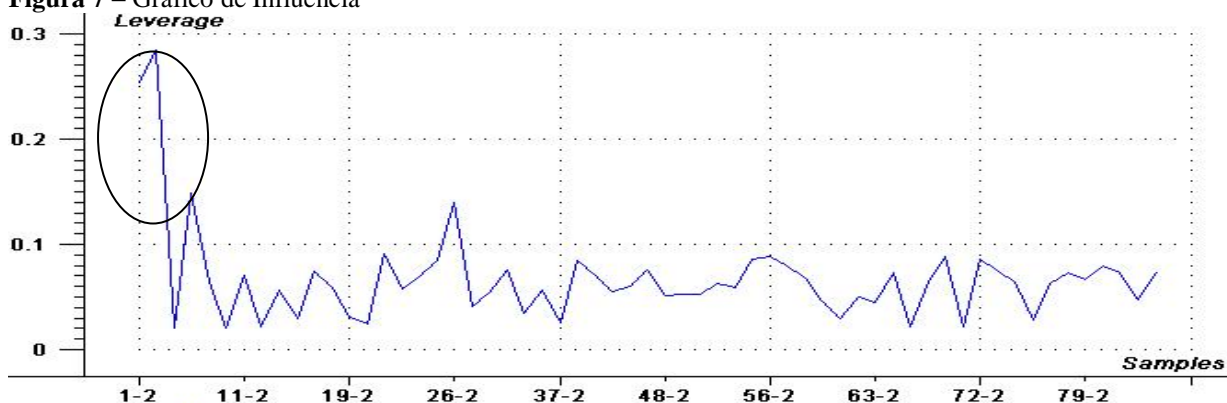
Os espectros de reflectância NIR das amostras de pólen de abelha na faixa de 4.000 a 10.000 cm^{-1} são mostrados na Figura 6.

Figura 6 – Espectros NIR brutos das amostras de pólen de abelha

Fonte: Autor

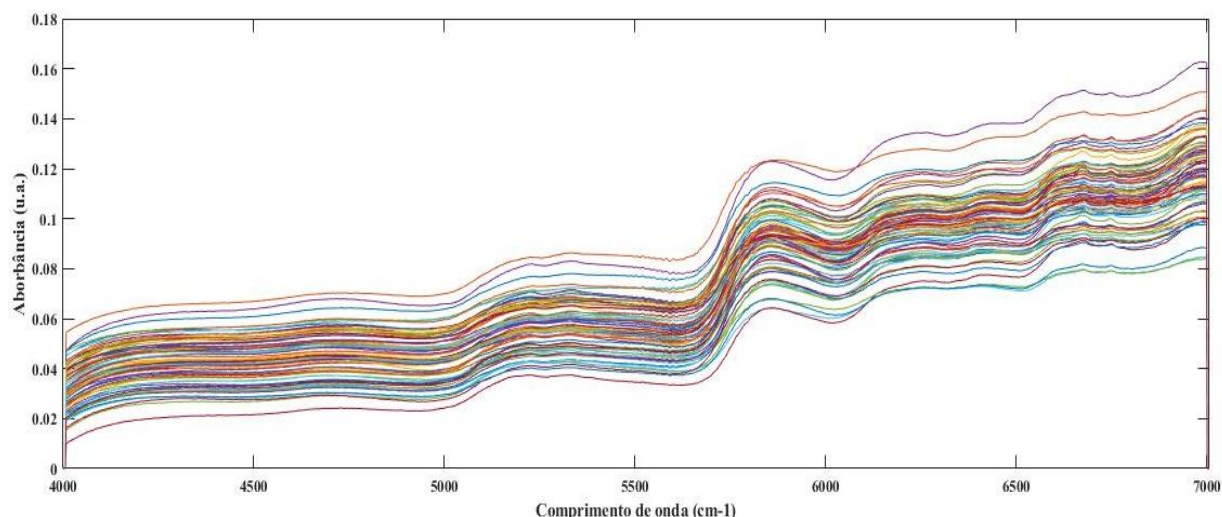
Na Figura 6, a faixa espectral de 7.000 a 10.000 cm^{-1} não foi utilizado no desenvolvimento dos modelos de calibração. Então, selecionou-se a faixa de 4000 a 7000 cm^{-1} , devido esta região ter forte correlação com as substâncias polifenolicas, por este motivo foi utilizada para tornar o modelo mais robusto. A tendência de espectros é altamente similar para a maioria das amostras de pólen de abelhas, com exceção de 2 delas (amostra 1 e 2), que apresentaram comportamento espectral anômalo e foram, assim, avaliadas como possíveis *outliers*.

