

Universidade Federal do Amazonas
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química

Estudo químico da Geoprópolis das abelhas *Melipona seminigra* e *Melipona interrupta* utilizando as técnicas de RMN, EM associados à Quimiometria

Leonard Rebello Santos de Souza
Orientadora: Prof. Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura
Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Batista Machado

MANAUS - AM

2018

Universidade Federal do Amazonas
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química
Área de Concentração: Química Orgânica

Estudo químico da Geoprópolis das abelhas *Melipona seminigra* e *Melipona interrupta* utilizando as técnicas de RMN, EM associados à Quimiometria

Dissertação apresentada ao Programa de Pesquisa e Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, com área de concentração em Química Orgânica.

Leonard Rebello Santos de Souza
Orientadora: Prof. Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura
Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Batista Machado

Manaus – AM
2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo (a) autor(a).

S729e Souza, Leonard Rebello Santos de
Estudo químico da Geoprópolis das abelhas *Melipona seminigra* e *Melipona interrupta* utilizando as técnicas de RMN, EM associados à Quimiometria / Leonard Rebello Santos de Souza.
2018
194 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura
Coorientador: Dr. Marcos Batista Machado
Dissertação (Mestrado em Química de Prod. Naturais) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. abelhas sem ferrão. 2. Quimiometria. 3. geoprópolis. 4. Amazônia. I. Nunomura, Dra. Rita de Cássia Saraiva II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

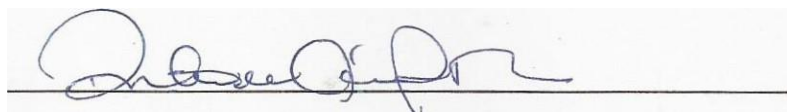
"Estudo químico da geoprópolis das abelhas *Melipona seminigra* e *Melipona interrupta* utilizando as técnicas de RMN, EM associadas à Quimiometria"

Leonard Rabello Santos de Souza

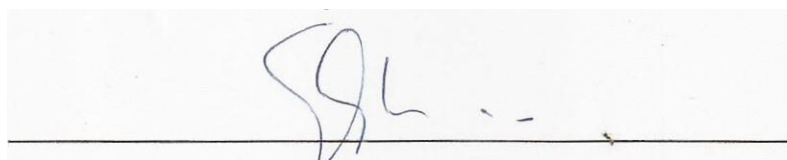
Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovado, em 19 de outubro de 2018.

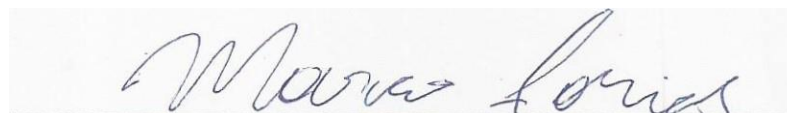
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof.ª Dr.ª Rita de Cássia Saraiva Nunomura
Universidade Federal do Amazonas
Orientador



Prof. Dr.ª Maria Lúcia Belém Pinheiro
Membro UFAM



Prof. Dr. Marco Antônio dos Santos Farias
Membro UFAM

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 19 de outubro de 2018.

Dedico esta dissertação aos meus queridos pais e melhores amigos Jessé Rebello e Izabel Cristina que são exemplos de lealdade, caráter, esforço, carinho e dedicação, por seu apoio incondicional para que mais um degrau da vida profissional e do conhecimento fosse por mim alcançado e que a realização deste sonho pudesse vir a ser concretizado, a eles dedico essa conquista.

AGRADECIMENTOS

A Deus pai todo poderoso por ter iluminado minha trajetória, ter me dado força, discernimento, coragem, perseverança, paciência e sabedoria durante toda a caminhada para esta tão desejada conquista.

Aos meus heróis, meus pais Jessé Rebello e Izabel Cristina por todos os seus ensinamentos e valores, pela compreensão, carinho, amizade, paciência, incentivo e confiança durante toda essa conquista e toda a minha vida.

A Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e em especial ao Programa de Pós-graduação em Química.

Ao Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA) pela colaboração com o material cedido para estudo.

A minha orientadora **Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura** da Universidade Federal do Amazonas (PPGQ – UFAM), pela confiança e ajuda, por acreditar na minha capacidade, pela paciência, amizade, carinho, pelo desafio do projeto, pelos recursos investidos para que o projeto fosse possível e pelo seu convite a orientação do projeto.

Ao meu co-orientador **Dr. Marcos Batista Machado** da Universidade Federal do Amazonas (PPGQ – UFAM), por toda a paciência, disponibilidade, dedicação e esforço, por acreditar no meu potencial, pelas oportunidades de compartilhamento e aprendizado científico, por seu profissionalismo, pela co-orientação e por sua amizade.

À **Dra. Gislene Almeida Carvalho e Zilse** do Grupo de Pesquisas em Abelhas do Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA – GPA), por permitir que fossem coletadas algumas amostras de geoprópolis no Meliponário do (INPA – GPA).

Ao técnico do e **MSc. Diego Cunha de Albuquerque** do Instituto de Pesquisas da Amazônia pela ajuda, disponibilidade e paciência na coleta de amostras de geoprópolis no Meliponário do (INPA – GPA).

Ao técnico do e **MSc. Hélio Vilas Boas** do Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA – GPA) pela ajuda na coleta de amostras de geoprópolis nos outros Meliponários dos Municípios de Manaus e Iranduba.

Ao **Dr. Sérgio Massayoshi Nunomura** (CPPN – INPA) e ao técnico e **MSc. Magno Muniz** pelas análises no equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Resolução.

A **Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza** da Universidade Federal do Amazonas, responsável pelo Laboratório de Bioensaios e micro-organismos da Amazônia (LABCEM – UFAM) e a **MSc. Sarah Raquel Silveira da Silva** (Bionorte – UFAM), pela cooperação nos ensaios antimicrobianos.

Ao Laboratório de Espectrometria de Massas e HPLC (LEMAH) na pessoa do **Dr. Afonso Duarte Leão de Souza**, pelas análises utilizando o equipamento de Espectrometria de Massas.

Aos colegas e alunos de PIBIC (UFAM) estagiários, mestrandos e doutorandos do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (NMRLab) por contribuir com um ambiente de trabalho mais descontraído.

Aos amigos do Laboratório de Abertura de Amostras e Ensaios Químicos (LAEQ – UFAM) que tornaram o ambiente de trabalho mais descontraído e a todos os outros colegas da Central Analítica (CAM – UFAM).

À **CAPES**, pelo fornecimento da Bolsa.

A todos aqueles que de alguma maneira colaboraram para que o trabalho fosse executado, mas que não tiveram seus nomes citados, o meu muito obrigado.

"É graça divina começar bem. Graça maior é persistir na caminhada certa. Mas a graça das graças é não desistir nunca"

(Dom Hélder Câmara)

RESUMO

A humanidade sempre buscou na natureza fontes de matérias-primas, seja de origem vegetal ou em produtos oriundos de animais que pudessem ser utilizadas com cunho terapêutico e medicinal para o tratamento de suas enfermidades. Dentre os muitos, um tem sido utilizado ao longo dos anos pelos habitantes da região Amazônica, a geoprópolis, que é produzida pelas abelhas sem ferrão do gênero *Melipona*. As espécies *M. seminigra* e *M. interrupta* são conhecidas por serem pouco agressivas e bastante sociáveis facilitando sua criação e manejo por meio da Meliponicultura. A geoprópolis possui uma composição complexa rica em diversas classes química muito por sua formação incluir partes de vegetais, resinas, pólenes, além da mistura de solo e minerais e que como consequência podem proporcionar atividades biológicas promissoras como, antitumoral, antitussígeno, antioxidante, antiparasitário, antimicrobiano, antisséptico, antimutagênico, anti-inflamatório e imunomoduladora, tornando-a bastante apreciável pelas comunidades consumidoras. Na Amazônia além do clima, a flora utilizada para coleta de subsídios por parte das abelhas influencia diretamente na composição química da geoprópolis, refletindo nas propriedades biológicas do produto. A quantidade reduzida de estudos sobre a composição química da geoprópolis e possível origem botânica das substâncias, ressaltaram a importância de se realizar a pesquisa. Nesse contexto, foi desenvolvido o estudo para caracterizar quimicamente a geoprópolis de cinco diferentes localidades dos arredores de Manaus. Os extratos metanólicos foram obtidos pela metodologia de maceração (48h) da geoprópolis seguido de banho ultrassônico (20min), filtrados e analisados por Espectrometria de Massas (EM) e Espectroscopia de Ressonância Magnética (RMN) e foi possível diferenciar os constituintes químicos entre os pontos de coleta por meio da Quimiometria (PCA e HCA) evidenciando a presença de flavonoides, ácidos orgânicos e benzofenonas. Por injeção direta no equipamento de Espectrometria de Massas de Alta Resolução foram propostas vinte e oito substâncias químicas. As análises por CG-MS revelaram a presença de quatorze substâncias terpênicas. Os resultados de CI50 e fenóis totais apresentaram potencial anti-radicalar para os extratos da geoprópolis das espécies de estudo. O ensaio antimicrobiano dos extratos de *M. interrupta* mostrou resultados satisfatórios de inibição e morte frente as cepas *E. faecalis* e *S. aureus*. A pesquisa contribuiu com conhecimento químico e biológico acerca da geoprópolis das abelhas *M. seminigra* e *M. interrupta*, posto que existem poucos relatos na literatura sobre o produto.

Palavras-Chave: abelhas sem ferrão, Quimiometria, RMN, EM, geoprópolis, Amazônia.

ABSTRACT

Mankind has always sought in nature sources of raw materials, whether of vegetable origin or products derived from animals that could be used with therapeutic and medicinal characteristics for the treatment of their diseases. Among the many, one has been used over the years by the inhabitants of the Amazon region, the geopropolis, which is produced by stingless bees of the genus *Melipona*. The *M. seminigra* and *M. interrupta* species are known to be less aggressive and quite sociable, facilitating their creation and management through Meliponicultura. The geopropolis has a complex composition rich in several chemical classes greatly because of its formation include parts of plants, resins, pollen, in addition to the soil and mineral mixture and which consequently can provide promising biological activities such as antitumor, antitussive, antioxidant, antiparasitic, antimicrobial, antiseptic, antimutagenic, anti-inflammatory and immunomodulatory, making it very appreciable by consumer communities. In the Amazon, besides the climate, the flora used to collect bee subsidies directly influences the chemical composition of the geopropolis, reflecting the biological properties of the product. The reduced amount of studies on the chemical composition of the geopropolis and the possible botanical origin of the substances, emphasized the importance of conducting the research. In this context, the study was developed to chemically characterize the geopropolis of five different locations in the vicinity of Manaus. The methanolic extracts were obtained by the methodology of maceration (48h) of the geopropolis followed by ultrasonic bath (20min), filtered and analyzed by Mass Spectrometry (EM) and Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) and it was possible to differentiate the chemical constituents between the points (PCA and HCA) evidencing the presence of flavonoids, organic acids and benzophenones. Twenty-eight chemical substances were proposed by direct injection into the High Resolution Mass Spectrometry equipment. GC-MS analyzes revealed the presence of fourteen terpene substances. The results of IC 50 and total phenols presented anti-radical potential for the extracts of the geopropolis of the study species. The antimicrobial assay of the extracts of *M. interrupta* showed satisfactory results of inhibition and death against strains *E. feacalis* and *S. aureus*. The research contributed with chemical and biological knowledge about the bees' geoprópolis *M. seminigra* and *M. interrupta*, since there are few reports in the literature about the product.

Keywords: stingless bees, chemometrics, NMR, MS, geopropolis, Amazon.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>M. seminigra</i> : A) Entrada: formato de Trombeta; B) Coloração castanho-avermelhado.....	29
Figura 2 – <i>M. interrupta</i> : A) Entrada: geoprópolis esbranquiçado e um vigilante; B) Coloração escura.	30
Figura 3 – Mapa Geral dos cinco pontos de coleta da geoprópolis na região do Amazonas. .	48
Figura 4 – Ampliação por área: (A) Inpa – GPA; (B) Brasileirinho; (C) Tarumã; (D) Puraquequara; (E) Iranduba;	49
Figura 5 - Equipamento de cromatografia gasosa (Thermo Scientific), modelo: Trace CG Ultra associado ao espectrômetro de massas (Thermo Scientific), modelo: DSQIII.	55
Figura 6 - Gráfico de <i>scores</i> (PC1xPC2) dispersão das amostras da espécie <i>M. seminigra</i> dos cinco pontos de coleta com somatória de 56% de variância explicada. Pré-processamento: SNV e Normalizado por <i>range</i>	67
Figura 7 - Gráfico de <i>loadings</i> (PC1 x PC2) referente aos bucketings de maior peso nos espectros das amostras da espécie <i>M. seminigra</i> dos cinco pontos de coleta. Pré-processamento: SNV e Normalizado por <i>range</i>	68
Figura 8 – Deslocamentos químicos referentes aos <i>loadings</i> 58 e 65 (Puraquequara) e 50 e 52 (Iranduba).	68
Figura 9 – Perfis espectrais das 30 amostras de <i>M. seminigra</i> com a representação dos sinais (destaque vermelho) exclusivos dos <i>loadings</i> das regiões: (A) Puraquequara 58 e 65 ; (B) Iranduba 50 e 52 ;	69
Figura 10 - Deslocamentos químicos referentes aos valores de peso 54 e 72 das áreas do Brasileirinho e Tarumã.	69
Figura 11 - Deslocamentos químicos dos bucketings 51, 56, 67 e 68 da área do Inpa.	70
Figura 12 - Perfis espectrais das 30 amostras de <i>M. seminigra</i> com os sinais dos <i>loadings</i> 51, 56, 67 e 68 exclusivos da região do Inpa;.....	70
Figura 13 - Dendograma (HCA) distância euclidiana das amostras da espécie de <i>M. seminigra</i> com representação dos principais grupos formados.	71
Figura 14 – Gráfico de pesos dos bucketings (PC1) das 30 amostras da espécie <i>M. seminigra</i>	72
Figura 15 – Gráfico de pesos dos <i>bucketings</i> (PC2) das 30 amostras da espécie <i>M. seminigra</i>	72

Figura 16 - Gráfico de biplot (PC1 x PC2) da dispersão dos <i>loadings</i> e <i>scores</i> das amostras da espécie <i>M. interrupta</i> dos cinco pontos de coleta com somatória de 77% de variância explicada.	73
Figura 17 – Comparativos entre os 24 perfis espectrais das amostras de <i>M. interrupta</i> onde a linha tracejada indica sinais similares e a linha contínua vermelha revela sinais diferentes mas insuficientes para distinção química.	73
Figura 18 – Comparação entre os sinais químicos de H ¹ das amostras (32, 39, 43, 45, 48, 50) de <i>M. interrupta</i> e a amostra (3) de <i>M. seminigra</i>	74
Figura 19 – Comparação entre os cromatogramas das amostras (32, 39, 43, 45, 48, 50) de <i>M. interrupta</i> e a amostra (4) de <i>M. seminigra</i> obtidos por LC-MS.	75
Figura 20 – Estrutura numerada do ácido anacárdico	76
Figura 21 –Espectro de Massas (LC-MS), ácido anacárdico m/z: 347, 2590 [M-H] ⁻ . (A) MS: 347, 2590; (B) MS ² : 347,2590 → 303,2770.	82
Figura 22 – Estrutura numerada da aromadendrina	85
Figura 23 - Espectro de Massas (LC-MS), aromadendrina m/z: 287,0548 [M-H] ⁻ . (A) MS: 287,0545; (B) MS ² : 287,0545 → 259,0570, 177, 0575, 151,0050 e 125,0266.	93
Figura 24 – Estrutura numerada da naringenina-4'-β-glicopiranosídeo	95
Figura 25 - Espectro de Massas (LC-MS), naringenina-4'-β-glicopiranosídeo m/z: 433,1125 [M-H] ⁻ . (A) MS: 271,0603; (B) MS ² : 271,0603 → 115,0036, 177,0224, 151,0050, 119,0525, 107,0148 e 93,0325.	104
Figura 26 – Estrutura numerada da guttiferone C	107
Figura 27 - Perfil de fragmentação ms ² , [M-H] ⁻ dos íons: (A) ESI-EM m/z: 669 (30 eV); (B) LC-ESI-MS m/z: 669,4333;	109
Figura 28 – Gráfico de <i>scores</i> tridimensional (PC1 x PC2 x PC3) das abundâncias relativas (%) referente aos íons de maior intensidade revelados [M-H] ⁻ , das amostras da espécie <i>M. seminigra</i> dos cinco pontos de coleta.	114
Figura 29 - Gráfico de <i>loadings</i> (PC1 x PC2 x PC3) das abundâncias relativas (%) dos íons de maior intensidade revelados [M-H] ⁻ das amostras da espécie <i>M. seminigra</i> dos pontos de coleta, pré-processamento SNV.	115
Figura 30 – Espectros de massas das amostras de <i>M. seminigra</i> revelando a presença e ausência dos íons 187, 475 e 501 do Grupo II indicado no PCAs (<i>loadings</i>).	116
Figura 31 – Dendograma (HCA) distância euclidiana. (A) Formação de três grupos; (B) Formação de dois grupos;	117

Figura 32 - Gráfico de <i>scores</i> (PC1 x PC2 x PC3) das abundâncias relativas (%) dos íons de maior intensidade revelados [M-H] ⁻ das amostras da espécie <i>M. interrupta</i> dos cinco pontos de coleta, pré-processamento SNV.	118
Figura 33 - Gráfico de <i>loadings</i> tridimensional (PC1 x PC2 x PC3) das abundâncias relativas (%) dos íons de maior intensidade revelados [M-H] ⁻ das amostras da espécie <i>M. interrupta</i> dos cinco pontos de coleta.....	119
Figura 34 - Dendograma (HCA) distância euclidiana, amostras da espécie de <i>M. interrupta</i> com representação dos três grupos formados.	120
Figura 35 – Espectros das amostras do Brasileirinho confirmando a presença de benzofenonas.	121
Figura 36 – Perfil de fragmentação ms ² modo negativo dos íons quasi moleculares (1) m/z: 169 do ácido gálico e (2) m/z: 187 do ácido 3-hidroxidecanóico utilizando 27 eV e 25 eV de energia de colisão.	123
Figura 37 - Perfil de fragmentação ms ² [M-H] ⁻ dos íons quasi moleculares (3) m/z: 191 do ácido quínico e (4) m/z: 195 do ácido glucônico, todos com aplicação de energia de colisão de 25 eV.	124
Figura 38 - Espectros dos íons <i>quasi</i> moleculares em [M-H] ⁻ (1-a) m/z: 169 e (4-a) m/z: 195.	125
Figura 39 - Espectros dos íons quasi moleculares ms ² [M-H] ⁻ para os íons m/z: 183.	125
Figura 40 - Perfil de fragmentação ms ² do [M-H] ⁻ dos íons quasi moleculares m/z: 311, m/z: 325 e m/z: 339 com aplicação de energia de colisão de 30, 28 e 30 eV respectivamente.	126
Figura 41 – Espectros obtidos por injeção direta no equipamento de massas de alta resolução utilizando em [M-H] ⁻ para obtenção dos íons quase moleculares m/z: 311, 325 e 339.	127
Figura 42 - Perfil de fragmentação ms ² do íon quase molecular m/z: 215, energia de colisão de 28 eV.	127
Figura 43 - Perfil de fragmentação ms ² [M-H] ⁻ do íon m/z: 433: (10) ESI-EM utilizando energia de colisão de 25 eV; (10-a) Fragmento do íon m/z: 433 por LC-ESI-MS.....	128
Figura 44 - Perfil de fragmentação ms ² , [M-H] ⁻ do íon m/z: 449: (11) ESI-EM utilizando energia de colisão de 30 eV; (11-a) Fragmento do íon m/z: 433 por LC-ESI-MS.....	129
Figura 45 - Perfil de fragmentação ms ² do íon m/z: 255, ESI-EM utilizando energia de colisão de 28 eV.....	130
Figura 46 - Perfil de fragmentação ms ² do íon m/z: 469, ESI-EM utilizando energia de colisão de 25 eV.....	130