Outliers são definidos como os dados que apresentam resultados inconsistentes em comparação com a maior parte dos dados (WANG e SRINIVASANA, 2009). Um modo para verificar a presença de *outlier* é pela construção do gráfico de influência (*leverage*) e análise residual (BARTHUS e POPPI, 2001). No gráfico de influência (Figura 7), pode ser observado que as amostras número 1 e 2 apresentam altos resultados de *leverage* que podem influenciar nos resultados e foram, por esse motivo, desconsideradas durante a análise multivariada.

Figura 7 – Gráfico de Influência

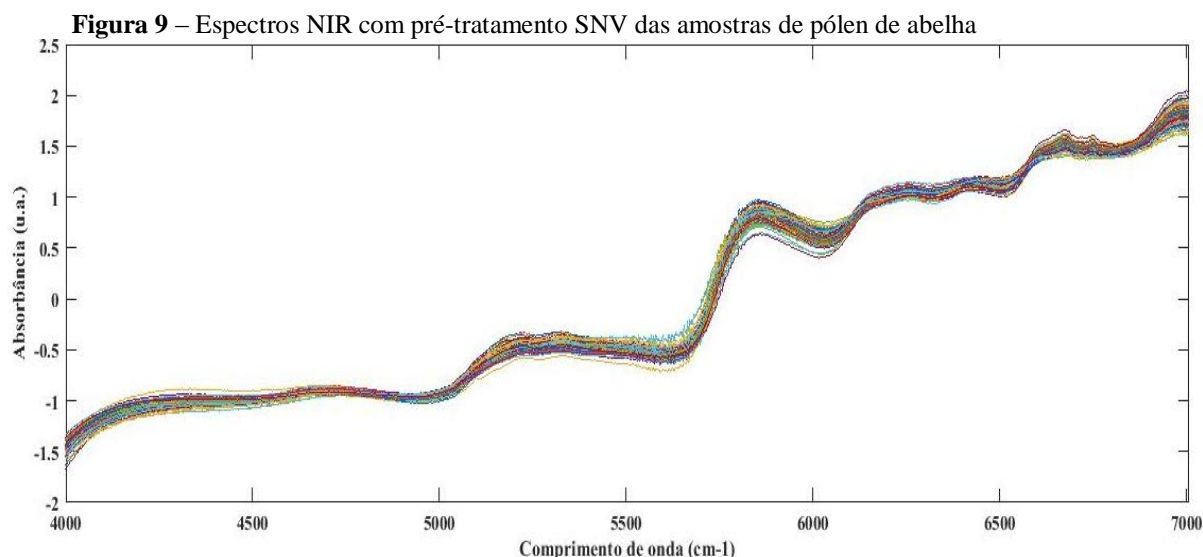
Fonte: Autor.

A região escolhida para análise multivariada foi à faixa espectral de 4.000 a 7.000 cm^{-1} (Figura 8). Após a remoção dos outliers e redução da faixa espectral, foram construídos os conjuntos de calibração (57 amostras) e de predição (20 amostras) utilizando o algoritmo Kennard-Stones (KS) que se baseia na distância euclidiana para selecionar um subconjunto de amostras X (KENNARD e STONE, 1969).

Figura 8 – Espectros NIR brutos das amostras de pólen de abelha

Fonte: Autor.

Pode-se notar na Figura 8 a existência de deslocamento de linha de base e a presença de um pequeno componente ruidoso. Todavia, verifica-se também deslocamento em relação ao eixo de refletância devido às características do pólen de abelha, tais como, tamanho e forma das partículas. Portanto, os dados brutos foram pré-tratados para aumentar a precisão do modelo. Para isso, foram testados diferentes métodos de pré-processamento (MSC, Suavização Savitzky-Golay e SNV) e optou-se relativamente ao modelo pré-tratado com SNV (Figura 9) que é capaz de atenuar as interferências causadas pelo tamanho das partículas, dispersão (SUN *et al.*, 2009).