Figura 47 - Perfil de fragmentação ms^2 $[M-H]^-$ dos íons m/z : 475 e 485 com energia de colisão de 25 e 29 eV.....	131
Figura 48 - Perfil de fragmentação ms^2 $[M-H]^-$ dos íons: (15) ESI-EM m/z : 501 (26 eV); (15-a) LC-MS m/z : 501.....	132
Figura 49 - Perfil de fragmentação ms^2 $[M-H]^-$ dos íons: (17) ESI-EM m/z : 669 (30 eV); (17-a) LC-ESI-MS m/z : 669.....	133
Figura 50 - Espectro obtido por análise de LC-ESI-MS em $[M-H]^-$ ms^2 para o íon m/z : 601.	134
Figura 51 - Espectro de Massas (LC-MS) das amostras de <i>M. seminigra</i> . (A) Inpa (4); (B) Brasileirinho (15); (C) Tarumã (19); (D) Iranduba (11); (E) Puraquequara (30).	136
Figura 52 – Espectro de Massas (LC-MS) das amostras de <i>M. interrupta</i> . (A) Inpa (32); (B) Brasileirinho (37); (C) Tarumã (43); (D) Iranduba (48); (E) Puraquequara (54).	136
Figura 53 – (A) Corrida cromatográfica dos primeiros 22 min, substâncias identificadas: (1) palmitato de metila; (2) linoleato de metila; (3) oleato de metila; (4) esterato de metila; (5) não identificada;	141
Figura 54 – Corridas cromatográficas das amostras de <i>M. seminigra</i> das cinco regiões: presença e ausência de sinal da substância (1) palmitato de metila.	141
Figura 55 – Corridas cromatográficas das amostras de <i>M. seminigra</i> das cinco regiões indicando presença e ausência de sinais das substâncias (2) linoleato de metila, (3) oleato de metila, (4) esterato de metila.	142
Figura 56 – Perfis cromatográficos das amostras da região do Puraquequara indicando a presença e ausência dos ésteres metílicos (1) palmitato de metila, (2) linoleato de metila, (3) oleato de metila;.....	143
Figura 57 – Corridas cromatográficas das amostras de <i>M. interrupta</i> das cinco regiões, presença de sinais das substâncias (1-4) e ausência da (5) TR = 20,16 min.	144
Figura 58 – Espectro de massa da substância: (1) hexadecanoato de metila - palmitato de metila (94,04%-NIST);	144
Figura 59 – Espectros de massas das substâncias: (2) (Z,Z)- 9,12-octadecadienoato de metila - linoleato de metila; (3) metil-cis-9-octadecenoato - oleato de metila (95,28%-NIST); (4) octadecenoato de metila - esterato de metila (92,48%-NIST);	145
Figura 60 – Espectros de massas das substâncias: (5) não identificada;	146
Figura 61 – Corrida cromatográfica dos últimos 38 min, sete substâncias identificadas: (6) lanosta-8-24-dien-3-ona; (7) lanosterol; (8) β -amirona; (9) β -amirina; (10) α -amirona; (11) não	

identificada; (12) β -amirina; (13) 24-metileno cicloartano-3-ona; (14) 9,19-ciclo lanostano-24-en-3- β -ol.	148
Figura 62 – Perfis cromatográficos das amostras da espécie <i>M. seminigra</i> das cinco regiões a presença e ausência das substâncias: (6) lanosta-8-24-dien-3-ona e (7) lanosterol;	148
Figura 63 – Perfis cromatográficos das amostras da espécie <i>M. interrupta</i> das cinco regiões a presença e ausência das substâncias: (6) lanosta-8-24-dien-3-ona e (7) lanosterol;	149
Figura 64 – Perfis cromatográficos das amostras de <i>M. seminigra</i> das cinco regiões confirmando a presença das substâncias: (8) β -amirona, (9) β -amirina, (10) α -amirona e (12) α -amirina;	150
Figura 65 – Perfis cromatográficos das amostras de <i>M. interrupta</i> das cinco regiões confirmando a presença e ausência das substâncias: (8) β -amirona, (9) β -amirina, (10) α -amirona e (12) α -amirina;	150
Figura 66 – Perfis cromatográficos das amostras de <i>M. interrupta</i> das cinco regiões confirmando a presença e ausência das substâncias: (11) não identificada, (13) 24-metileno cicloartano-3-ona e a (14) 9,19-ciclo lanostano-24-metileno- 2- β -ol;.....	151
Figura 67 – Perfis cromatográficos das amostras de <i>M. interrupta</i> das cinco regiões confirmando a presença e ausência das substâncias: (11) não identificada, (13) 24-metileno cicloartano-3-ona e a (14) 9,19-ciclo lanostano-24-metileno- 2- β -ol;.....	151
Figura 68 – Espectros de massas das substâncias: (6) lanosta-8-24-dien-3-ona;.....	152
Figura 69 – Espectros de massas das substâncias: (7) lanosterol;.....	153
Figura 70 – Espectros de massas das substâncias: (8) β -amirona, (9) β -amirina;.....	154
Figura 71 - Espectro de massa da substância: (10) α -amirona e (12) α -amirina.	155
Figura 72 - Espectro de massas da substância: (13) 24-metileno cicloartano-3-ona.	156
Figura 73 - Espectro de massas da substância: (14) 9,19-ciclo lanostano-24-en- 2- β -ol.	157
Figura 74 - Espectro de massas da substância (11) não identificada presente em amostras de ambas as espécies de <i>Melipona</i> ;	158
Figura 75 – Constatação da atividade antimicrobiana frente a bactéria <i>Enterococcus faecalis</i> . (A) Placa de Petri (inibição bacteriostática); (B) Placa de Eliza 96 poços (CIM).	163

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Flavonoides encontrados em extrato de geoprópolis do gênero <i>Melipona</i>	35
Tabela 2 - Ácidos fenólicos encontrados em extrato de geoprópolis do gênero <i>Melipona</i>	37
Tabela 3 - Triterpenos encontrados em extratos da geoprópolis de <i>Melipona</i>	39
Tabela 4 - Cumarinas e benzofenos encontrada no extrato de geoprópolis de <i>Melipona</i>	40
Tabela 5 – Atividades biológicas em extratos de geoprópolis do gênero <i>Melipona</i>	41
Tabela 6 – Especificação das coordenadas geográficas de cada região;	49
Tabela 7 – Massas finais (g) e rendimentos (%) individuais das amostras de geoprópolis da espécie <i>M. seminigra</i>	61
Tabela 8 - Massas finais (g) e rendimentos (%) individuais das amostras de geoprópolis da espécie <i>M. interrupta</i>	62
Tabela 9 – Massa final (mg) das fases obtidas por partição líquido-líquido dos extratos da <i>M. seminigra</i>	64
Tabela 10 - Rendimento (mg) das fases obtidas por partição líquido-líquido dos extratos da <i>M. interrupta</i>	65
Tabela 11 - Principais deslocamentos químicos de H^1 , C^{13} e correlações HMBC obtidos para o ácido anacárdico.	83
Tabela 12 - Principais deslocamentos químicos de H^1 , C^{13} e correlação de HMBC obtidos para a aromadendrina.	94
Tabela 13 - Principais deslocamentos de H^1 , C^{13} e HMBC para a naringenina-4'- β -glicopiranosídeo.	103
Tabela 14 – Deslocamentos químicos obtidos por RMN de H^1 para a Guttiferona C.	111
Tabela 15 – Principais correlações H^1 - H^1 obtidos por COSY para a Guttiferona C.	112
Tabela 16 - Principais correlações de H^1 - C^{13} obtidas por HSQC para a Guttiferona C.	112
Tabela 17 - Correlações de H^1 - C^{13} obtidas por HMBC para a Guttiferona C. “continua”	112
Tabela 18 – Deslocamentos químicos de C^{13} , H^1 e correlação HMBC da substância Guttiferona C.	113
Tabela 19 – Principais íons identificados nos grupos formados pela análise quimiométrica da <i>M. seminigra</i>	122
Tabela 20 – Principais íons identificados nos grupos formados pela análise quimiométrica da <i>M. interrupta</i>	122

Tabela 21 – Principais propostas de substâncias para os íons precursores presentes nos grupos I, II e III do gráfico de PCA (loadings).	135
Tabela 22 – Principais propostas de identificação para as substâncias a partir dos seus íons precursores obtidos por Injeção direta.....	137
Tabela 23 – Principais propostas de substâncias identificadas por CG-EM da geoprópolis; 140	
Tabela 24 – Valores de Média $\pm$ DP de CI50 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e FT ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) das principais amostras de <i>M. seminigra</i>	159
Tabela 25 - Valores de Média $\pm$ DP de CI50 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e FT ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) das principais amostras de <i>M. interrupta</i>	160

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Comparativo entre as medianas dos extratos metanólicos das espécies <i>M. seminigra</i> e <i>M. interrupta</i>	63
Gráfico 2 - Comparativo entre as médias das fases hexânicas das espécies <i>M. seminigra</i> e <i>M. interrupta</i>	66
Gráfico 3 - Resposta de CI50 dos extratos metanólicos da <i>M. seminigra</i> e <i>M. interrupta</i>	161
Gráfico 4 - Resposta de FT dos extratos metanólicos da <i>M. seminigra</i> e <i>M. interrupta</i>	161

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 - Preparo dos extratos metanólicos.....	50
Fluxograma 2 - Preparo das partições líquido-líquido dos extratos metanólicos.	51

LISTA DE SIGLAS

%CS50 – Capacidade de sequestro que causa 50 % de perda da atividade do radical DPPH

ANOVA – Análise de Variância

ChEBI – Chemical Entities of Biological Interest

ChEMBL – Chemical European Molecular Biology Laboratory

COX - Ciclo-oxigenase

DMSO - Dimetilsulfóxido

DPPH – 1,1-difenil-2-picril-hidrazil

EM –Espectrometria de Massas

GPA – Grupo de Pesquisa em Abelha

HCA – Análise de Agrupamentos Hierárquicos

HMDB – Humano Metabolômica Database

LC-EM – Cromatografia Líquida de Alta Resolução acoplada a Espectrometria de Massas

ICS - International Chemometrics Society

INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

LAB-MICRA - Laboratório de Bioensaios e Microorganismos da Amazônia

LAEQ – Laboratório de Aberturas de Amostras e Ensaios Químicos

LEMAH – Laboratório de Espectrometria de Massas e HPLC

MeOD – Metanol deuterado

MeOH - Metanol

NBT - Nitroazul de tetrazólio

NIST – National Institute of Standards and Technology

PCA – Análise por Componentes Principais

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMNLAB - Laboratório da Central Analítica de Ressonância Magnética Nuclear

TIC – Cromatograma de Íons Totais

TMS – Tetrametilsilano

TTC - 2,3,5-cloreto de 2,3,4-trifeniltetrazólio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	24
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo Geral	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
3.1. Conhecendo as abelhas sem ferrão do gênero <i>Melipona</i>	26
3.2. Meliponário O lar das abelhas	28
3.3. Espécies de Estudo Abelha <i>Melipona seminigra</i>	29
3.4. Espécies de Estudo Abelha <i>Melipona interrupta</i>	30
3.5. Espécies florísticas visitadas pelas abelhas sem ferrão	31
3.6. Geoprópolis e a sua Constituição Química	34
3.7. Propriedades biológicas da geoprópolis enaltecidas pela química.....	40
3.8. Estudo de metabolômica por EM e RMN aplicadas a Quimiométrico	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1. Coleta das amostras.....	48
4.2. Preparo dos extratos metanólicos de geoprópolis.....	50
4.3. Método de Separação	51
4.3.1. Extração Líquido-Líquido para EM.....	51
4.4. Métodos espectrométricos.....	51
4.4.1. Análise por Espectrometria de massas (EM)	51
4.4.2. Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética (RMN)	52
4.5. Métodos cromatográficos.....	54
4.6. Análises Estatísticas e Quimiométricas	56
4.7. Ensaios Químicos e Biológicos.....	57
4.7.1. Atividade antioxidante capacidade de sequestro do radical livre DPPH	57
4.7.2. Determinação de Fenólicos Totais	58
4.8.1. Ensaio de atividade antimicrobiana.....	58
4.8.2. Teste de determinação da efetividade das amostras frente aos patógenos.....	59
4.8.3. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) em placa de Elisa.....	60

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1. Rendimento do material geoprópolis extraído para as análises posteriores	61
5.2. Rendimento da partição líquido-líquido do extrato metanólico	64
5.3. Análise Quimiométrica dos dados de Ressonância Magnética Nuclear	67
5.4. Caracterização das principais substâncias químicas a partir dos <i>bucketings</i> obtidos por análise Quimiométrica das amostras de <i>M. seminigra</i>	76
5.5. Análise Quimiométrica a partir dos dados de Espectrometria de Massas.....	114
5.5.1 Identificação das principais substâncias químicas a partir da análise Quimiométrica	123
5.6. Proposta de identificação das substâncias químicas por análise LC-MS.....	136
5.7. Caracterização química por Cromatografia Gasosa (CG-EM)	139
5.8. Ensaios das atividades Químicas e Biológicas.....	159
5.8.2. Detecção de atividade Antimicrobiana	163
CONCLUSÃO.....	166
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	167
APÊNDICE	191

1. INTRODUÇÃO

Desde os tempos antigos, o ser humano buscou na natureza produtos que pudessem ser utilizados para fins medicinais tratando uma grande diversidade de doenças. Um exemplo disso são as abelhas, que fornecem produtos tradicionalmente consumidos pelo homem e que apresentam propriedades nutricionais, medicinais e terapêuticas interessantes (WAGH, 2013).

Dentre os produtos, o mel e o pólen são utilizados como alimento e manutenção da colmeia, mas também, destaca-se a própolis, resina formada pela união de restos de vegetais, cascas de árvores, pólenes, saliva, o que garante uma constituição química rica e complexa, influenciando nas propriedades biológicas do produto. Esta combinada ao barro, pelas abelhas sem ferrão garantem a consistência sólida, denominada de geoprópolis (CARVALHO-ZILSE; NUNES-SILVA, 2012; DA CUNHA *et al.*, 2013;).

Tradicionalmente a própolis é utilizada pelos humanos em diversas comunidades, e o conhecimento popular passado de geração a geração. Há registros datados de 300 a.C., da utilização por diversos povos como os: babilônios, gregos, assírios, romanos, incas, maias, astecas e egípcios, no tratamento de enfermidades, lesões de pele, úlceras, e na preparação e embalsamento de múmias, no Antigo Egito (FREIRES; DE ALENCAR; ROSALEN, 2016).

No Brasil, a própolis foi explorada pela primeira vez pelos indígenas e o conhecimento transcendeu para às mais diversas regiões com destaque para a norte e nordeste, devido as suas inúmeras propriedades: antioxidante, antimicrobiano entre outras. Esta é utilizada no combate de doenças pulmonares, infecção dos olhos, revigorantes e agentes bactericidas nas comunidades. Além desse produto, a geoprópolis endurecida, era utilizada pelas comunidades indígenas na composição do material para a produção de utensílios (ferramentas) e nos sepultamentos (vedação) das urnas. (BARTH; BARROS; FREITAS, 2009; SFORCIN; BANKOVA, 2011; DA CUNHA *et al.*, 2013;).

Este trabalho tem como escopo a caracterização dos perfis químicos presentes nas geoprópolis das duas abelhas, *M. interrupta* e *M. seminigra*, visto que algumas de suas propriedades biológicas são exploradas pelas comunidades da região Amazônica que fazem uso da própolis seja como consumo próprio ou como fonte de renda. Assim utilizando as técnicas de RMN, EM associadas a Quimiometria e CG-EM, juntamente a realização de ensaios químicos e biológicos foram obtidas informações importantes a respeito da composição deste produto.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- ✓ Determinar o perfil químico, atividade antimicrobiana e antioxidante de geoprópolis das espécies de abelhas *Melipona seminigra* e *Melipona interrupta* endêmicas da Região Norte.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Comparar os perfis químicos de geoprópolis das espécies *Melipona seminigra* e *Melipona interrupta* empregando espectros de RMN e EM assistidos por ferramentas quimiométricas.
- ✓ Identificar as principais substâncias químicas responsáveis pela tipificação dos grupos em relação ao ponto de coleta utilizando dados obtidos de *loadings* (PCA) referente as técnica de Espectrometria de Massas (EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN);
- ✓ Analisar os constituintes químicos presentes nas fases hexânicas de geoprópolis de *Melipona seminigra* e *M. interrupta* por CG-MS;
- ✓ Determinar os potenciais antioxidantes dos extratos metanólicos de geoprópolis em relação a região de coleta e a espécie via DPPH e Fenóis Totais;
- ✓ Avaliar atividade antimicrobiana frente as cepas *E. feacalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans* e *C. Tropicalis*, nos extratos metanólicos das espécies *M. seminigra* e *M. interrupta*;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Conhecendo as abelhas sem ferrão do gênero *Melipona*

Os insetos voadores além da sua importância na cadeia alimentar, possuem um papel ecológico gigantesco nos ecossistemas, atuando como agentes polinizadores da flora, dentre eles estão as abelhas com grande parcela nesta função. Pertencentes ao filo Arthropoda, classe Insecta, ordem dos Hymenoptera, família Apidae e divididas em quatro subfamílias: Apinae, Bombinae, Euglossinae e Meliponinae. As abelhas têm hábitos sociais bem característicos e avançados o que lhes permite viver em uma sociedade com divisão de trabalho.(KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1967; NOGUEIRA-NETO, 1997; OLIVEIRA, F. F. *et al.*, 2013;).

Um grupo específico de abelhas, o das sem-ferrão da tribo Meliponini, têm chamado a atenção de pesquisadores devido as propriedades biológicas antioxidantes, anti-inflamatória, antimicrobiana presente na geoprópolis, muito relacionados com constituintes químicos das mais diferenciadas classes de substâncias como fenólicos, triterpenos, flavonoides entre outras, as quais favorecem as características biológicas do produto (BURDOCK, 1998; MURAD *et al.*, 2002; CÁMARA *et al.*, 2004;)

Os insetos desta tribo fazem parte de um montante de 417 espécies e possuem distribuição na região neotropical que engloba localidades na América Central (parte tropical) e regiões na América do Sul (subtropical do globo) (CAMARGO, J.M.F. & PEDRO, 2007; PEDRO, 2014). No Brasil em especial, há uma distribuição expressiva de espécies de abelhas sem ferrão, sendo 244 pertencentes a 29 gêneros distintos e todas são reconhecidas e validadas no território nacional. Do total, 87 são endêmicas da fauna do território brasileiro e duas tem destaque na Região Amazônica, a *M. seminigra* e a *M. interrupta*, devido aos seus potenciais melíferos e de seus outros produtos (OLIVEIRA *et al.*, 2013; PEDRO, 2014; CORREIA *et al.*, 2016;).

As abelhas deste gênero são caracterizadas pela atrofia do ferrão, o que as impossibilita de ferir seus oponentes quando atacadas, daí a denominação “sem ferrão” (MOURE, 1961; KERR *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2013; PEDRO, 2014). As *Meliponas* se protegem geralmente realizando ataques em massas sobre seus oponentes aplicando mordidas sobre os pelos e a pele do agressor (KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1967; FRAZ, 2013). Na sua maioria, agrupam-se nas árvores, em cavidades subterrâneas como casas vazias de cupins,

fendas de paredes e rochas, ninhos abandonados de formiga arborícola ou de aves locais (KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 2013;).

A diversidade da flora das matas tropicais fornece um extenso campo alimentício para as abelhas sem-ferrão, contribuírem com a manutenção, diversificação genética de várias plantas na polinização (BACELAR-LIMA *et al.*, 2006; CARVALHO-ZILSE *et al.*, 2007).

No caso da Região Amazônica a polinização da flora nativa vai de 40 a 90%, sendo que 60% da fauna é hermafrodita, ou seja, dependem diretamente do trabalho das abelhas sem ferrão e cerca de 38% das espécies vegetais são polinizadas por abelhas (KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996; CÁMARA *et al.*, 2004; KERR *et al.*, 2001b; MOURE; URBAN; MELO, 2007).

A relação com a flora torna as abelhas sem ferrão grandes ajudantes do meio ambiente, sendo utilizadas nas plantações cultiváveis e em estufas por meliponicultores, onde cooperam na melhora da produção polinizando os diversos vegetais com destaque para o: camu-camu (*Myrciaria dubia*), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), abacate (*Persea americana*), guaraná (*Paulinia cupana*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), pepino (*Cucumis sativus*) entre outros. (IMPERATRIZ-FONSECA; SARAIVA; JONG, 2006;).

Além dos benefícios à flora, os produtos fornecidos pelos meliponídeos como mel, pólen e geoprópolis são utilizados para consumo próprio ou como fonte de renda de muitas famílias (SEBRAE, 2006; ALVES *et al.*, 2007; MAGALHÃES; VENTURIERI, 2010; SILVA; PAZ, 2012).

3.2. Meliponário O lar das abelhas

O manejo das abelhas sem ferrão já data de muitos séculos, sua criação estava inclusa há muito tempo na cultura de povos indígenas da América Latina, algumas regiões da América Central e na América do Sul e que se estendeu até os dias atuais. No Brasil é pratica tradicional dos sertanejos na região do semi-árido e na Região Amazônica com desenvolvimento em áreas rurais, pequenas localidades urbanas e algumas comunidades indígenas localizadas próximas as extensões do rio, sendo assim uma forma de subsistência para as famílias que ali habitam (KERR *et al.*, 2001; CARVALHO-ZILSE, G.A.; KERR, 2006;).

Atualmente se emprega a criação das abelhas sem ferrão em locais denominados de meliponários, que são ambientes com espaços para comportar diversas caixas (colmeias), com distância variada entre elas e com recursos florísticos próximos, fornecendo assim alimento para que possam produzir, mel e a geoprópolis, além de, ajudar na manutenção dos ecossistemas que estão inseridos (CARVALHO-ZILSE; KERR, 2006).

A criação destas abelhas integrada ao Sistema Agroflorestal (SAF) pode contribuir substancialmente para o aumento da produção agrícola familiar e a geração de renda (MAGALHÃES; VENTURIERI, 2010; PEREIRA SILVA; LIMA; PAZ, 2012). Para os pequenos agricultores, esta forma de produção se torna muito atrativa por não exigir grandes espaços, nem muito trabalho, quando comparados aos da roça como o plantio, a pesca e a criação de gado. É uma atividade rentável a médio e longo prazo, devido produtos vendáveis mel, cera e o geoprópolis. A criação oferece baixo custo de manutenção e promove a polinização de espécies vegetais do ecossistema em que estão inseridas (VENTURIERI; RAIOL; PEREIRA, 2003; MAGALHÃES; VENTURIERI, 2010; VIANA; GÓES; SANTOS, 2012; VILLAS-BÔAS *et al.*, 2012).

No estado do Amazonas, a facilidade do manejo, a sociabilidade das abelhas sem ferrão e o alto valor terapêutico dos seus produtos com diversas propriedades medicinais tem justificado a criação (KERR, 1987; KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996; FREIRES; DE ALENCAR; ROSALEN, 2016;). Dentre as espécies de abelha sem ferrão que são criadas pelos meliponicutores, destacam-se a *Melipona seminigra* e *Melipona interrupta* (CARVALHO-ZILSE; NUNES-SILVA, 2012).

3.3. Espécies de Estudo Abelha *Melipona seminigra*

Dentre as mais variadas abelhas sem ferrão presentes no ecossistema Amazônico, destaca-se a *Melipona seminigra* *aff. merrillae*, Cockerell, 1919. Endêmica da região da Amazônia é amplamente criada no Estado do Amazonas (MOURE; URBAN; MELO, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

A sua distribuição vai do oeste dos rios Camanaú e Curiaú conhecido como Paricatuba (no baixo Purus), com presença na cidade de Manaus e ao norte na extensão do rio Negro, estando presente nas regiões de várzea e florestas de igapó. (DA SILVA, 2012;). Possui diversas denominações: Jandaíra alaranjada da Amazônia, Jandaíra e comumente conhecida por Uruçú-boca-de-renda (CASTRO *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2013;).

As colônias possuem um número de indivíduos em torno de 4.000 sendo pouco agressivas o que facilita o contato com humanos na criação (CARVALHO-ZILSE, G.A.; KERR, 2006; OLIVEIRA, F. F. *et al.*, 2013;). A espécie utiliza bolas de resina (2,5 cm de diâmetro) com o intuito de vedar a entrada do ninho contra predadores como as formigas, os forídeos (moscas) e a *Lestrimelitta limao* (abelha limão) (KERR *et al.*, 2001).

A *M. seminigra* apresenta uma coloração diferenciada (Figura 1-B), sua colônia possui uma entrada, figurando-se como uma “trombeta de renda” (Figura 1-A), revelando detalhes da arquitetura que lembram uma renda em formato de círculo, daí a denominação popular, “uruçú-boca-de-renda” (KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1967; OLIVEIRA *et al.*, 2013;).

No Amazonas a espécie também se destaca por seu potencial melífero produzindo boa quantidade de mel e por ser extremamente adaptável a diferentes regiões do estado além de auxiliar na dispersão das sementes das espécies de plantas, como por exemplo *Zygia racemosa* (angelim rajado). (BACELAR-LIMA *et al.*, 2006).

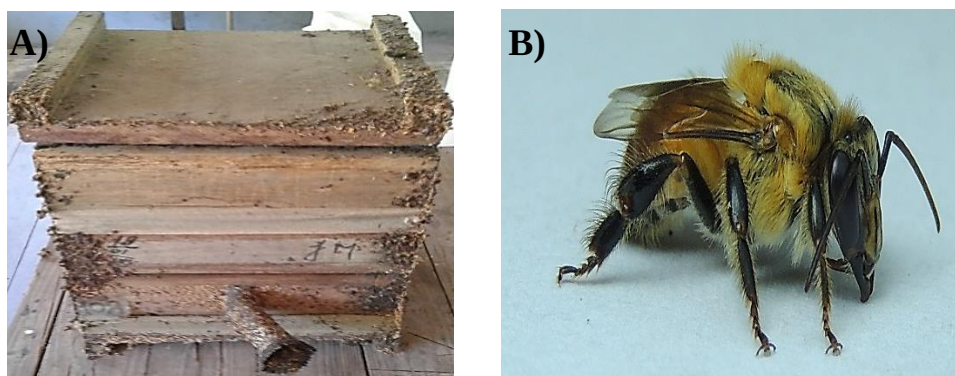


Figura 1 – *M. seminigra*: A) Entrada: formato de Trombeta; B) Coloração castanho-avermelhado.
Fonte Rebello, L.S.S., 2016.

3.4. Espécies de Estudo Abelha *Melipona interrupta*

A segunda espécie é a *Melipona interrupta*, sinônimo *Melipona compressipes manaosensis*, denominada popularmente como: Jandaíra-Preta-da-Amazônia ou Jupará. Pode ser encontrada no Brasil, nos estados do Amazonas e Maranhão e fora dos limites da fronteira brasileira, Panamá e Guiana Inglesa (KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996; KERR *et al.*, 2001b; MOURE; URBAN; MELO, 2007;).

A colônia dessa espécie possui uma estimativa de indivíduos entre 3000 a 5000, tamanho médio próximo a 1,3 cm, são pouco agressivas e extremamente higiênicas quanto a limpeza dos resíduos da colmeia (KERR, 2002; COSTA PINTO, 2007; FRANCINI, 2008;).

A espécie possui uma característica bem específica na entrada da colônia, a particularidade se configura no geoprópolis endurecido e esbranquiçado (COSTA PINTO, 2007). Outro detalhe singular da espécie é a existência de um indivíduo que atua como vigilante responsável pelo primeiro alerta para a colônia a respeito da aproximação e invasores, (Figura 1-A) (KERR, 2002).

A *M. interrupta* apresenta coloração escura (Figura 2-B) e tem como principal característica ser uma excelente produtora de mel favorecendo sua criação em meliponários no Estado do Amazonas (MARQUES-SOUZA *et al.*, 2002; CARVALHO-ZILSE; NUNES-SILVA, 2012; BECKER, 2014;).

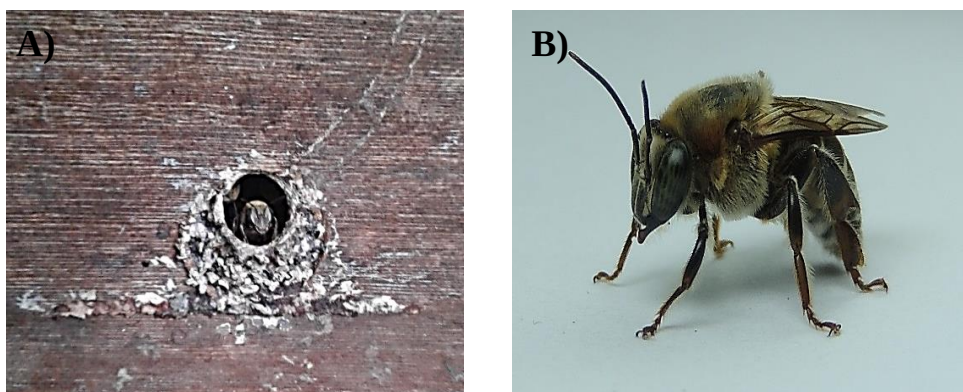


Figura 2 – *M. interrupta*: A) Entrada: geoprópolis esbranquiçado e um vigilante; B) Coloração escura.
Fonte Rebello, L.S.S., 2016.

3.5. Espécies florísticas visitadas pelas abelhas sem ferrão

As abelhas sem ferrão, são uma das formas de vida mais importantes para auxiliar na reprodução da maior parte das angiospermas, plantas que possuem suas sementes protegidas (OLIVEIRA; ABSY; MIRANDA, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2013;).

As espécies de abelhas *M. seminigra* e *M. interrupta* podem coletar uma extensa quantidade de pólen e resinas das mais variadas espécies vegetais. Tais informações foram comprovadas durante muitas décadas, por meio de estudos palinológicos (referentes aos pólen) e a sua constatação forneceu dados bibliográficos de que as espécies da tribo Meliponini coletam exemplares das mais diversas famílias, como: Anacardiaceae, Myrtaceae, Leguminosae, Euphorbiaceae, Clusiaceae entre outras (ABSY; KERR, 1977; ABSY; BEZERRA; KERR, 1980; SOUZA *et al.*, 2004; OLIVEIRA; ABSY; MIRANDA, 2009; OLIVEIRA, F. F. *et al.*, 2013).

Estudos realizados recentemente na região de Manaus voltados aos grãos de pólen, revelaram que entre os meses de seca, agosto a outubro de 2012, evidenciaram a presença de algumas espécies florísticas dentro dos ninhos de *M. seminigra* mais generalista (FERREIRA; ABSY, 2017) e outro estudo realizado nos meses de chuva, final outubro a junho, 2001 e 2010 (OLIVEIRA *et al.*, 2013; OLIVEIRA; ABSY; MIRANDA, 2009), segundo o quadro (1) adaptado abaixo:

Quadro 1 - Espécies botânicas presentes no ninho da *M. seminigra*. “continua”.

FAMÍLIA	TIPO DE PÓLEN	NOME POPULAR
AMARANTHACEAE	<i>Alternanthera</i>	perpétua-do-brasil
ANACARDIACEAE	<i>Anacardium occidentale</i>	caju
	<i>Spondias mombin</i>	cajá, taperebá
	<i>Tapirira guianensis</i>	pau pombo ou tapiriri
ASTERACEAE	<i>Mikania roraimensis</i>	guaco
	<i>Vernonia scabra</i>	assa-peixe
ARECACEAE	<i>Astrocaryum aculeatum</i>	tucum, tucumã açú
	<i>Euterpe oleracea</i>	açaizeiro, palmeira-sagu;
	<i>Mauritia flexuosa</i>	buriti
ARALIACEAE	<i>Didymopanax morototoni</i>	morototó
ARECACEAE	<i>Attalea maripa</i>	inajá
APOCYNACEAE	<i>Rauwolfia grandiflora</i>	muirápinga
BIXACEAE	<i>Bixa orellana</i>	urucum
BURSERACEAE	<i>Protium heptaphyllum</i>	breu ou almecegueira
BORAGINACEAE	<i>Cordia sellowiana</i>	louro mole
CAESALPINIACEAE	<i>Cassia sp.</i>	-
CARICACEAE	<i>Carica papaya</i>	mamão, mamão-papaia

Quadro 1 - Espécies botânicas presentes no ninho da *M. seminigra*. “continuação”.

CECROPIACEAE	<i>Coussapoa asperifolia</i> <i>magnifolia</i>	apuí, apuí-folha-grande
CYPERACEAE	<i>Scleria</i>	trigo-guarani
CLUSIACEAE	<i>Vismia guianensis</i>	lacre
DILLENACEAE	<i>Dillenia</i>	maçã-de-elefante
EUPHORBIACEA	<i>Alchornea</i>	pau-óleo
	<i>Amanoa</i>	louro-babão
	<i>Croton lanjouwensis</i>	dima
FABACEAE/ CAESALPINOIDEAE	<i>Cassia alata</i>	fedegoso gigante
	<i>Cassia minosoides</i>	chuva-de-ouro
	<i>Cynometra bauhiniifolia</i>	jutairana-preta
	<i>Hymenaea</i>	jatobá
	<i>Diploptropis purpurea</i>	sucupira preta
	<i>Dipteryx odorata</i>	camaru, camaru-ferro
	<i>Swartzia</i>	arruda vermelha
FABACEAE/ MIMOSOIDEAE	<i>Aeschynomene sensitiva</i>	cortiça
	<i>Enterolobium</i>	tamboril, araribá
	<i>Inga edulis</i>	ingá-da-pria
	<i>Mimosa invisa</i>	malícia de mulher
	<i>Mimosa pigra</i>	calumbi d'água, giquiri
	<i>Mimosa pudica</i>	dormideira
	<i>Senna reticulata</i>	matapasto
	<i>Senna siamea</i>	cássia amarela
	<i>Zygia racemosa</i>	angelim-rajado
FLACOURTIACEAE	<i>Casearia arborea</i>	caseária
HYPERICACEAE	<i>Vismia guianensis</i>	lacre-branco, pau-de-lacre
	<i>Vismia japurensis</i>	capianga; lacre-vermelho
ICACINACEAE	<i>Poraqueiba guianensis</i>	umari-amarelo
LAMIACEAE	<i>Hyptis brevipes</i>	hortelã do mato
LECYTHIDACEAE	<i>Eschweilera fructa</i>	matá-matá
LORANTHACEAE	<i>Phthirusa micrantha</i>	pau pólvora, periquiteiro
MALPIGHIACEAE	<i>Byrsonima</i>	murici arbóreo ou da praia
MELASTOMATACEAE	<i>Mirconia</i>	quaresmeira-de-flor-branca
	<i>Bellucia imperialis</i>	goiaba de anta
	<i>Bellucia grossularioides</i>	araçá de anta
MELIACEAE	<i>Cedrela</i>	credo-vermelho
MORACEAE	<i>Cecropia</i>	embaúba
MYRTACEAE	<i>Eugenia stipitata</i>	araçá-bói
	<i>Eugenia sp.</i>	-
	<i>Myrcia sp.</i>	-
	<i>Syzygium jambolana</i>	jamelão, azeitona
POLYGONACEAE	<i>Triplaris</i>	formigueiro
	<i>Symmeria</i>	tanará, cariperana
PORTACEAE	<i>Antigonon leptopus</i>	amor-agarradinho
RUBIACEAE	<i>Borreria capitata</i>	agriãozinho-tapete
	<i>Borreria latifolia</i>	cordão-de-frade-branco
RUTACEAE	<i>Citrus sp.</i>	-

Quadro 1 - Espécies botânicas presentes no ninho da *M. seminigra*. “conclusão”.

SAPINDACEAE	<i>Talisia macrophylla</i>	pitomba-do-mato
SOLANACEAE	<i>Solanum</i>	batata, tomate, beringela
VERBENACEAE	<i>Stachytarpheta cayennensis</i>	gervão urticante
URTICACEAE	<i>Cecropia</i>	embaúba-vermelha
ULMACEAE	<i>Trema micrantha</i>	grandiúva

Fonte – Rebello, L.S.S., 2017; Adaptado de Ferreira & Absy, 2013 (p. 211).