Fonte: Autor.

Deste modo, na Tabela 3 constam os resultados dos dados brutos e dos dados pré-processados para verificar o efeito de pré-tratamentos espectrais no modelo de regressão PLS. Para esta otimização, os valores de RMSEC, R^2 , RMSEP, bias e o número de variáveis latentes foram considerados.

Tabela 3 – Resultados das determinações de polifenóis totais em amostras de pólen de abelha usando espectroscopia NIR e PLS

Polifenóis Totais	Parâmetro					
	RMSEC (mg GAE/g de pólen)	R^2_C	RMSEP (mg GAE/g de pólen)	R^2_{Pred}	Bias	VL
Bruto	1,140	0,975	3,042	0,850	0,957	12
MSC	1,495	0,957	3,139	0,847	1,021	10
SNV	1,478	0,968	3,006	0,861	0,485	10
SG (9p) 1°	1,415	0,961	3,155	0,845	0,358	14
SG (9p) 2°	1,661	0,947	3,088	0,852	0,595	12

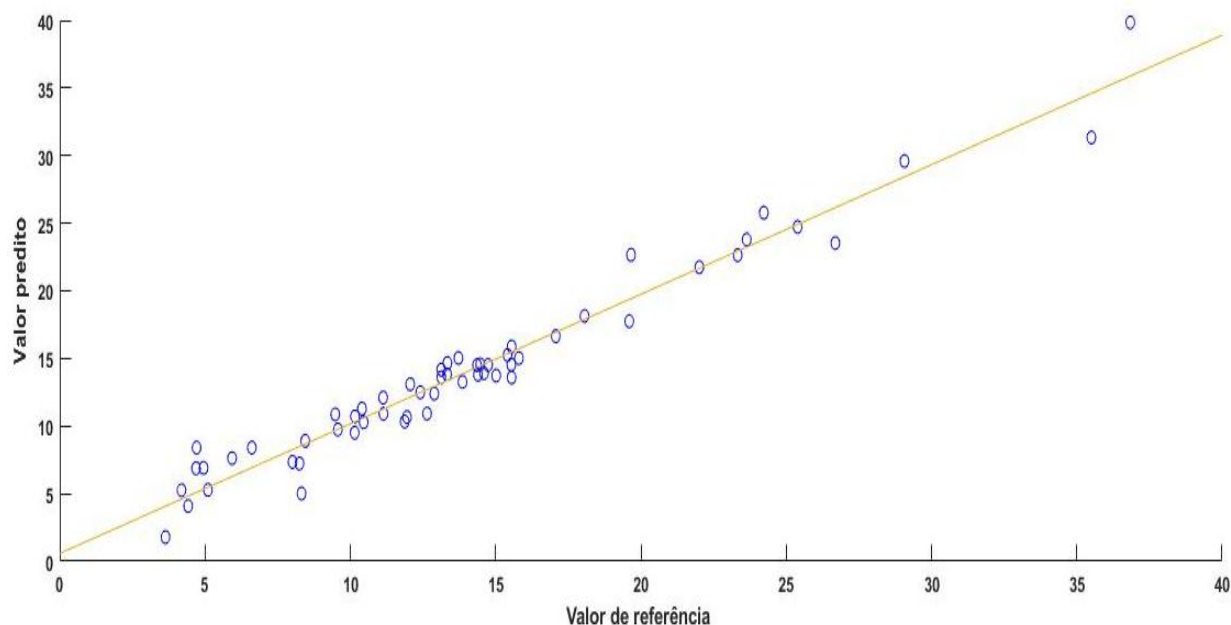
RMSEC: erro quadrático médio de calibração; R^2_C : coeficiente de determinação para calibração; RMSEP: erro quadrático médio de predição; R^2_{Pred} : coeficiente de determinação para a predição; VL: variáveis latentes utilizadas no modelo.