A abelha *M. interrupta* mais restritiva, porém não se configura como uma regra durante as visitas florísticas. Segundo estudo realizado por Ferreira & Absy, 2013 nos meses de seca outubro e novembro de 2010 no município de Manacapuru - AM, foi possível a identificação de diferentes tipos de pólen presentes na colmeia de várias famílias botânicas (Quadro 2).

Quadro 2 - Espécies botânicas presentes no ninho da *M. interrupta*.

FAMÍLIA	ESPÉCIE BOTÂNICA	NOME POPULAR
AQUIFOLIACEAE	<i>Ilex</i>	congonha, erva-mate, caúna,
ARECACEAE	<i>Elaeis</i>	-
ASTERACEAE	<i>Mikania</i>	cipó-caatinga, cipó-sucuriçu,
BIGNONIACEAE	<i>Tecoma</i>	ipê-de-jardim, amarelinho
BORAGINACEAE	<i>Cordia</i>	louro-babão, grão-de-galo
BIXACEAE	<i>Bixa orellana</i>	urucum
BURSERACEAE	<i>Protium</i>	breu
CAESALPINIOIDEAE	<i>Cenostigma tocatinum</i>	pau-preto, cássia rodoviária
	<i>Schizolobium amazonicum</i>	canafista e fava-canafistula
EUPHORBIACEAE	<i>Alchornea</i>	auerana, supiarana,
	<i>Aparisthmium cordatum</i>	pau-de-facho
FABACEAE/ FACOIDEAE	<i>Inga</i>	ingá de metro
	<i>Displotropis purpurea</i>	sucupira-da-terra-firme
HYPERICACEAE	<i>Vismia</i>	lacre-branco, pau-de-lacre
FABACEAE	<i>Mimosa invisa</i>	malícia de mulher ou sensitiva
	<i>Mimosa guilandinae</i>	-
	<i>Mimosa asperata</i>	-
	<i>Mimosa spruceana</i>	-
	<i>Piptadenia</i>	angico jacaré, pau jacaré
	<i>Stryphnodendron guianense</i>	baginha
MALVACEAE	<i>Bombax munguba</i>	cacau selvagem
PASSIFLORACEAE	<i>Passiflora</i>	maracujá, flor-da-paixão
POLYGONACEAE	<i>Triplaris surinamensis</i>	pau-formiga-branco
SAPOTACEAE	<i>Pouteria caimito</i>	abieiro, abiu

Fonte – Rebello, L.S.S., 2017; Adaptado de Oliveira *et al.*, 2009 e 2013, (p.508-510); Ferreira e Absy, 2017, (p.6-7).

As floradas para as abelhas além de ser uma fonte de alimento, auxiliar na composição química e estrutural da geoprópolis (FERREIRA; ABSY, 2013). A formação confere ao produto grande potencial farmacêutico. À medida que se amplia a escala de utilização, aumenta a necessidade de estudos que comprovem sua origem botânica, composição química, atividades biológicas (DA SILVA, 2012; DA SILVA *et al.*, 2013).

3.6. Geoprópolis e a sua Constituição Química

A própolis é uma mistura de saliva, resina de plantas, pólen, estruturas vegetais e restos de cascas de árvores, e quando adicionado solo e/ou argila pelas abelhas sem ferrão adquire uma formação endurecida denominada de geoprópolis. (KERR; NOGUEIRA-NETO, 1997; CARVALHO-ZILSE; NUNES-SILVA, 2012; DA CUNHA *et al.*, 2013;).

As abelhas sem ferrão utilizam a geoprópolis para evitar a entrada de invasores (aranhas, moscas, formigas), para aquecimento, delimitação dos ninhos, mumificação de invasores, redução de bactérias e fungos no ambiente interno da caixa (NOGUEIRA-NETO, 1970; MARCUCCI, 1995; CÁMARA *et al.*, 2004; CARVALHO-ZILSE *et al.*, 2007;).

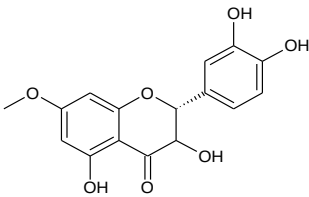
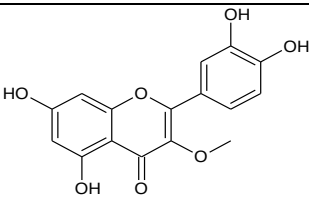
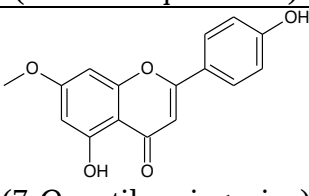
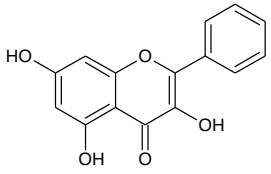
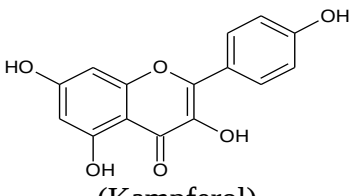
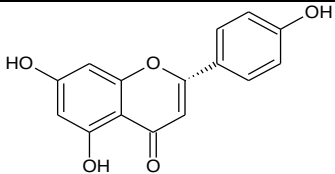
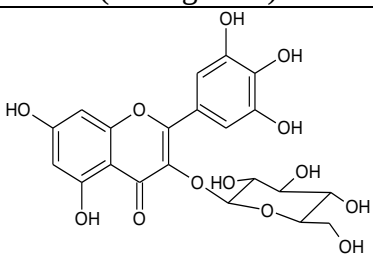
De modo geral, a própolis in natura presente na geoprópolis é composta de óleos essenciais voláteis 5 a 10%, 5% de pólen, 30% de cera e 50% de resina e restos de vegetais formando um material com arranjo extremamente complexo, com odor e sabor aromático característico e coloração específica: verde, vermelha ou marrom, além de ser rica em diversos princípios ativos (WOISKY, R.G., SALATINO, 1998;).

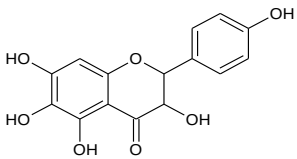
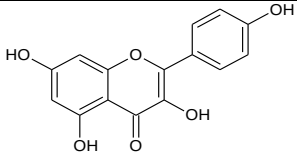
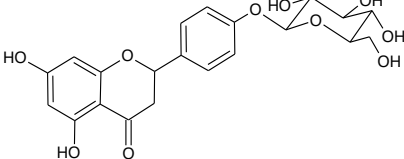
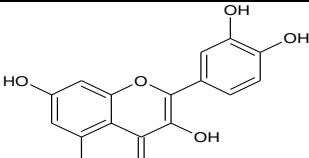
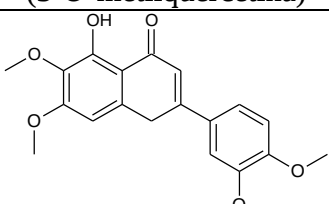
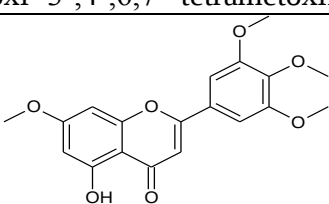
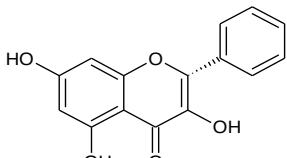
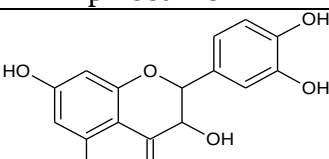
Quimicamente na sua formação podem estar presentes mais de 300 constituintes químicos diferentes (MARCUCI, 1995; BURDOCK, 1998; GRAIKOU *et al.*, 2016;), como os ácidos fenólicos e derivados, dilactonas, fenólicos, ésteres, aldeídos, benzofenonas, benzopiranos, terpenos e açúcares (LUSTOSA *et al.*, 2008; OZKUL; CAMPOS *et al.*, 2014; FREIRES; DE ALENCAR; ROSALEN, 2016;). A diversificação pode variar de região para região (BANKOVA, 2005), período de coleta e fator sazonalidade influenciando diretamente na composição da geoprópolis (KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004; SANCHES; PEREIRA; SERRÃO, 2017a).

O estudo realizado com o geoprópolis de *M. quadrifasciata anthidiodes*, *M. compressipes* e a *Tetragona clavipes*, mostraram o quanto o produto é rico em compostos de diferentes classes como os ácidos graxos, substâncias aromáticas, triterpenos e flavonoides (BANKOVA *et al.*, 1998).

A literatura mostra que diferentes tipos de flavonoides já foram isolados e identificados em extratos de geoprópolis com o uso das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Espectrometria de Massas (EM), Cromatografia Líquida hifenada ao espectrômetro de massas (UPLC-MS) dentro do gênero *Melipona* como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Flavonoides encontrados em extrato de geoprópolis do gênero *Melipona*.

Espécie	Substância	Referências
<i>M. subnitida</i>	 (7-O-Metoxi-aromadendrina)	(Souza <i>et al.</i> , 2013).
	 (3-Metoxi-quercetina)	
	 (7-O-metil-naringenina)	
<i>M. quadrifasciata</i>	 (Galangina)	(Cardozo <i>et al.</i> , 2015).
<i>M. marginata</i>	 (Kampferol)	
<i>M. seminigra</i> <i>M. interrupta</i>	 (Naringenina)	(Da Silva <i>et al.</i> , 2013; Da Silva, 2012).
<i>M. interrupta</i>	 (Miricetina-3-O-β-Glicopiranosídeo)	(Da Silva <i>et al.</i> , 2013).

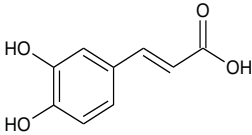
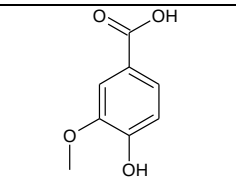
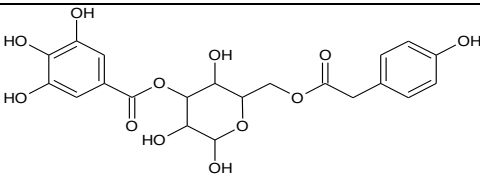
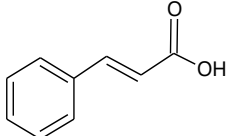
	 (Derivado da Aromadendrina)	
<i>M. quadrifasciata</i>	 (Apigenina)	(Bonamigo <i>et al.</i> , 2017)
<i>M. interrupta</i>	 (Naringenina-4'-O-β-Glicopiranosídeo)	(Da Silva <i>et al.</i> , 2013)
<i>M. subnitida</i>	 (3-O-metilquercetina)	De Souza, 2016
<i>M. (Melikerria) compressipes</i>	 (5-hidroxi- 3',4',6,7 –tetrametoxiflavona)	(Tomás-Barberán <i>et al.</i> , 1993).
	 (5-hidroxi-3',4', 7- tetrametilflavona)	
<i>M. compressipes</i> <i>M. quadrifasciata</i> <i>anthidiodes</i>	 pinobanksin	(Bankova <i>et al.</i> , 1998).
<i>M. seminigra</i>	 taxifolina	(Da Silva, 2013).

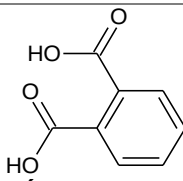
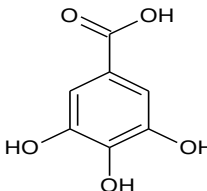
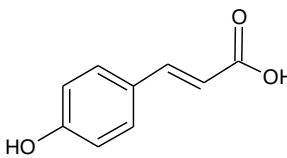
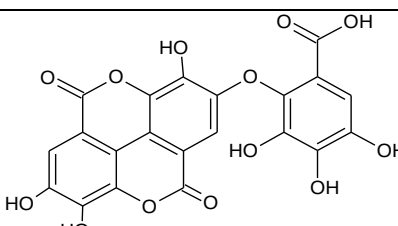
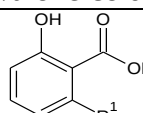
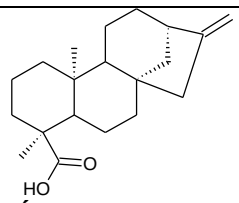
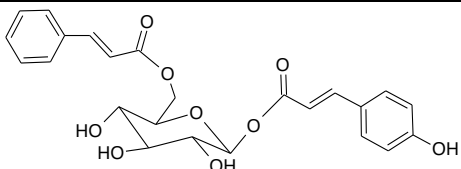
Outros sete flavonoides, 7-*O*-metil-naringenina, 7-*O*-metilaromadendrina, 7,4'-di-*O*-metilaromadendrina, 3-*O*-metilquercetina, 4'-*O*-metilkaempferol, 5-*O*-metilaromadendrina e 5-*O*-metilkaempferol, além das substâncias da classe dos fenilpropanoides 6-*O*-*p*-coumaroil-*D*-galactopirranose e 6-*O*-cinamoil-1-*O*-*p*-cumaroil-*p*-*D*-glucopirano foram identificados nos extratos etanólicos de geoprópolis da espécie de *M. subnitida* Ducke do município de Vieirópolis - PA (DE SOUZA *et al.*, 2013;).

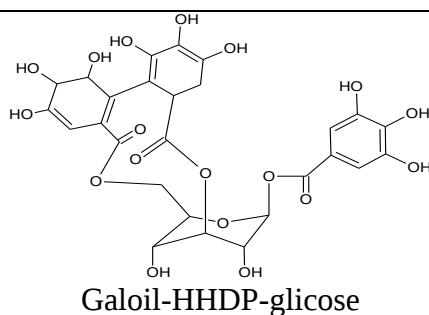
O estudo relacionado a matriz extrato hidroalcóolico geoprópolis da espécie *M. orbignyi* constatou por análise em CLAE a presença dos flavonoides aromadendrina, metil aromadendrina, naringenina e metil naringenina (DOS SANTOS *et al.*, 2017).

Outra classe de substâncias identificadas em extratos polares de geoprópolis de *Meliponas* são os ácidos fenólicos conforme a tabela (2) na sequência:

Tabela 2 - Ácidos fenólicos encontrados em extrato de geoprópolis do gênero *Melipona*.

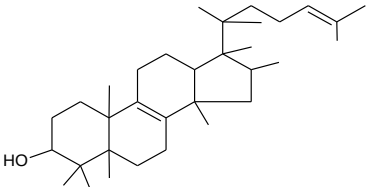
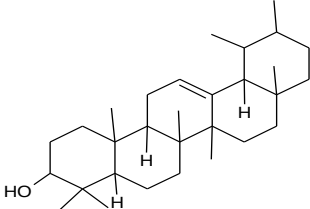
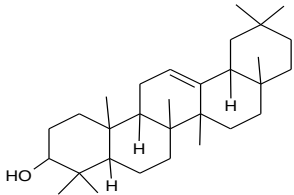
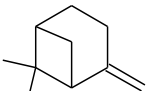
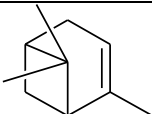
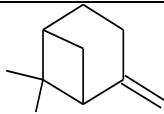
Espécie	Substância	Referências
<i>M. quadrifasciata</i> <i>M. margiata</i> <i>M. scutellaris</i> <i>M. fasciculata</i> <i>M. flavoneita</i>	 Ácido caféico	(Velikova <i>et al.</i> , 2000a, 2000b; Sawaya, 2006; Bastos <i>et al.</i> , 2007; Cardozo <i>et al.</i> , 2015; Oliveira <i>et al.</i> , 2012;)
<i>M. quadrifasciata</i> <i>M. fasciculata</i> <i>M. flavoneita</i>	 Ácido vanílico	(Velikova <i>et al.</i> , 2000a, 2000b; Oliveira <i>et al.</i> , 2012; Cardozo <i>et al.</i> , 2015;)
<i>M. subnitida</i>	 Digaloil - glicose	(De Souza, 2016)
<i>M. quadrisfasciata</i> <i>anthidioides</i>	 Ácido cinâmico	(Velikova <i>et al.</i> , 2000b; Campos <i>et al.</i> , 2014; Cardozo <i>et al.</i> , 2015;).

<i>M. scutellaris</i>	 Ácido ftálico	(Da Cunha, 2012; Da Cunha <i>et al.</i> , 2013;).
<i>M. subnitida</i> <i>M. fasciculata</i> Smith <i>M. flavoneita</i>	 Ácido gálico	(Batista <i>et al.</i> , 2016; Cunha <i>et al.</i> , 2009; Dutra, 2012; Dutra <i>et al.</i> , 2014; Oliveira <i>et al.</i> , 2012;)
<i>M. seminigra</i> <i>M. marginata</i>	 Ácido p-cumárico	(Velikova <i>et al.</i> , 2000b; Oliveira <i>et al.</i> , 2012; Silva <i>et al.</i> , 2013; Cardozo <i>et al.</i> , 2015;)
<i>M. fasciculata</i> Smith	 Ácido valoneico dilactona	(Liberio <i>et al.</i> , 2011; Dutra, 2012; Dutra <i>et al.</i> , 2014;).
	 Ácido anacárdico	(Dutra <i>et al.</i> , 2014; Araujo <i>et al.</i> , 2015;)
<i>M. quadrifasciata</i> <i>anthidioides</i>	 Ácido caurenóico	(Velikova <i>et al.</i> , 2000b)
<i>M. subnitida</i> Ducke	 1-O-coumaroil-6-O-cinamoil-b-D-glicopiranosideo	Dutra, <i>et al.</i> 2014.



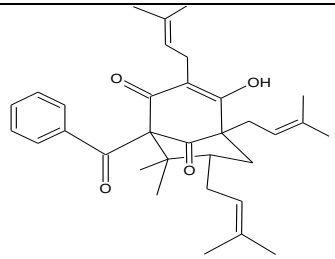
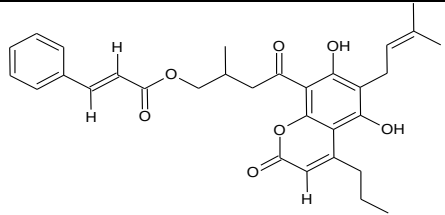
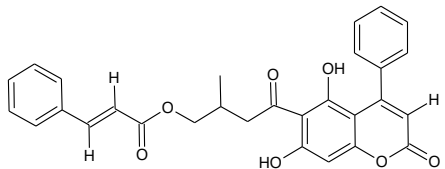
Outra classe de metabólitos encontradas nos extratos de geoprópolis das abelhas sem ferrão foram identificados por CG/EM e por CLAE/EM são os triterpenos e sequiterpenos, dentre eles alguns já conhecidos como: α -amirina, β -amirina e o lanosterol. Outros já foram descritos em estudos anteriores e estão apresentados na tabela (3):

Tabela 3 - Triterpenos encontrados em extratos de geoprópolis de *Melipona*.

Espécie	Substância	Referências
<i>M. fasciculata</i> ; <i>M. scutellaris</i> ; <i>M. rufiventris</i> ;	 Lanosterol	(Pianaro, 2007; Batista <i>et al.</i> , 2016;)
<i>M. seminigra</i> ; <i>M. interrupta</i> ; <i>M. fasciculata</i> ; <i>M. scutellaris</i> ; <i>M. rufiventris</i> ;	 α -amirina	(Abreu <i>et al.</i> , 2006; Pianaro, 2007; Silva <i>et al.</i> , 2013; Batista <i>et al.</i> , 2016;).
<i>M. seminigra</i> ; <i>M. interrupta</i> ; <i>M. fasciculata</i> ; <i>M. scutellaris</i> ; <i>M. rufiventris</i> ;	 β -amirina	(Pianaro, 2007; Dutra <i>et al.</i> , 2008; Silva <i>et al.</i> , 2013; Batista <i>et al.</i> , 2016;).
<i>M. falvolineata</i> Friese; <i>M. quadrifasciata</i>	 espatulenol	(Oliveira <i>et al.</i> , 2013b; Ferreira <i>et al.</i> , 2016;)
<i>M. beecheii</i> ;	 α - pineno	(Pino <i>et al.</i> , 2006; Torres-González <i>et al.</i> , 2015).
	 β - pineno	

Nos extratos etanólicos de *M. orbigny* foi sugerida a presença de substâncias terpênicas, açúcares, álcoois e alguns fenólicos com propriedades biológicas (CAMPOS et. al., 2014). Estudos realizados com extratos etanólicos de *M. scutellaris* foi possível isolar e identificar cinco substâncias dentre elas a substância ent-nemorosone (benzofenona), além de uma nova substância da classe das cumarinas (DA CUNHA et. al., 2016).

Tabela 4 - Cumarinas e benzofenos encontrada no extrato de geoprópolis de *Melipona*.

Espécie	Substância	Referências
	 ent-nemorosone	
<i>M. scutellaris</i> ;	 5,7-di-hidroxi-6-(3-metil-2-butenil)-8-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)-4-propil-cumarina	(Da Cunha et al., 2016)
	 5,7-dihidroxi-6-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)-4-fenilcumarina	

3.7. Propriedades biológicas da geoprópolis enaltecidas pela química

A comunidade científica tem relatado que a diversidade de substâncias químicas presentes na geoprópolis favorece o aparecimento de inúmeras propriedades com potenciais farmacológicos e medicinais que atuam contra doenças cardiovasculares, respiratórias, dermatoses, problemas de fertilidade feminina, visuais, alergênicas, imunomoduladoras, infecciosas e participação no tratamento de úlceras o que têm sido extremamente interessantes (PEREIRA; SEIXAS; NETO, 2002; FREITAS et al., 2008; LIBERIO et al., 2011; FRANCHIN, 2012, 2013; ARAUJO et al., 2015;).

A realização de testes biológicos e químicos com extratos da geoprópolis de *Melipona* indicam atividades biológicas como, atividade antibacteriana, antimicrobiana, anticancerígena,

antisséptica, analgésica, antitumoral, fungicida, anestésica, reparadora tissular, cicatrizante, antifúngica, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória e antiproliferativa (SILVA *et al.*, 2006, 2013; FREITAS *et al.*, 2008; DA SILVA, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2017;).

Tabela 5 – Atividades biológicas em extratos de geoprópolis e de produtos de abelhas do gênero *Melipona*.

Espécie	Atividade Biológica	Referências
<i>M. marginata</i> <i>M. orbignyi</i>	Citotóxico;	(Campos <i>et al.</i> , 2014; Velikova <i>et al.</i> , 2000a,b)
<i>M. subnitida</i>	Fitotóxico	(Pereira <i>et al.</i> , 2017)
<i>M. orbignyi</i>	Antimutagênico	(Dos Santos <i>et al.</i> , 2017a)
<i>M. compressipes</i> <i>M. fasciculata</i> Smith <i>M. favosa</i> <i>M. mandaçaia</i> <i>M. orbignyi</i> <i>M. quadrifasciata anthidoides</i> <i>M. scutellaris</i> <i>M. seminigra</i>	Antimicrobiano;	(Velikova <i>et al.</i> , 2000a,b; Fernandes Jr <i>et al.</i> , 2001; Duailibe; Gonçalves; Ahid, 2007; Da Cunha <i>et al.</i> , 2013; Campos <i>et al.</i> , 2017 Dos Santos <i>et al.</i> , 2017a; Faria <i>et al.</i> , 2017; Da Silva <i>et al.</i> , 2013;)
<i>M. scutellaris</i>	Antiploriferativa;	(Da Cunha <i>et al.</i> , 2013)
<i>M. fasciculata</i> Smith	Anticâncer;	(Bartolomeu <i>et al.</i> , 2016)
<i>M. compressipes</i> <i>M. orbignyi</i> <i>M. subnitida</i>	Antibacteriano;	(Campos <i>et al.</i> , 2014; De Sousa <i>et al.</i> , 2015; Duailibe; Gonçalves; Ahid, 2007)
<i>M. scutellaris</i> <i>M. orbignyi</i>	Antiinflamatório;	(Da Cunha <i>et al.</i> , 2013, 2016; Dos Santos <i>et al.</i> , 2017a; Franchin <i>et al.</i> , 2012, 2013)
<i>M. fasciculata</i> Smith <i>M. flavolineata</i> <i>M. interrupta</i> <i>M. mondury</i> <i>M. orbignyi</i> <i>M. quadrifasciata anthidoides</i> <i>M. rufiventris</i>	Antioxidante;	(Bonamigo <i>et al.</i> , 2017; Campos <i>et al.</i> , 2014; Da Silva <i>et al.</i> , 2013; De Souza <i>et al.</i> , 2013; Dos Santos <i>et al.</i> , 2017a; Dutra <i>et al.</i> , 2014; Márquez Hernández <i>et al.</i> , 2010;

<i>M. seminigra</i>	Oliveira <i>et al.</i> , 2012;
<i>M. subnitida</i>	Silva <i>et al.</i> , 2009)

A presença de diversas substâncias químicas na geoprópolis como os ácidos aromáticos, ésteres, fenólicos, açúcares, álcoois, aldeídos, ácidos graxos, terpenos, aminoácidos, algumas proteínas, esteroides, cumarinas, cetonas, flavonoides, vitaminas e diversos minerais, faz com que o produto apresente um alto valor medicinal explorado de forma farmacológica (MARCUCCI, 1995; MENEZES, 2005; DA SILVA *et al.*, 2006; BANKOVA, 2009;).

As substâncias que mais vem se destacando são os flavonoides. A ingestão de produtos que contem esta classe auxilia na absorção de vitaminas: B1, B2, B6, C, E dentre outras, além de favorecer surgimento de atividade antimicrobiana e antioxidante. A maioria das propriedades farmacológicas referente a assimilação das fontes nutricionais e vitamínicas da própolis é atribuída à presença dos flavonoides (WILLIAM; SPENCER; RICE-EVANS, 2004; MENEZES, 2005; LUSTOSA *et al.*, 2008;).

Estes metabólitos secundários, também possuem a capacidade de induzir a apoptose, morte celular programada ajudando no controle de células tumorais (CHEN; WU; LIN, 2004). As substâncias quercetina, tangeritina e soforanona se destacam por sua ação antitumoral, outras como a acacetina e galangina podem inibir a atividade da síntese das prostaglandinas (ciclo-oxigenase (COX)). (KUJUMGIEV *et al.*, 1999; VELIKOVA *et al.*, 2000b; BORRELLI *et al.*, 2002;).

Os flavonoides também atuam minimizando a peroxidação lipídica e o efeito dos radicais livres das células evitando a alteração sensorial indesejável de óleos, gorduras e alimentos. As catequinas ajudam no controle e redução do nível de triglicerídeos e no efeito de coagulação sanguínea agindo como anticoagulantes (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2012; DOS SANTOS; RODRIGUES, 2017;).

Os ácidos fenólicos e derivados (artpelina C, bacarina, ácido p-cumárico, ácido cinâmico, cafeoilquínicos) também apresentam tais propriedades e é a classe que possui maior efeito antioxidante nos estudos biológicos (OLIVEIRA *et al.*, 2012; SILVA, 2013; SILVA *et al.*, 2013;). Tanto esta classe, como a dos flavonoides em geral, possui vários grupos reacionais (hidroxilas, carbonilas e metoxilas) o que favorece a doação de átomos de hidrogênio aumentando a sua propriedade antioxidante (PIETTA, 2000; BARREIROS; DAVID, 2006; DA SILVA *et al.*, 2013;). Além disso, apresentam atividades antibacterianas e antifúngicas, que são

provenientes da existência dos *p*-cumarínicos e prenilados (MARCUCCI, 1995; BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000; BANKOVA, 2005; LIMA, 2015;).

O éster fenetílico do ácido cafeíco mostrou atividade de anti proliferação (contenção) do Hep3B (hepatocarcionoma), inibindo e sendo uma alternativa de controle contra as células cancerígenas de camundongos (JIN *et al.*, 2005).

No campo da atividade antiviral, estudos relatam que alguns constituintes presentes na própolis e em seus extratos apresentaram atividade em relação a alguns patógenos do homem com características virais (VYNOGRAD; VYNOGRAD; SOSNOWSKI, 2000; PETER *et al.*, 2017;) como, o herpes vírus humano tipo 1 (HSV1) e 2 (HSV2) (COELHO *et al.*, 2015; HULEIHEL; ISANU, 2002), além do vírus que causa a imunodeficiência humana (HIV) (GEKKER *et al.*, 2005). Mas também, revelaram atividades inibidoras contra o vírus influenza aviária, herpesvírus bovino (BoHV-1) e diarreia viral bovino (BVDV) (KUJUMGIEV *et al.*, 1999; PETER *et al.*, 2017).

Os terpenos também auxiliam como inibidores antitumorais, como exemplo o diterpeno (PMS-1) apresentou atividade inibitória no crescimento de diversas células humanas tumorais (JIN *et al.*, 2005; CAMPOS, 2016;).

Os constituintes químicos enaltecem propriedades biológicas extremamente importantes, os estudos são promissores para os campos medicinais e terapêuticos, como medicamentos. Para que este produto atinja status possíveis de comercialização, como evidenciado pelo Ministério da Agricultura através da Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), é necessário a realização de mais estudos para aumentar o conhecimento a respeito do perfil químico da matriz geoprópolis através de técnicas (RMN, EM, LC-MS e CG/ EM) e assim comprovar a eficácia de algumas de suas atividades associando de forma mais precisa às propriedades biológicas as suas substâncias químicas presentes.

3.8. Estudo de metabolômica por EM e RMN aplicadas a Quimiométrico

As técnicas espectrométricas têm sido aplicadas com muito sucesso em diversas áreas da ciência com o intuito de atribuir informações mais precisas e completas a respeito do objeto de estudo. No âmbito químico, é possível explorar não só as características do material como (variação de massa, nível de concentração e polaridade das substâncias) mas também, determinar possíveis informações estruturais e indo um pouco mais além, estabelecer uma relação direta ou não com diversas propriedades biológicas que o produto possa vir a descrever.

(BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998; BELTON *et al.*, 1998; MARASCHIN *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2014;).

A atribuição dessas informações no campo metabolômica se deve muito a utilização de técnicas analíticas muito poderosas que permitem explorar ao máximo propriedades químicas (MARASCHIN *et al.*, 2012). As principais e mais utilizadas são as técnicas analíticas de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas (EM) (MARASCHIN *et al.*, 2012; FERREIRA, 2015;).

3.8.1. Espectrometria de Massas (EM)

A técnica de espectrometria de massas (EM) é uma técnica analítica que permite a separação dos íons mais interessantes da matriz dispostos segundo a relação *massa/carga* (m/z) e sua intensidade relativa (%). Apresenta como característica a velocidade de análise, alta sensibilidade, consumo baixo de solvente, favorecendo extratos com baixos rendimentos, porém, é destrutiva (MARTINS *et al.*, 2016). A tecnologia fornece dados que podem ser gerados por meio de diferentes métodos de ionização. O principal, é o método *ESI – ionização por eletrospray*, variando o modo entre *positivo* e *negativo* (VILLAS-BÔAS *et al.* 2005; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; PAVIA *et al.*, 2010;).

A ionização pelo modo *eletrospray* (ESI) é uma forma de ionização mais branda pois gera produtos (íons) e dependendo dos modos utilizados podem gerar íons catiônicos para o modo *positivo* e íons aniônicos para o *negativo*. O modo gera íons com uma baixa quantidade energética limitando a visualização de possíveis fragmentações para uma análise mais profunda, porém é uma excelente técnica para a realização exploratória de substâncias químicas já isoladas (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

A caracterização de matrizes químicas complexas pelo modo *ESI* auxilia na obtenção resultados de forma eficiente e rápida. A análise por *eletrospray* permite explorar substâncias das mais variadas massas moleculares, dentre elas, as que possuem características polares, de fácil ionização/fragmentação, já que podem ocorrer quebras dentro da fonte. A técnica também possibilita a análise geral do perfil químico por injeção direta, gerando assim, espectros que podem ser comparados e classificados para a obtenção de uma resposta química ou quimiométrica (SAWAYA *et al.*, 2004; SAWAYA; CUNHA, 2007; DETTMER; ARONOV; HAMMOCK, 2007;).

A técnica sozinha (EM) ou mesmo hifenada a outros equipamentos (HPLC, PS-EM, CG-EM, HS-SPME, SPME etc.) auxilia na caracterização, isolamento e comprovação de

substâncias químicas, além de aumentar as possibilidades investigativas de determinado objeto de estudo. (WILSON, 2003; MARASCHIN *et al.*, 2012;).

A técnica tem destaque para a pesquisa de padrão de qualidade de fitoproduto da planta Ajuru (*Chrysobalanus icaco* Linnaeus) (PARACAMPO, 2017), identificação de cervejas falsificadas (PEREIRA, 2016), caracterização de azeite de oliva (ALVES, 2010), análise de própolis de abelhas com e sem ferrão (SAWAYA, 2006; SAWAYA *et al.*, 2007;), caracterização de charuto (PRATA; EMÍDIO; DÓREA, 2011), análise de macroalgas e cogumelos (DE PINHO *et al.*, 2009) e análise de fumaça gerada por tecidos subcutâneos (KALIL *et al.*, 2016), entre outros.

Tais informações podem ser melhor exploradas de forma estatística por meio de ferramentas quimiométricas, a fim de possibilitar o estabelecimento de correlações entre as matrizes de estudo e suas informações químicas e biológicas (MARASCHIN *et al.*, 2012; FERREIRA, 2015;).

3.8.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A técnica de RMN é uma ferramenta extremamente poderosa que possui a capacidade de fornecer a medida mais completa possível dos constituintes químicos de uma determinada amostra (GAD *et al.*, 2012). Nos últimos anos tem sido muito utilizada pela sua eficiência na análise metabolômica de plantas (IOSET *et al.*, 2011), diferenciação de méis quanto a química e origem botânica (BOFFO *et al.*, 2012), discriminação dos tipos de sucos de maçãs (BELTON *et al.*, 1998), adulteração em óleos de camellia (SHI *et al.*, 2018), análises de processos de composição de água de coco (SUCUPIRA *et al.*, 2017), distinção de tipos de óleos vegetais (POPESCU *et al.*, 2015), sementes de cacau (MARSEGLIA *et al.*, 2016), controle de queijos (CONSONNI; CAGLIANI, 2008), entendimento do comportamento da fermentação de diferentes tipos de leveduras na produção de vinhos (SON *et al.*, 2009), entre outros estudos.

O campo de aplicação é extenso, contribuindo para o desenvolvimento de estudos de caracterização e elucidação química. As informações dos *fingerprints* dos espectros de hidrogênios (^1H) e carbono (^{13}C) também podem ser explorados por ferramentas quimiométricas (PCA e HCA) (CONSONNI; CAGLIANI, 2010; GAD *et al.*, 2012; KOSMIDES *et al.*, 2013; MARASCHIN *et al.*, 2016).

A ferramenta tem como proposta principal revelar a composição metabolômica (estrutural) das substâncias químicas presentes no material. Análise estabelecida por meio dos momentos angulares e magnéticos de seus átomos como ^{13}C e ^1H , sendo o último o mais

empregado por possuir a vantagem da alta sensibilidade, resposta e menos tempo de análise (KRISHNAN; KRUGER; RATCLIFFE, 2005; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007). A medida é proveniente do momento de pós excitação dos núcleos que ao retornar ao estado de origem emite uma energia em relação a um tempo, podendo ser convertida em um sinal pela FT (Transformada de Fourier), o que gera os espectros referentes as amostras de RMN (CONSTATINO; DA SILVA, 2000; FERREIRA, 2015; DIEGUEZ *et al.*, 2017;).

A técnica apresenta outras vantagens de procedimento e obtenção de dados, destacando-se a visualização da composição química de forma abrangente do material detectando sinais de várias classes metabólômicas de forma simultânea, seja em misturas complexas ou quase pura. A técnica é de execução rápido, não causa danos para a amostra e permite ajustes de parâmetros internos do equipamento para que seja definida a melhor condição de análise, padronização (WARD; BAKER; BEALE, 2007; SOUSA; MAGALHÃES; FERREIRA, 2013;).

De forma mais ampla as duas técnicas RMN e EM permitem a obtenção de um número expressivo de dados químicos seja através de sinais espectrais (RMN) ou perfis de fragmentação (EM), além de uma quantidade expressiva de S/R encobertos, o que torna o processamento individual de uma quantidade significativa de amostras inviável e desgastante (FERREIRA, 2015). Contudo, para assessorar o estudo das informações químicas provenientes das técnicas o processamento destes dados se dá através da Quimiometria que segundo a *International Chemometrics Society* (ICS), pode ser definida como a ciência que transforma dados químicos em medidas numéricas para que possam ser processadas de forma mais simples (GEMPERLINE, 2006; GAD *et al.*, 2012;).

O processamento se dá por seus métodos de análise multivariados não supervisionados e supervisionados, permitindo estabelecer um parâmetro de distinção ou proximidade química entre as amostras de composição extremamente complexas, atribuindo padrões de organização estatística (GEMPERLINE, 2006; CORREIA; FERREIRA, 2007; 2015;).

Os métodos não supervisionados são definidos principalmente por não terem dados pré-estabelecidos que servem como padrão de análise e sequenciamento de estudo. A ausência dessa informação permite explorar o conjunto de amostras por métodos sem a preocupação de ter um conhecimento prévio acerca do material, assim as informações são alinhadas de forma natural para descobrir tendências de informações não conhecidas (CORREIA; FERREIRA, 2007; 2015). Assim, são utilizadas ferramentas de análise exploratória de dados PCA e HCA, que são muito úteis por estabelecerem padrões organizacionais, representados por informações gráficas do conjunto de dados, observando as amostras e as variáveis (CORREIA; FERREIRA, 2007).