Todos os modelos gerados obtiveram resultados de RMSEP e RMSEC baixos, com relação ao método de referência 36,84 mg GAE/g de pólen ou seja +/- 3,68. Dentre os modelos, o PLS espectros brutos e o PLS pré-tratado com SG (9p) de primeira e segunda ordem e MSC não apresentam resultados satisfatórios..

Pode-se observar na Tabela 3 que a aplicação do pré-tratamento SNV para faixa de comprimento de onda de 4000 a 7000 cm^{-1} obteve melhora nos parâmetros do modelo PLS, principalmente no conjunto de predição com aumento no coeficiente de predição e pela utilização das dez variáveis latente para construção do modelo, apesar das outras técnicas apresentarem resultados pouco próximos, pode-se dizer que o modelo PLS pré-tratado com SNV é mais parcimonioso (menor número de variáveis selecionadas).

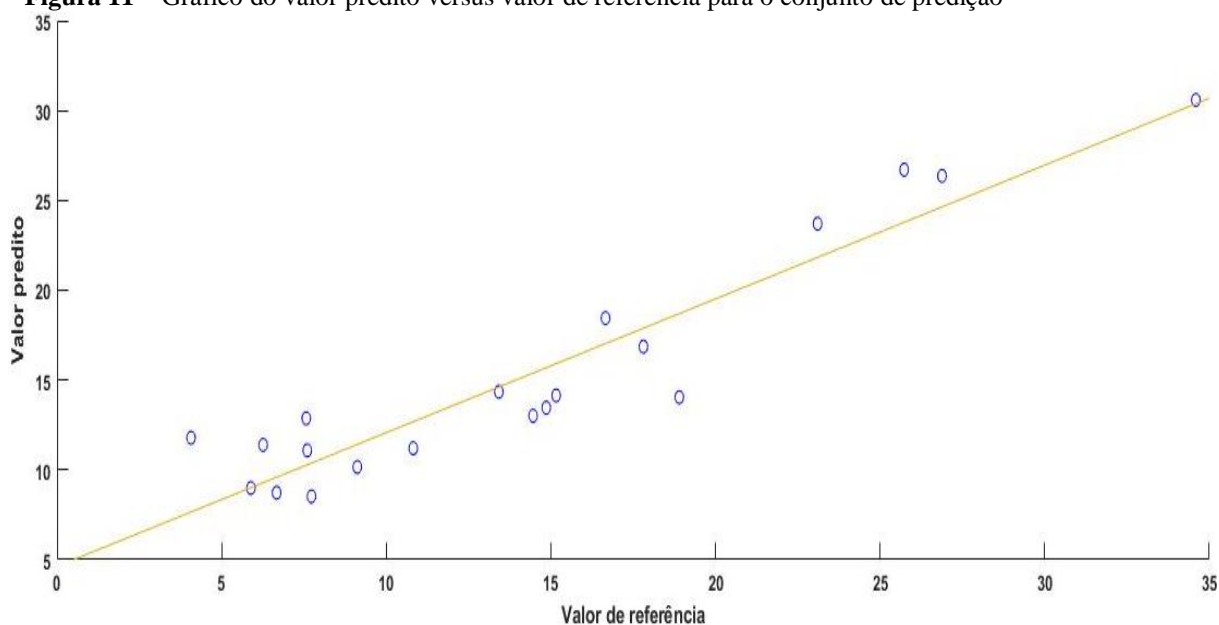
O gráfico de valor predito versus o valor de referência das concentrações dos polifenóis totais em amostras de pólen de abelha para o conjunto de calibração do modelo PLS pré-tratado com SNV, ilustrado na figura 10, apresenta um RMESC de 1,478 e um coeficiente de determinação de 0,968.

Figura 10 – Gráfico do valor predito versus valor de referência para o conjunto de calibração



Fonte: Autor.

O gráfico da figura 11 apresenta o valor predito versus o valor de referência das concentrações dos polifenóis totais em amostras de pólen de abelha para o conjunto de predição do modelo PLS pré-tratado com SNV. O valor do coeficiente de determinação e o RMSEP foram respectivamente iguais a 0,861 e 3,006.

Figura 11 – Gráfico do valor predito versus valor de referência para o conjunto de predição

Fonte: Autor.

A precisão do modelo foi avaliada pelo cálculo do erro médio quadrático de predição (RMSEP) que expressa a concordância entre o valor predito e o valor de referência. Uma vez que, ele pode ser interpretado como o erro de modelagem (El Abassay *et al*, 2011). Entretanto, os valores de RMSEP estão muito próximos do limite em relação ao método de referência, possivelmente porque, apesar das amostras do conjunto de calibração possuir a mesma matriz química das amostras do conjunto de predição, elas apresentam diferenças físicas, como granulometria, e também pela diferença natural nas amostras biológicas que são importantes para modelagem.

O coeficiente de determinação de predição (R^2) representa a porcentagem dos valores de resposta explicados pelo modelo linear. Em geral, valores mais próximos de 1 indicam melhor ajuste para o modelo, enquanto valores próximos de 0 indicam algum grau de desacordo (NAGENDRA e KHARE, 2004). Com isso, o modelo PLS pré-tratado com SNV possui R^2 próximo a 1 mostrando que as amostras estão bem ajustadas ao modelo, e com uma boa correlação entre a propriedade química e a informação contida no espectro NIR.

Pode-se observar na Tabela 3, que o valor obtido para o Bias (erro sistemático) foi menor para os dados pré-tratados com SNV, indicando ausência do erro sistemático, como também indica boa exatidão. A existência desse tipo de erro afeta a precisão, exatidão e a determinação dos intervalos de confiança e por isso sua minimização é desejada.

Em síntese, o resultado do modelo PLS construído para a determinação dos teores de polifenóis totais podem ser considerados satisfatórios e capazes de prever o conteúdo nas amostras de pólen de abelha.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi apresentado o desenvolvimento de uma metodologia simples, rápida e não destrutiva baseada na utilização de espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) e regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS), para a estimativa de polifenóis totais em amostras de pólen de abelha coletado no sudoeste de Buenos Aires - Argentina. A possibilidade de usar as amostras sem preparação prévia leva a uma diminuição significativa no tempo de análise em comparação com os métodos convencionais.

Os melhores resultados foram obtidos empregando-se pré-processamento SNV através da minimização dos valores de RMSEC e RMSEP e da maximização dos valores de R^2_{Pred} , quando comparados à abordagem dos espectros brutos PLS.

Assim, pode-se concluir que a metodologia proposta é uma ferramenta analítica promissora para a monitorização da qualidade do pólen de abelha, em termos de polifenóis totais, em relação ao parâmetro de referência. Contudo, esta qualidade depende essencialmente da natureza química da amostra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, L.; MABOOD, A.; RIZVI, T.S.; REHMAN, N.U.; ARMAN, M.; AL-SHIDANI, S.; AL-ABRI, Z.; HUSSAIN, J.; AL-HARRASI, A. Total polyphenols quantification in *Acridocarpus orientalis* and *Moringa peregrina* by using NIR spectroscopy coupled with PLS regression. **Chemical Data Collections**, 2018.

ALLEGRI, F.; OLIVIERI, A.C. An integrated approach to the simultaneous selection of variables, mathematical pre-processing and calibration samples in partial least-squares multivariate calibration. **Talanta**, v. 115, p. 755 – 760, 2013.

ALOISI, P.V.; RUPPEL, S. Propiedades bioactivas y nutricionales del polen apícola de la provincia del Chubut, Argentina. **Revista de investigaciones agropecuarias**, v. 40, n. 3, 2014.

AMÂNCIO, D.C.P. **Compostos bioativos do pólen**. 2014. 75 f. Dissertação (Mestrado em Química Farmacêutica Industrial) – Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra.

ARES, A.M.; VALVERDE, S.; BERNAL, J. L.; NOZAL, M.J. Extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 110 – 124, 2018.

BARTHUS, R.C.; POPPI, R.J. Determination of the total unsaturation in vegetable oils by Fourier transform Raman spectroscopy and multivariate calibration. **Vibrational spectroscopy**, v. 26, p. 99 – 105, 2001.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 28, n. 1, p. 25 – 30, 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317 – 333, 1998.

BEEBE, K.R.; PELL, R.J.; SEASHOLTZ, M.B. **Chemometrics: A Practical guide**. New York: Wiley & Sons, 1998.