Análise de Componentes Principais (PCA) permite separar e realizar a avaliação das informações mais pertinentes de um conjunto de amostras neste caso, o que interfere na composição da matriz como locais de coleta, espécies e assim, verificar o quão distintas elas são quimicamente (GAD *et al.*, 2012). O método estabelece correlações significativas dentre as muitas variáveis presentes no total de informações projetadas, minimizando-as em um conjunto menor sem que haja prejuízo dos dados originais (FERREIRA, 2015).

A compressão dos elementos de interesse em uma dimensão menor permite a realização de associações (combinações lineares) da matriz, tornando viável a geração de PCAs, estabelecendo relações de agrupamento das informações mais próximas como “semelhantes” e realizando a discriminação daquelas que estão distantes do padrão desejado para a análise, conhecidas como *outliers* (CORREIA; FERREIRA, 2007; FERREIRA, 2015).

As componentes principais (PCs) representam o conjunto de dados da matriz de forma mais sistemática, fornecem informações através de gráficos de *scores* (os rótulos, as relações entre as amostras) e de *loadings* (o peso, contribuição de cada variável no modelo) em eixos denominados como PC1, PC2 mais representativas e PC3, PC4 para as informações que não foram identificadas nas PCs mais significativas (GEMPERLINE, 2006; BOFFO, 2009;). A priorização estabelecida se deve por estas componentes não se relacionarem entre si, porém, quando associadas revelam complementariedade nos dados, a primeira procura explicar as maiores variâncias encontradas em relação a matriz e a segunda trabalha no eixo ortogonal em relação à PC1, descrevendo os elementos que não foram possíveis de identificação no primeiro (WOLD; ESBENSEN; GELADI, 1987; FERREIRA, 2015;).

Para a análise por Agrupamento Hierárquico (HCA), os resultados são agrupados através de um dendograma aglomerativo, que estabelece um nível hierárquico de similaridades e/ou diferenças entre os grupos, tendo as distâncias como parâmetro para estabelecer uma rede hierárquica, garantindo resultados mais homogêneos (nos grupos unitários) e mais heterogêneos (entre os mesmos) (FERREIRA, 2015).

O parâmetro da distância firma as semelhanças ou disparidades das amostras, quanto menor a separação entre os grupos, maior a similaridade das informações e quanto maior o distanciamento menor proximidade haverá (ALMEIDA *et al.*, 2007; GAD *et al.*, 2012;).

A associação das informações obtidas destas técnicas (EM e RMN) junto ao estudo da quimiometria possibilitou reduzir a complexidade dos dados da matriz química geoprópolis e ajudou na diferenciação das informações mais pertinentes das amostras de ambas as espécies de abelhas sem ferrão.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta das amostras

O material de estudo foi coletado com auxílio da equipe de técnicos do Meliponário – (GPA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). As amostras de geoprópolis das espécies *M. interrupta* e *M. seminigra* foram coletadas de 29 de agosto à 10 de setembro de 2016 durante o término da estação mais seca e em cinco diferentes localidades da região do Amazonas conforme a figura (3) abaixo:

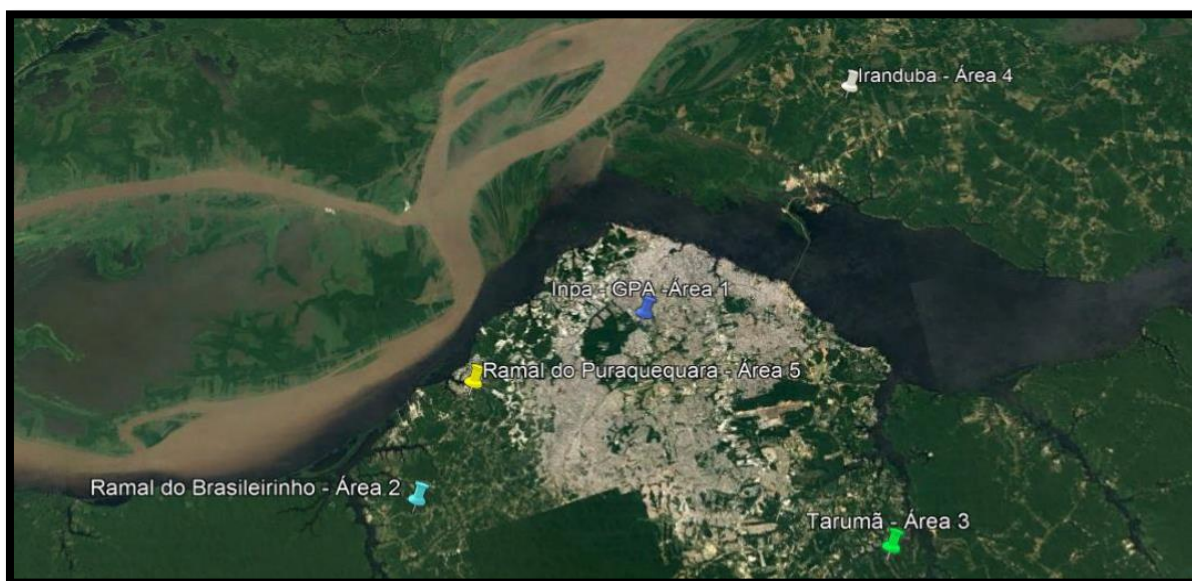


Figura 3 – Mapa Geral dos cinco pontos de coleta da geoprópolis na região do Amazonas.

Fonte: Google Earth, 2017.

A obtenção da geoprópolis ocorreu com a utilização de uma Chave Universal de 9-32 mm ajustável de Torque, com estocagem do material coletado em sacos plásticos herméticos (1L) com fecho duplo, devidamente identificados e levados ao Laboratório de Aberturas de Amostras e Ensaio Químicos (LAEQ) da Central Analítica da UFAM, onde foram armazenados em freezer sob temperatura de -18°C, temperatura definida segundo Maraschin *et al.*, 2017, totalizando 54 amostras coletadas.

A coleta foi realizada durante os dias ensolarados do mês de setembro sempre no mesmo horário, procurando assim não afetar bruscamente o clima interno da caixa das abelhas com uma rápida oscilação da temperatura interna, que poderia ocasionar a morte da colmeia. As regiões foram definidas pelas coordenadas geográficas tabela (6) e as imagens expostas de forma consecutiva conforme a figura (4) na sequência:

Tabela 6 – Especificação das coordenadas geográficas de cada região;

Município	Área	Região	Data	Coordenadas	Caixas
Manaus	(1)	Inpa (GPA)	29/08/16	3°05'50.29"S 59°59'6.29"O	6 caixas <i>M.s.</i> 6 caixas <i>M.i.</i>
	(2)	Brasileirinho (Ramal - Km 12)	31/08/16	3°00'33.36"S 59°51'01.29"O	6 caixas <i>M.s.</i> 6 caixas <i>M.i.</i>
	(3)	Tarumã (Ramal das Pedras)	04/09/16	2°56'50.36"S 60°05'11.74"O	6 caixas <i>M.s.</i> 3 caixas <i>M.i.</i>
	(4)	Puraquequara (Ramal Bela Vista)	06/09/16	3°04'24.87"S 59°53'15.62"O	6 caixas <i>M.s.</i> 3 caixas <i>M.i.</i>
Iranduba	(5)	Ramal do Janauari	10/09/16	3°13'01.22"S 60°07'42.97"O	6 caixas <i>M.s.</i> 6 caixas <i>M.i.</i>

As coordenadas geográficas foram escolhidas de acordo com o ponto exato de coleta e todos os pontos foram demarcados com a utilização de GPS. A ordem de coleta do material foi estabelecida após o consentimento dos donos dos meliponários.

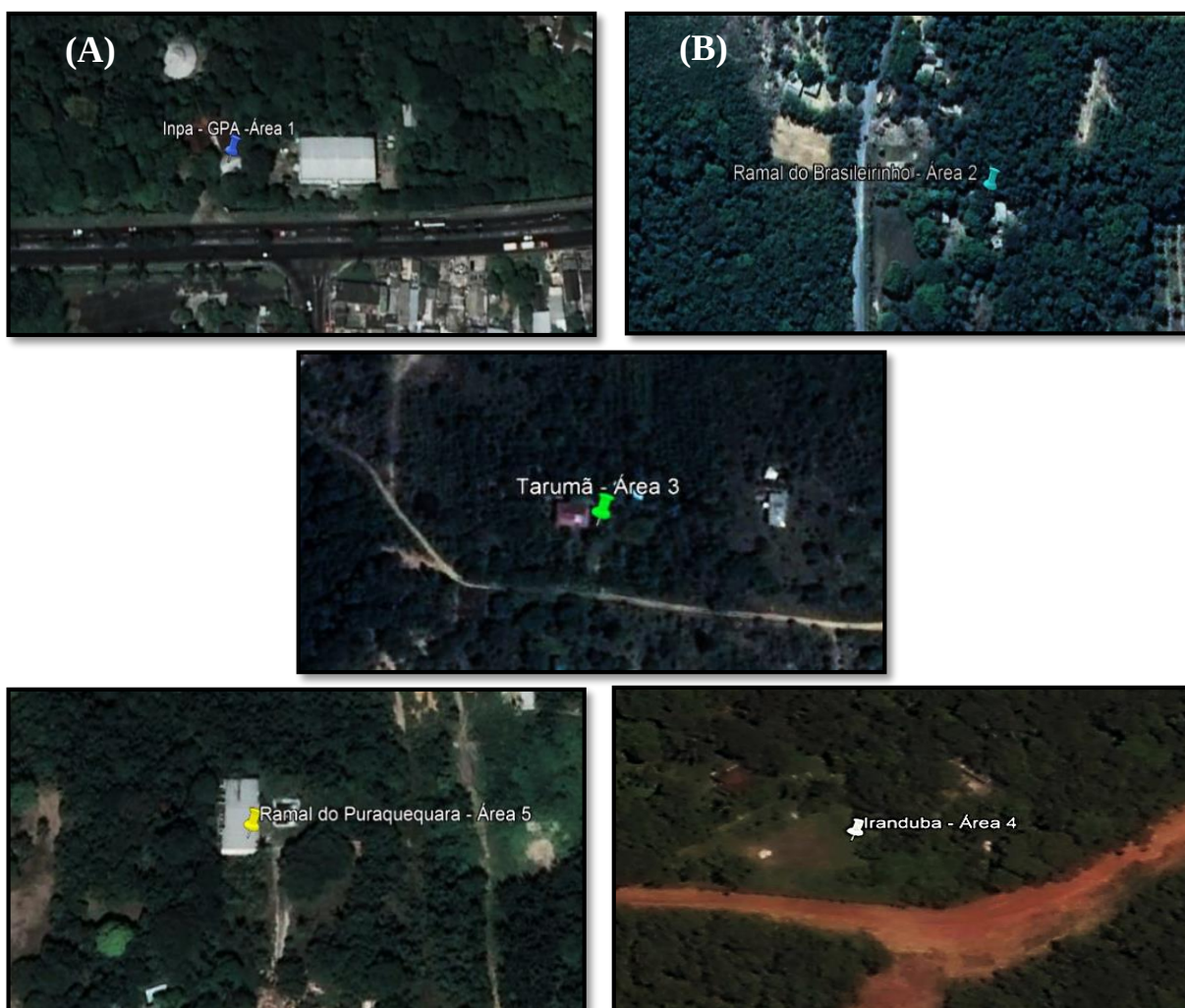
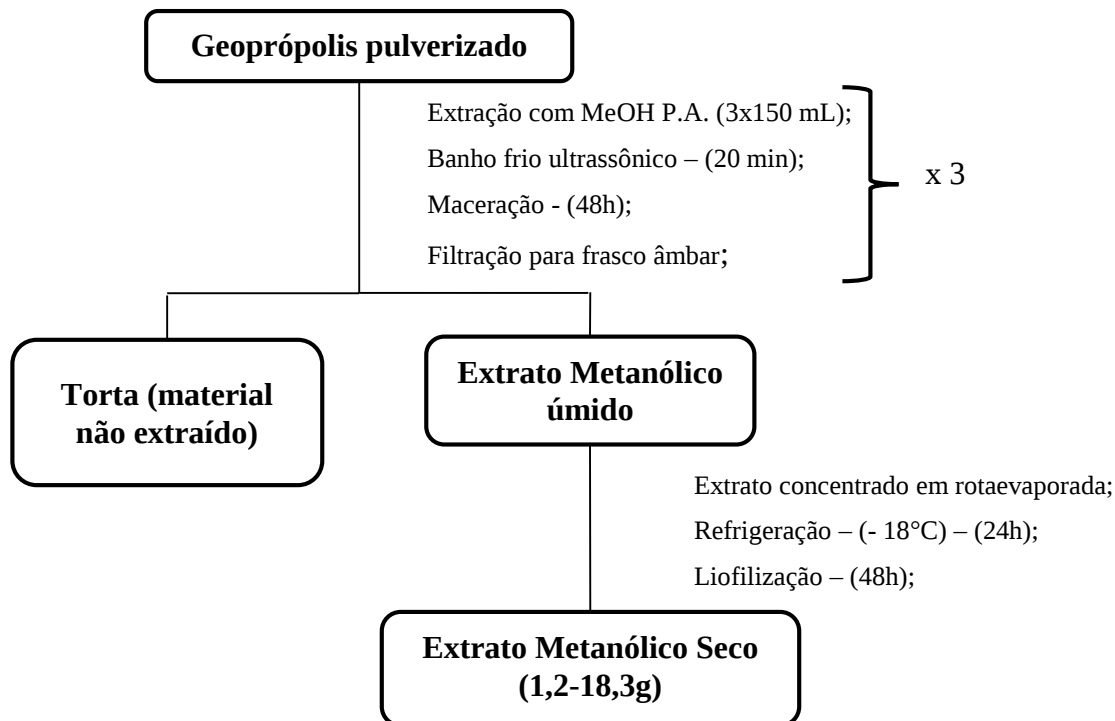


Figura 4 – Ampliação por área: (A) Inpa – GPA; (B) Brasileirinho; (C) Tarumã; (D) Puraquequara; (E) Iranduba; Fonte: Google Earth, 2017.

4.2. Preparo dos extratos metanólicos de geoprópolis

A obtenção dos extratos foi realizada em dois blocos de 27 amostras, para cada amostra foram pesados em erlenmayer de 500 mL, 100,0 g de geoprópolis previamente pulverizado em cadinho de porcelana com auxílio de um pistilo e submetido ao contato com 150,0 mL de metanol P.A. para extração. O material foi agitado em banho frio em aparelho ultrassônico por 20 minutos e deixado em repouso, o processo de maceração durou o período de 48 horas. Decorrido os dois dias, a solução extratora foi filtrada com papel de filtro e rotaevaporada à 40°C com rotação de 80 rpm removendo o solvente extrator e obtendo o material concentrado. A extração metanólica realizada teve como base metodológica as etapas usadas por Cunha *et al.*, 2009; Da Silva *et al.*, 2013; com adaptações.

O processo foi repetido três vezes de forma sucessiva até a exaustão de cor do extrato e o produto final transferido para frascos âmbar de massa conhecida e já previamente rotulados. Os conteúdos foram congelados em freezer à -18°C por 24 horas e secos por 48 horas em liofilizador ALPHA (1-2 LD/Plus), para retirar a água remanescente do extrato e conhecer a real quantidade de massa seca extraída. As massas finais dos mesmos foram mantidas sob refrigeração em freezer à -18°C para as análises posteriores (Fluxograma 1).

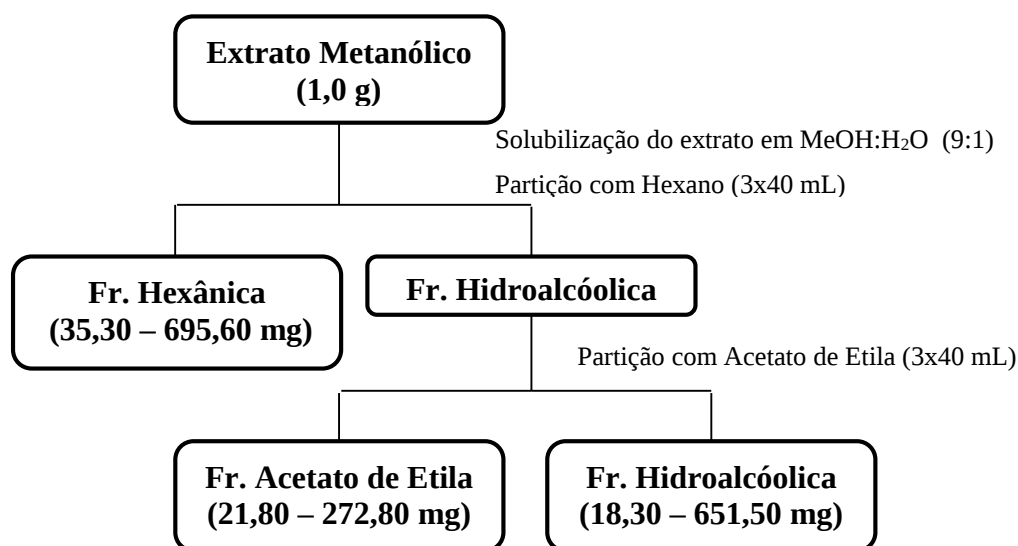


Fluxograma 1 - Preparo dos extratos metanólicos.

4.3. Método de Separação

4.3.1. Extração Líquido-Líquido para EM

A separação consistiu na realização de uma partição líquido-líquido utilizando solventes com características distintas de polaridade. O procedimento consistiu na pesagem de 1,0 g de extrato metanólico (MeOH) seco que foi solubilizado e suspenso com 40 mL de solução hidroalcoólica (MeOH:H₂O) na proporção de 9:1 e submetido a extrações consecutivas com hexano três vezes de 40 mL e na sequência com acetato de etila três vezes de 40 mL, cuja proporção hidroalcoólica (MeOH:H₂O) foi alterada para (7:3). As respectivas fases adquiridas foram concentradas em rotaevaporador sob temperatura de 40°C e 80 rpm de rotação e secas em liofilizador ALPHA (1-2 LD/Plus) por 48 horas (Fluxograma 2). A metodologia aplicada para a partição líquido-líquido teve como base a utilizada por Da Silva, 2012; Dutra *et al.*, 2014 com adaptações. Os resultados obtidos foram processados utilizando o software *Xcalibur* 2.0.7.



Fluxograma 2 - Preparo das partições líquido-líquido dos extratos metanólicos.

4.4. Métodos espectrométricos

4.4.1. Análise por Espectrometria de massas (EM)

As fases das amostras de geoprópolis de ambas as espécies foram injetadas diretamente no espectrômetro de massas tipo íon-trap, modelo: LCQ Fleet, marca: Thermo Scientific (figura 3), localizado no laboratório do LEMAH da Central Analítica (UFAM). As análises foram desenvolvidas no modo negativo com a fonte de ionização: *eletrospray* (ESI), sob a faixa mínima de 100 Da e máxima de 1000 Da de detecção.