BLANCO, M.; VILLARROYA, I. NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. **Trends in analytical chemistry**, v. 21, n. 4, 2002.

BRO, R. Multivariate Calibration. What is in Chemometrics for the analytical chemist? *Analytica Chimica Acta*. 500: 185, 2003.

CARPES, S.T.; PRADO, A.; MORENO, I.A.M.; MOURÃO, G.B.; ALENCAR, S.M.; MASSON, M.L. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na região sul do Brasil. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1660-1664, 2008

CHEN, D.; GRANT, E. Evaluating the validity of spectral calibration models for quantitative analysis following signal preprocessing. **Anal Bioanal Chem**, v. 404, p. 2317 – 2327, 2012.

COSTA, M.C.A.; MORGANO, M.A.; FERREIRA, M.M.C.; MILANI, R.F. Analysis of bee pollen constituents from different Brazilian regions: Quantification by NIR spectroscopy and PLS regression. **Food Science and Technology**, v. 80, p. 76 – 83, 2017.

DENISOW, B.; DENISOW-PIETRZYKB, M. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2016.

DINIZ, P.H.G. **Determinação do teor de NaCl, Glicose e KCl em medicamentos injetáveis por fotometria usando exploração do efeito Schlieren em sistemas FIA e PLS1**. 2010. 89 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

EL-ABSSAY, R.M.; ERAVUCHIRA, P.J.; DONFACK, P.; KAMMER, B.; MATERNY, A. Fast determination of milk fat content using Raman spectroscopy. **Vibrational spectroscopy**, v. 56, p. 3 – 8. 2011.

FRANCA, A.S.; NOLLET, L. **Spectroscopic methods in food analysis**. Boca Raton: Taylor e Francis, 2017. Disponível em: <
https://books.google.com.br/books?id=SmpQDwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 09 Junho 2018.

FORINA, M.; LANTERI, S.; CASALE, M. Multivariate calibration. **Journal of Chromatography A**, n. 1158, p. 61–93, 2007.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria - conceitos, métodos e aplicações**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2015.

FERREIRA, M.M.; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S.; VOLPE, P.L.O. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, 1999.

FEUDALE, R.N.; WOODY, N.A.; TAN, H.; MYLES, A.J.; BROWN, S.D.; FERRÉ, J. Transfer of multivariate calibration models: a review. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 64, p. 181– 192, 2002.

GELADI, P.; KOWALSKI, B.R. Partial Least-Squares regression – A Tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 185, p. 1 – 17, 1986.

GEMPERLINE, P. **O Practical Guide To Chemometrics**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=xN7LBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=chemometrics+:a+practical&ots=scJFEVoW5Q&sig=iXVh8Pfx6XcyTbaCt4w2BhQjhfk#v=onepage&q=chemometrics%20%3Aa%20practical&f=false>>. Acesso em: 09 Junho 2018.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future, **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, p. 47 – 136, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3 ed. Clarendon, Oxford, p. 936, 2000.

KENNARD, R. W.; STONE, L. A. Computer Aided Design of Experiments. **Technometrics**, v.11, n. 1, p. 137 – 148, 1969.

KOMOSINSKA-VASSEV, K.; OLCZYK, P.; KAZMIERCZACK, J.; MENCNER, L.; OLCZYK, K. Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

KROYER, G.; HEGEDUS, H. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 2, p. 171 – 174, 2001.

LIMA, K.M.G.; RAIMUNDO, I.M.; SILVA, A.M.S.; PIMENTEL, M. F. Sensores ópticos com detecção no infravermelho próximo e médio. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1635 – 1643, 2009.

MACHADO, S.S. **Quantificação da capacidade antioxidante e compostos fenólicos em resíduos vitivinícolas por espectroscopia infravermelho próximo**. 2015. 90 f. Dissertação (Mestrado em Controle de Qualidade) – Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Portugal.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Regulamento técnico para fixação de qualidade e identidade do pólen apícola**. Instrução Normativa n.3, de 19 de janeiro de 2001.