O desenvolvimento das análises consistiu na união das respectivas fases polares (AcOEt e MeOH/H₂O) e na pesagem de 1 mg em um eppendorf e na diluição em 1 mL de metanol grau HPLC atingindo assim, a concentração de 1 mg/mL. Do total foram retirados 20 µL e diluídos em 1000 µL de MeOH grau HPLC, injetados sob vazão de 10 µL/min e volume de 500 µL no equipamento de forma direta, randomicamente e três vezes por amostra.

Antes do procedimento, foram escolhidas cinco amostras dentre as 54 de forma aleatória e assim realizado o ajuste dos parâmetros específicos de análise e definidos os seguintes valores: Fluxo de Gás do revestimento (arb.): 9,98; Fluxo de Gás auxiliar (arb.): 5,0; Taxa de fluxo do gás (arb.): -0,17; Tensão de pulverização (Kv): 4,96; Temperatura do Capilar (°C): 249,93; Voltagem do Capilar (V): -21,00; Lente do Tubo (V): -80,03 e Corrente de pulverização (µA): 8,84. O ajuste de tune teve por finalidade obter valores mais homogêneos dos TICS gerados nos espectros e os resultados obtidos foram processados utilizando o software *Xcalibur 2.0.7*.



Figura 3 - Espectrômetro de massas tipo íon-trap, modelo LCQ Fleet, marca: Thermo Scientific.
Fonte: Rebello, L.S.S., 2017.

4.4.2. Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética (RMN)

Os dados dos espectros de RMN foram obtidos no laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (NMRLab) da Central Analítica (UFAM), empregando a técnica de espectroscopia de RMN. As obtenção dos *fingerprints* dos 54 extratos metanólicos, foi realizada a medida unidimensional em relação ao núcleo do átomo de hidrogênio (¹H) e para auxiliar a caracterização das substâncias, foram executados os experimentos bidimensionais de correlação de núcleos de hidrogênios J_{H-H} (COSY- *Homonuclear Correlation Spectroscopy*) e de correlação entre núcleos atômicos distintos ¹³C-¹H por uma ligação (HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Coherence*) ou mais de uma para o (HMBC - *Heteronuclear MultipleBond Coherence*).

Os experimentos foram processados no aparelho espectrométrico de Ressonância Magnética Nuclear da marca BRUKER, modelo: AVANCE III HD (figura 4), equipado com a sonda de 5 mm multinuclear, modelo: BBFO Plus SmartProbeTM com gradiente de campo na direção Z e cujo o sistema opera com frequência de 500, 13 MHz.

Os parâmetros específicos de análise e aquisição dos espectros foram definidos para os valores: Pulso de excitação: 90°; Ganho do receptor (RG): 32; Número de scans (NS): 32, Tempo de aquisição (AQ): 2 min e 4 s, Tempo de reciclo (D1): 2,0s, Janela Espectral (SW): 20,00 ppm, Número de Pontos (TD): 32768, Peakw: 0,7-0,8; Transformação de Lorentz (lb): 0,0 Hz, Resolução do FID: 0,61 Hz, sequência de pulso zg, paradas, e em triplicata obtendo os espectros para a aplicação do estudo quimiométrico. As condições foram mantidas para todas as amostras e o padrão (TMSP-*d*₄) foi utilizado para calibrar em 0,00 ppm os espectros, além de ajustes de linha de base automáticas e as correções da fase manual dos espectros, o software TopSpin 3.5pl 7 (Bruker) foi utilizado.

Para as análises, foram pesados em frascos de vidro de 15,0 mL e em triplicata 15,0 mg de cada um dos 54 extratos metanólicos, totalizando 162 amostras, que foram solubilizadas em 600 µL de Metanol deuterado (MeOD) e tendo como padrão o (TMSP-*d*₄), a adição foi realizada utilizando pipeta semiautomática de 1000 µL (calibrada). Todas as amostras foram submetidas ao ultrassom por cinco minutos, em seguida, filtradas com auxílio de um algodão (esterilizado) e o conteúdo transferido para tubos de vidro de 5 mm.

As amostras definidas pelo estudo quimiométrico PCA foram analisadas por RMN utilizando a sequência de pulso zgpr para obtenção dos experimentos unidimensionais de hidrogênio ¹H, C¹³, Dept135 e bidimensionais COSY, HSQC e HMBC.



Figura 4 – Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear marca: BRUKER, modelo AVANCE III HD.
Fonte Rebello, L.S.S., 2017.

4.5. Métodos cromatográficos

4.5.1. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (LC-EM)

As amostras foram analisadas na Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (CA-LTQPN) localizado no Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas (INPA), utilizando como equipamento de leitura, um cromatógrafo líquido modelo Prominence UFLC, da marca Shimadzu, munido de uma bomba LC-20AT (binária), acoplado a um detector de arranjo de diodo (DAD) modelo: SPD-20A com equipamento de injeção automática da série SIL-20A que se encontra conectado a um equipamento de espectrometria de massas da marca: Brucker Daltonics e de modelo: Micro TOF-QII.

As análises foram desenvolvidas no modo (negativo) e a fonte de ionização escolhida foi *eletrospray* (ESI) e a faixa de operação definida em: 100-1000 *m/z*. A coluna cromatográfica utilizada foi um LiChrospher 100 RP-18 “endcapped” com tamanho de partícula com dimensão de 2,6 μm , 100 mm de comprimento e 2,1 mm de diâmetro interno. O estudo quimiométrico não supervisionado (PCA) realizado por EM e RMN forneceu a definição de quais grupos de amostras dentre as 54 viriam a serem exploradas via técnica de LC-EM.

A concentração utilizada das amostras foi de 1 mg/mL de metanol (MeOH), o volume de injeção definido em 5 μL , split de 0,045 mL, descarte de 0,255 mL, fluxo de 0,3 mL/min e com injeção de calibrante interno de formiato de sódio (HCOONa) a 10 mM no final da corrida cromatográfica e a detecção no arranjo de diodos cobriu a faixa de 190 a 400 nm. Fase móvel A: solução aquosa de água e ácido fórmico 0,1% ($\text{H}_2\text{O} + 0,1\%\text{HCOOH}$) e a fase móvel B: mistura de acetonitrila e ácido fórmico 0,1% ($\text{ACN} + 0,1\%\text{HCOOH}$). Porém, as condições de análises foram diferentes dentre os grupos elencados, definidos em: grupo (I) e grupo (II).

Condições do Grupo I: Análise em modo gradiente alternativo com a condição de solventes: 0-15 min (5-42% de B), 15-16 min (42% de B), 16-18 min (42-100% de B), 20-22 min (100-5% de B), 22-25 min (5%).

Condições do Grupo II: Análise em modo gradiente alternativo com a condição de solventes: 0-15 min (50-100% de B), 15-20 min (100% de B), 20-23 min (100-50% de B), 23-25 min (50% de B).

Os resultados obtidos através de cromatogramas foram processados utilizando o software Data Analysis da marca: Brucker.

4.5.2. Análise por Cromatografia Gasosa (CG-EM)

As análises cromatográficas das 54 fases hexânicas foram realizadas no Laboratório de Cromatografia Gasosa (LABCG) da Central Analítica (UFAM) utilizando o equipamento de cromatografia gasosa da marca: Thermo Scientific, modelo: Trace CG Ultra, associado a um espectrômetro de massas também da Thermo Scientific, modelo: DSQIII e que possui um analisador quadruplo simples equipado com aparelhamento de autoinjeção modelo AI 3000 da Thermo Scientific (figura 5).

As análises foram processadas no equipamento que possuía uma coluna capilar trace TR-5 com 30 m de comprimento, cujo o diâmetro interno era equivalente à 0.25mm e com espessura de 0.25 μm referente ao filme. O arraste das amostras foi efetivado pelo gás Hélio trabalhando com taxa de fluxo de 1.0 mL.min⁻¹, o valor de tensão de 70 eV definido para a ionização das mesmas através do impacto de elétrons e a varredura com definição m/z de 40-600. A temperatura referente a interface do equipamento (CG-EM) e a fonte de íons se encontravam com 250°C. O injetor trabalhou no modo Split na razão (1:20) e com temperatura de injeção sendo de 250°C. A temperatura de programação do forno foi inicialmente de 60 a 300°C, taxa de acréscimo de 10°C/min e depois mantida a 300°C por 15 min. A metodologia escolhida teve como base procedimentos realizados por Da Silva, 2012, Araujo *et al.*, 2015; com adaptações.



Figura 5 - Equipamento de cromatografia gasosa (Thermo Scientific), modelo: Trace CG Ultra associado ao espectrômetro de massas (Thermo Scientific), modelo: DSQIII.

Fonte Rebello, L.S.S., 2017.

As amostras foram preparadas pesando 1,0 mg de cada uma das 54 fases hexânicas e dissolvendo-as em 10 ml de uma solução cuja proporção era de 90% de hexano para 10% de acetato de etila 9:1 (v/v). Após a dissolução, cada amostra foi passada em uma micro coluna preparada em uma pipeta Pasteur de 25 cm, com adição de 10 cm de sílica do tipo C₈, procedimento realizado para limpar os resquícios de impurezas. Após a filtração, foi coletada

os primeiros 1,5 mL de cada uma das amostras, estando apenas as substâncias para serem caracterizadas pela técnica de CG-EM.

Os resultados obtidos foram processados utilizando o software *Xcalibur* 2.0.7 e os espectros obtidos comparados com os dados contidos nas bibliotecas NIST, MAINLIB, WILEY e ADAMS, utilizando os índices de retenção (RT) e quando não possível a identificação dos compostos por meio destes, foi utilizado as fragmentações (íons) como base para a comparação junto a dados presentes na literatura e em plataformas HMBD, ChemSpider, Pubchem, ChEBI e ChEMBL.

4.6. Análises Estatísticas e Quimiométricas

Os resultados gerados a partir das injeções em EM foram tratados utilizando o software *Xcalibur* 2.0.7, ajustados para obtenção de uma matriz quadrada através do software Microsoft Excel[®] e transpostos para o software Chemoface[®] onde foram submetidos ao pré-processamento SNV e analisados pelos métodos não supervisionados de (PCA e HCA).

Os resultados de RMN foram tratados utilizando o software, Top Spin[®] (versão 3.5pl 7, Bruker), os espectros foram processados com ajustes de correção automática de linha de base, ajuste de fase e os espectros foram comparados para a verificação dos possíveis δ (deslocamentos químicos) de interesse e anotados os valores de referência para faixa de trabalho. Em seguida, do total de 162 amostras foi realizada a média espectral no software Unscrambler[®] versão 10.3 resultando em apenas 54 indivíduos. Os dados foram exportados para o software RStudio 1.0.44., processados excluindo duas regiões (0,30-5,30 ppm e 11,01-13,0 ppm) referentes aos sinais do MeOD, H₂O, partes do espectro com ausência de sinais e deixando apenas o intervalo com sinais de substâncias com características de sinais aromáticos, o algoritmo OBA (*optimized bucketing algorithm*) foi utilizado e definidos ajustes das divisões dos intervalos (*buckets*) das janelas espectrais para 0,05 ppm e *slackness* de 40%.

Os dados foram salvos na forma de matriz bruta (MNN), pré-processados por centralização na média, normalizados por *range* (amplitude) e aplicado o SNV novamente revelando melhores resultados de variância explicada em relação ao PCA e evidenciando um melhor agrupamento dos HCA.

As informações foram transferidas para o software Unscrambler[®] versão 10.3, os quais se encontravam organizados em uma só planilha de dados (matriz) tendo a sua divisão em amostras representadas pelo “n” e as variáveis representadas por “m”. A partir dessa nova disposição, a matriz passou pela etapa de normalização por escalonamento *range* (Amplitude)

método este, mais sensível, pois leva a amostra de comportamento diferenciado a se dispersar das outras, dando mais evidencia e significado ao conjunto de dados diferenciados (FERREIRA, 2015b). Em seguida, a nova matriz foi submetida aos métodos exploratórios não supervisionados de reconhecimento de análise padrão HCA (*Análise de Agrupamentos Hierárquicos*) e PCA (*Análise de Componentes Principais*) (CORREIA; FERREIRA, 2007; FERREIRA, 2015b).

Os dados dos rendimentos e dos ensaios químicos foram avaliados no software MINITAB[®], utilizando o teste Kruskal-Willis para distribuição não normal e para a distribuição normal a análise de variância ANOVA e Teste t comparados através do método Turkey para o intervalo de 95% de confiança, como o valor de referência significativa para englobar o conjunto de dados das 54 amostras de extrato metanólico referente as duas espécies.

4.7. Ensaios Químicos e Biológicos

4.7.1. Atividade antioxidante capacidade de sequestro do radical livre DPPH

O teste se baseia na aceitação de um elétron (hidrogênio) por parte do radical DPPH, para que este se torne uma molécula diamagneticamente estável, reduzindo-se na presença de um agente antioxidante através da perda da coloração característica, purpurina (MOLYNEUX, 2004; OLIVEIRA, 2015). O resultado foi expresso através da concentração em ($\mu\text{g/mL}$) de substrato (%CS₅₀), o qual causa 50% de perda da atividade do radical DPPH.

Os ensaios para a determinação da atividade antioxidante dos extratos metanólicos, foram realizados no Laboratório de Aberturas de Amostras e Ensaios Químicos (LAEQ) da Central Analítica, utilizou-se o método de capacidade de sequestro de radicais livres, DPPH. A substância padrão utilizada foi o 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH) (MOLYNEUX, 2004; OLIVEIRA, 2015), representando o radical livre incorporado.

O teste consistiu de um ensaio preliminar, para obter uma faixa de concentração que represente o valor fidedigno de %CS₅₀. Os valores da absorbância estimaram a faixa de trabalho para realização de cinco diluições sucessivas para os extratos e para o padrão. O procedimento foi desenvolvido em placas do tipo Elisa com 96 poços, com adição de uma alíquota da solução metanólica de DPPH para as diferentes concentrações das amostras, e na sequência, foram deixadas reagindo com o radical DPPH, durante 30 minutos em ambiente escuro. Para o controle padrão positivo a quecertina foi utilizada (CHOI *et al.*, 2002;; MUNIZ *et al.*, 2009; DA SILVA *et al.*, 2013). A absorbância medida em um leitor de multiplaca da BioTek, modelo Elx800 no comprimento de onda de 515 nm (MOLYNEUX, 2004; CHOI *et al.*, 2006;).

O cálculo para obtenção do %CI realizado para identificar a atividade antioxidante, converteu os valores de absorbância obtidos, em porcentagem, avaliando assim, a capacidade de sequestro do radical livre DPPH (%CI₅₀) pela fórmula (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; MOLYNEUX, 2004):

$$\%CI = 100 - \frac{(\text{Absorbância da amostra} - \text{Absorbância do branco}) \times 100}{\text{Absorbância do controle}}$$

4.7.2. Determinação de Fenólicos Totais

Os ensaios utilizando os extratos metanólicos de geoprópolis das espécies de *M. interrupta* e *M. seminigra*, foram realizados no Laboratório de Aberturas de Amostras e Ensaios Químicos (LAEQ) da Central Analítica, através do método espectrofotométrico Follin-Ciocalteau (DA SILVA *et al.*, 2013; SOUSA *et al.*, 2007). As soluções utilizadas foram a de Follin-Ciocalteau 10 %, bicarbonato de sódio 6% (NaHCO₃) ambas preparadas com água Milli-Q e o padrão ácido gálico. A obtenção da curva de calibração resultou no preparo da solução padrão de ácido gálico de 1 mg/mL e esta foi diluída nas sucessivas concentrações de 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25, 15,62 e 7,81 µg/mL (DA SILVA *et al.*, 2013; VELIOGLU *et al.*, 1998).

O preparo das amostras de extrato metanólico com a concentração de 1mg/mL. Desta solução foram retirados 200 µL e acrescidos 1,5 mL do reagente de Follin-Ciocalteau 10%, passados cinco minutos foram acrescidos mais 1,5 mL da solução de bicarbonato de sódio a 6%. As amostras foram deixadas reagindo em ambiente escuro durante 90 minutos e decorrido o tempo de incubação foi realizada a medida das absorbâncias no equipamento UV/Visível Femto 800XI sob o comprimento de onda de 725 nm e como o branco a solução de água Milli-Q/Metanol.

4.8.1. Ensaio de atividade antimicrobiana

Os ensaios referentes aos extratos metanólicos de geoprópolis de *M. interrupta* e *M. seminigra*, foram realizadas no Laboratório de Bioensaios e Microorganismos da Amazônia (LAB-MICRA) da Central Analítica (UFAM). O teste consistiu em detectar atividade antibacteriana e antifúngica presente ou não nos extratos das duas espécies.

Estes foram submetidos aos testes com seis tipos de cepas da coleção Cefar Diagnóstica (CCCD): sendo duas bactérias gram-positivas (coloração roxa) *Staphylococcus aureus* (S 007), *Enterococcus faecalis* (E 002), duas gram-negativas (coloração vermelha) *Escherichia coli* (E

004), *Pseudomonas aeruginosa* (P 004) e dois fungos: *Candida albicans* (CC001), *C. tropicalis* (CC 002).

As concentrações utilizadas nos testes em relação as colônias foram definidas com valores para unidades formadoras (UFC.mL⁻¹). As leveduras possuindo o valor determinado de $2,0 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹ e $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ para a concentração de bactérias, tendo o valor de 0,5 de definição, o qual está baseado na escala de turbidez de Mc Farland (CLSI, 2002; CLSI, 2003).

Os controles positivos e negativos foram diferentes para cada teste. O controle positivo foi utilizado de acordo com a especificidade de cada patógeno, sendo também administrado um antibiótico de concentração definida (2mg/mL) em cada ensaio. As bactérias: *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* o antibiótico foi a Ampicilina (2mg/mL). Já para as: *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, foi a Tetraciclina (2mg/mL) e para os fungos: *Candida albicans* (CC001), *C. tropicalis* (CC 002) o Fluconazol (2mg/mL). O Controle negativo foi a utilização da própria solução de solubilização das amostras, Dimetilsulfóxido (DMSO) e H₂O destilada autoclavada na proporção de (1:9) respectivamente.

As amostras utilizadas no ensaio foram provenientes da extração metanólica de geoprópolis das espécies de *M. interrupta* e *M. seminigra*. Estas foram preparadas após a pesagem de 2 mg do extrato seco e solubilizadas em 1 mL da solução de 10% de (DMSO) e 90% de H₂O destilada autoclavada, atingindo a concentração de 2 mg/mL de solução.