MĂRGHITAS, L.A.; STANCIU, O.G.; DEZMIREAN, D.S.; BOBIS, O.; POPESCU, O.; BOGDANOV, S.; CAMPOS, M.G. *In vitro* antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. **Food Chemistry**, v. 115, p. 878 – 883, 2009.

MENEZES, J.D.S.; MACIEL, L.F.; MIRANDA, M.S.; DRUZIAN, J.I. Compostos bioativos e potencial antioxidante do pólen apícola produzido por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n.12, 2010.

NAGENDRA, S.S.M.; KHARE, M. Artificial neural network based line source models for vehicular exhaust emission predictions of an urban roadway, **Transportation Research: Part D**, v. 9, p. 199 – 208, 2004.

NASCIMENTO, D.S. **Determinação simultânea de Cu, Pb, Cd, Ni, Co e Zn em etanol combustível por voltametria de redissolução adsorptiva e calibração multivariada**. 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R. E. 25 Anos de Quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401-1406, 2006.

NEVES, L.C.; ALENCAR, S.M.; CARPES, S.T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Brazilian Journal of Food Technology**. VII BMCFB, 2009.

PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.14, n. 2, p. 198 – 219, 2003.

PICÓ, Y. Análise química de alimentos. Elsevier, 2015. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=gM6sCQAAQBAJ&pg=PT107&lpg=PT107&dq=nir+e+polifenóis&source=bl&ots=P1bbYeyFXu&sig=WoccR4bTA1v1brhknrBiuvq6ZcM&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwj2mqbBitbZAhXCo1kKHWCwCXwQ6AEIMDAB#v=onepage&q=nir%20e%20polifenóis&f=false> >. Acesso em: 10 Junho 2018.

POPPI, R.J.; SENA, M.M.; FRIGHETTO, R.T.S.; VALARINI, P.J. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. **Química Nova**, v. 23, n. 4, 2000.

RIBEIRO, J.G.; SILVA R.A. Estudo comparativo da qualidade de pólen apícola fresco, recém processado, não processado e armazenado em freezer e pólen de marca comercial através de análises físico-químicas. *Tecnologia e Desenvolvimento sustentável*, v. 2, p. 33 – 47, 2007.

SANTOS, C.A.T.; LOPO, M.; PÁSCOA, R.N.M.; LOPES, J.A. A Review on the Applications of Portable Near-Infrared Spectrometers in the Agro-Food Industry. *Applied Spectroscopy*, v. 67, n. 11, 2013.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELARAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, v. 299, p.152-178, 1999.

SOUZA, A. M. de; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria parte I. *Química Nova*, v. 35, n. 1, p. 223–229, 2012.

SUN, T.; LIN, H.; XU, H.; YING, Y. Effect of fruit moving speed on predicting soluble solids content of ‘Cuiguan’ pears (*Pomaceae pyrifolia* Nakai cv. Cuiguan) using PLS and LS-SVM regression. *Postharvest Biology and Technology*, v. 51, p. 86 – 90, 2009.

VALLESE, F.D. **Determinación de polifenoles y proteínas totales en polen corbicular de la zona del valle inferior del Río Colorado. Empleo de espectroscopia NIR y análisis multivariado.** 2017 Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca - Argentina

VARMUZA, K.; FILZMOSER, P. **Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics.** Boca Raton: Taylor e Francis, 2009. Disponível em: <
<https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=S4btpoIqGP0C&oi=fnd&pg=PR1&dq=introduction+to+multivariate+statistical+analysis+in+chemometrics&ots=zB9uYOjeIp&sig=AL7q1DAPAf8IQxUbRy2JM1RZKHE#v=onepage&q=introduction%20to%20multivariate%20statistical%20analysis%20in%20chemometrics&f=false>>. Acesso em: 09 Junho 2018.

ZIMMER, J.; ANZANELLO, M.J. Um novo método para seleção de variáveis preditivas com base em índices de importância. *Production*, v. 24, n. 1, p. 84 – 93, 2014.

WANG, D.; SRINIVASAN, R. Eliminating the Effect of Multivariate Outliers in PLS-Based Models for Inferring Process Quality. *Computer Aided Chemical Engineering*, v. 26, p. 755 – 760, 2009.

WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 58, p. 109 – 130, 2001.