4.8.2. Teste de determinação da efetividade das amostras frente aos patógenos

A verificação da atividade antimicrobiana frente aos patógenos foi inicialmente testada por meio de uma triagem (*screening*). O procedimento foi realizado em placas do tipo Elisa de 96 poços, em triplicata com adição de 100 µL referentes ao meio de cultura (concentração dobrada). Em seguida, foram acrescentados mais 100 µL da solução mãe (2 mg/mL) e 10 µL das células dos patógenos cuja a concentração para as bactérias era de $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ e para os fungos $2,0 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹. Os testes foram preparados e deixados para incubação durante 24 horas e temperatura de 36 ± 1 °C em estufa.

As microplacas após o período de incubação de 24 horas, foram submetidas ao acréscimo de diferentes tipos de revelador um para cada patógeno. Nos poços que continham o inóculo leveduriforme, foram adicionados 10 µL o NBT (nitroazul de tetrazólio) a 1%, utilizado para avaliar a oxidação no metabolismo dos neutrófilos (células de defesa), feita através da redução dos sais de NTB formando depósitos de cor roxo ou violeta (CASIDA, 1977; FONTEQUE *et al.*, 2015;).

Já para os poços com inóculo bacteriano foram adicionados 10 µL de TTC (2,3,5-cloreto de 2,3,4-trifeniltetrazólio), que age como um aceitador de prótons (oxidante) dentro do sistema redox, assumindo a coloração (vermelha ou rosa) quando reduzida na presença de bactérias com metabolismo ativo (CASIDA, 1977; OLGA *et al.*, 2008). Após a inoculação e adição de revelador, foi realizado a contraprova do teste que consistiu em adicionar 10 µL das amostras em meio sólido para constatar ou não de atividade microbiana.

4.8.3. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) em placa de Elisa

A etapa inicial do teste consistiu na realização do *screening* para conhecer quais amostras dentro do conjunto de 54 apresentaram atividade antimicrobiana. Constatado a primeira etapa, a segunda foi a realização do teste de diluições sucessivas com o intuito de determinar a concentração mínima inibitória (CMI) frente aos patógenos.

Realizado em triplicata, consistiu na adição de 100 µL do meio de cultura (concentração dobrada) mais 100 µL da amostra em cada um dos poços iniciais da placa do tipo Elisa. Todos os poços iniciais tiveram seu conteúdo homogeneizado com o auxílio da pipeta semi-automática após cada adição. Em seguida, foram retirados 100 µL do primeiro poço (linha A), adicionados no subsequente (linha B), procedimento repetido até o oitavo poço (linha H) (Quadro 4). Adicionou-se a cada poço 10 µL dos patógenos, sendo repetido os controles (+ e -) e deixado incubado por 24 horas a 36 ± 1 °C.

Quadro 2 – Esquema das concentrações com as diluições sucessivas da placa tipo Elisa 96 poços.

Poços	Concentração	
	(mg/mL)	(µL/mL)
A ○○○	1	1000
B ○○○	0,5	500
C ○○○	0,25	250
D ○○○	0,125	125
E ○○○	0,0625	62,5
F ○○○	0,03125	31,25
G ○○○	0,015625	15,62
H ○○○	0,0078125	7,81

Fonte – Rebello, L.S.S., 2017.

A contraprova do teste, consistiu em adicionar 10 µL do procedimento em meio sólido para comprovar se a atividade das amostras foi só bacteriostática/fungistática ou bactericida/fungicida.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Rendimento do material geoprópolis extraído para as análises posteriores

O geoprópolis coletado foi submetido aos processos de pulverização, pesagem e de extração com metanol (MeOH) no Laboratório de Aberturas de amostras e Ensaio Químicos (LAEQ) – Central analítica (CAM/UFAM). As etapas geraram valores de massa final e rendimento para cada uma das 54 amostras de ambas as espécies de abelhas sem ferrão.

Tabela 7 – Massas finais (g) e rendimentos (%) individuais das amostras de geoprópolis da espécie *M. seminigra*.

Espécie	Região	Nº	Caixa	Massa i (g)	Massa Final (g)	%	Mediana
<i>M. seminigra</i>	INPA (IN)	1	170	94,21	5,23	5,5	5,15
		2	211	100,00	4,96	5,0	
		3	175	100,04	3,16	3,2	
		4	214	100,06	1,57	1,6	
		5	212	95,04	1,72	1,8	
		6	209	100,06	4,16	4,2	
	BRASILEIRINHO (BR)	7	1	100,02	5,39	5,4	3,70
		8	2	100,03	7,38	7,4	
		9	3	100,07	2,78	2,8	
		10	4	100,01	4,94	4,9	
		11	5	100,00	5,62	5,6	
		12	6	100,05	3,39	3,4	
	TARUMÃ (TA)	13	34	100,02	10,68	10,7	2,05
		14	32	100,05	18,32	18,3	
		15	31	80,94	10,12	12,5	
		16	30	91,25	8,85	9,7	
		17	29	100,04	4,65	4,6	
		18	27	100,00	5,73	5,7	
	IRANDUBA (IR)	19	1	100,09	1,76	1,8	1,70
		20	2	100,06	2,67	2,7	
		21	3	100,02	2,54	2,5	
		22	4	100,06	1,54	1,5	
		23	5	100,05	1,95	1,9	
		24	6	100,07	2,24	2,2	
	PURAQUEQUARA (PU)	25	108	100,02	1,71	1,7	10,20
		26	91	100,06	2,74	2,7	
		27	63	100,05	1,71	1,7	
		28	0	99,39	2,50	2,5	
		29	1	100,06	1,40	1,4	
		30	95	100,03	1,50	1,5	

* Mediana obtida pelo teste não paramétrico (Kruskal-Wallis).

* Valor obtido no Teste Kruskal-Wallis de $P_{\text{obtido}} (0,001) < P_{\text{referência}} (0,05)$.

Tabela 8 - Massas finais (g) e rendimentos (%) individuais das amostras de geoprópolis da espécie *M. interrupta*.

Espécies	Região	Nº	Caixa	Massa _i (g)	Rendimento (g)	%	Mediana
<i>M. interrupta</i>	INPA (IN)	31	85	100,01	3,89	3,9	1,70
		32	55	100,3	6,23	6,2	
		33	4	100,04	4,57	4,6	
		34	500	100,03	6,08	6,1	
		35	43	100,00	6,31	6,3	
		36	77	100,07	10,02	10,0	
	BRASILEIRINHO (BR)	37	10	100,07	1,23	1,2	6,15
		38	A-01	100,09	2,05	2,0	
		39	H-16	100,07	2,08	2,1	
		40	B-05	100,04	1,29	1,3	
		41	F-08	100,01	1,42	1,4	
		42	X-05	98,87	3,26	3,3	
	TARUMÃ (TA)	43	17	90,92	3,82	4,2	1,30
		44	33	95,81	2,69	2,8	
		45	33-A	100,30	2,51	2,5	
	IRANDUBA (IR)	46	1	88,81	1,22	1,3	2,60
		47	2	100,06	1,51	1,5	
		48	3	100,06	1,23	1,2	
	PURAQUEQUARA (PU)	49	2	70,14	1,76	2,5	2,89
		50	11	92,04	3,69	4,0	
		51	13	36,51	2,22	6,1	
		52	15	69,58	1,38	2,0	
		53	8	99,99	1,65	1,7	
		54	9	57,26	1,54	2,7	

* Mediana obtida pelo teste não paramétrico (Kruskal-Wallis).

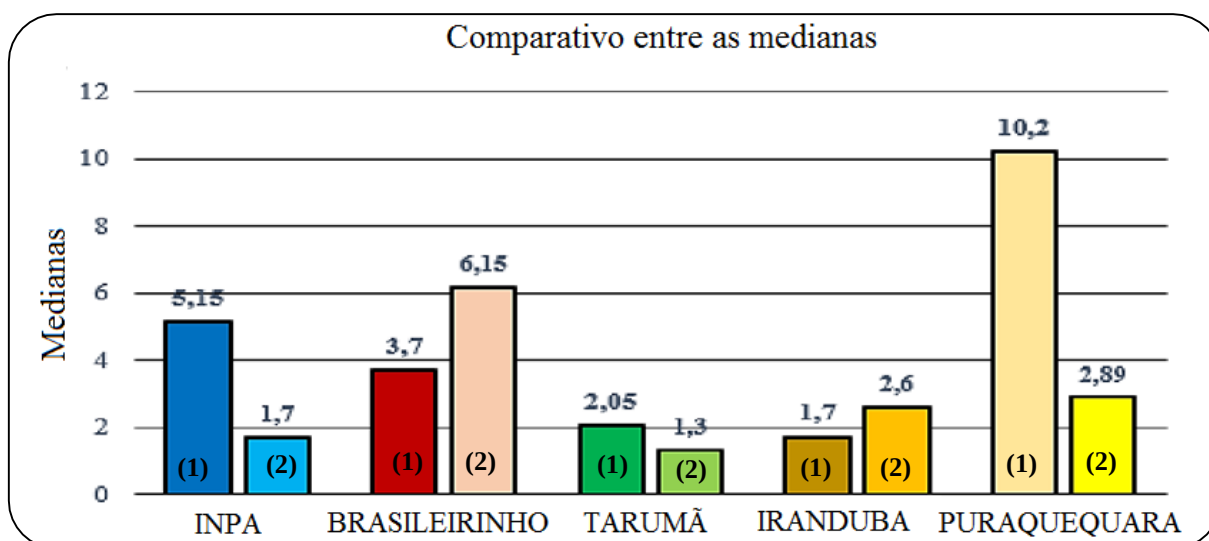
* Valor obtido no Teste Kruskal-Wallis de $P_{\text{obtido}} (0,003) < P_{\text{referência}} (0,05)$.

Os valores de massas obtidos para as espécies foram variados e quando comparados a estudos com geoprópolis utilizando o método de maceração, pode-se notar que mesmo seguindo etapas sequências e controladas está variação pode ocorrer. Em estudo realizado com extrato etanólico (70%) obtido da maceração de geoprópolis de *M. fasciculata* Smith do estado do Maranhão apresentou valores de massa final entre 1,97 – 20,10 g (DUTRA *et al.*, 2008).

Testes de padronização de extração com geoprópolis de *M. fasciculata* por maceração a frio revelaram que a metodologia empregada e que sistemas com líquidos extratores mais polares apresentam maiores rendimentos variando entre 1,82 a 5,34 g (CUNHA *et al.*, 2009).

Quando comparadas as medianas dos rendimentos obtidos dos extratos metanólicos de ambas as espécies *M. seminigra* e *M. interrupta* foi possível verificar que estatisticamente pelo método não paramétrico de Kruskal Wallis que não houve diferença significativa entre os valores de massa das espécies como evidenciado no gráfico 1 na sequência:

Gráfico 1 – Comparativo entre as medianas dos extratos metanólicos das espécies *M. seminigra* e *M. interrupta*.



* Espécies de *Melipona*: (1) *M. seminigra*; (2) *M. interrupta*.

Os valores do parâmetro $P_{obtidos}$ para as medianas das espécies de abelhas foi de 0,001 para a *M. seminigra* e de 0,003 para espécie *M. interrupta* ficando assim abaixo do valor de $P_{preferência}$ (0,05), mostrando que estatisticamente as informações do gráfico não apresentaram diferença estatística acentuada.

As informações forneceram condições para a escolha do solvente extrator metanol 100% junto a metodologia de maceração (48h) combinada ao ultrassom fosse definida, visto que a agitação mecânica das partículas favorece a maior infiltração do metanol na geoprópolis submetido ao banho ultrassônico, o que auxiliou também na extração dos compostos fenólicos (MUNIZ *et al.*, 2009; DA SILVA *et al.*, 2013; VIERA; PIOVESAN; STIEBE, 2016).

5.2. Rendimento da partição líquido-líquido do extrato metanólico

Nesta etapa, os valores de massa final obtidos são oriundos do procedimento de partição líquido-líquido de 1,0 g de extrato metanólico (seco) de cada uma das 54 amostras, afim de obter uma separação dos constituintes mais polares para as análises posteriores em EM e dos apolares para a análise em CG-EM, gerando as tabelas (9) e (10) de rendimentos abaixo:

Tabela 9 – Massa final (mg) das fases obtidas por partição líquido-líquido dos extratos da *M. seminigra*.

Espécies	Região	Nº	Rendimento (g)					
			Fase Hexânica	Média ± DP	Fase AcOET	Média ± DP	Fase MeOH:H ₂ O	Média ± DP
<i>M. seminigra</i>	INPA (IN)	1	0,403	0,240 ± 0,131	0,077	0,087 ± 0,039	0,089	0,250 ± 0,214
		2	0,107		0,089		0,273	
		3	0,213		0,071		0,090	
		4	0,078		0,160		0,652	
		5	0,300		0,043		0,131	
		6	0,342		0,086		0,264	
	BRASILEIRINHO (BR)	7	0,589	0,556 ± 0,118	0,273	0,201 ± 0,076	0,135	0,156 ± 0,083
		8	0,503		0,243		0,072	
		9	0,500		0,254		0,140	
		10	0,696		0,064		0,135	
		11	0,383		0,192		0,137	
		12	0,669		0,179		0,318	
	TARUMÃ (TA)	13	0,335	0,433 ± 0,167	0,135	0,174 ± 0,020	0,102	0,146 ± 0,071
		14	0,200		0,183		0,131	
		15	0,631		0,169		0,118	
		16	0,576		0,181		0,131	
		17	0,340		0,188		0,245	
		18	0,519		0,187		0,147	
	IRANDUBA (IR)	19	0,400	0,409 ± 0,122	0,022	0,184 ± 0,227	0,032	0,095 ± 0,071
		20	0,383		0,196		0,043	
		21	0,591		0,227		0,050	
		22	0,211		0,111		0,150	
		23	0,423		0,156		0,082	
		24	0,449		0,391		0,212	
	PURAQUEQUARA (PU)	25	0,300	0,222 ± 0,073	0,154	0,176 ± 0,135	0,107	0,073 ± 0,045
		26	0,278		0,134		0,106	
		27	0,269		0,254		0,034	
		28	0,195		0,052		0,033	
		29	0,107		0,069		0,033	
		30	0,184		0,395		0,128	

* Valores de rendimento alto destacados na cor azul e baixo na cor vermelha.

* Teste ANOVA com 95%, valor de P_{obtido} (0,0005) < $P_{\text{referência}}$ (0,05); Teste t: $F_{\text{calculado}}$ (14,02) > $F_{\text{crítico}}$ (4,02).

A espécie *M. seminigra* revelou diferença entre os dados obtidos de massa da fase hexânica entre os pontos de coleta. A região do Brasileirinho apresentou maior média de

extração com 0,556 g entre todas as regiões e a região do Puraquequara apresentou a menor quantidade 0,222 g. Já as médias dos rendimentos das fases mais polares (AcOET e MeOH:H₂O) somadas revelaram que a localidade do Brasileirinho novamente obteve o maior quantitativo 0,357 g em detrimento a região do Puraquequara que apresentou 0,249 g.

A espécie *M. interrupta* apresentou valores de massa para a fase hexânica distintos entre os pontos de coleta. A região do Iranduba proporcionou 0,239 g em detrimento da região do Brasileirinho que rendeu 0,171 g. Em relação as fases mais susceptíveis a ter constituintes polares somadas (AcOET e MeOH:H₂O) apresentaram para a região do Puraquequara 0,470 g e a a região do Tarumã apresentou menor quantidade 0,320 g, conforme tabela (12) abaixo:

Tabela 10 - Rendimento (mg) das fases obtidas por partição líquido-líquido dos extratos da *M. interrupta*.

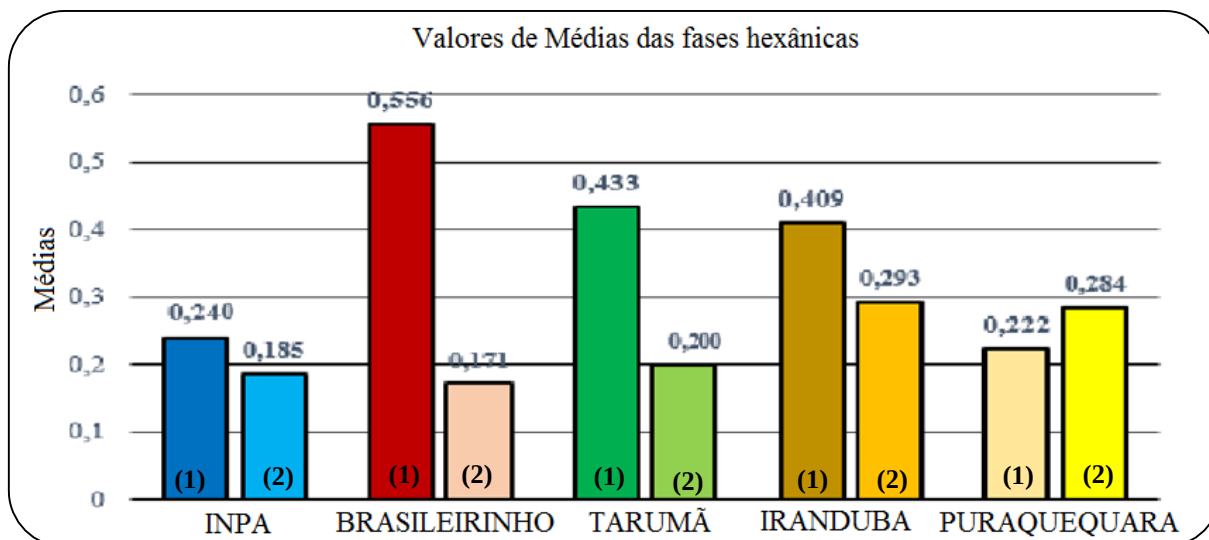
Espécies	Região	Nº	Rendimento (g)					
			Fase Hexânica	Média ± DP	Fase AcOET	Média ± DP	Fase MeOH:H ₂ O	Média ± DP
<i>M. interrupta</i>	INPA (IN)	31	0,300	0,185 ± 0,065	0,108	0,164 ± 0,056	0,255	0,185 ± 0,065
		32	0,154		0,152		0,200	
		33	0,142		0,261		0,398	
		34	0,141		0,200		0,400	
		35	0,147		0,152		0,589	
		36	0,225		0,111		0,144	
	BRASILEIRINHO (BR)	37	0,132	0,171 ± 0,109	0,231	0,245 ± 0,076	0,120	0,171 ± 0,109
		38	0,095		0,284		0,290	
		39	0,162		0,335		0,111	
		40	0,110		0,248		0,103	
		41	0,139		0,263		0,116	
		42	0,389		0,108		0,157	
	TARUMÃ (TA)	43	0,340	0,200	0,120	0,120	0,229	0,200
		44	0,122	±	0,119	±	0,146	±
		45	0,138	0,121	0,065	0,011	0,115	0,121
	IRANDUBA (IR)	46	0,281	0,293	0,140	0,120	0,108	0,293
		47	0,258	±	0,114	±	0,223	±
		48	0,340	0,042	0,107	0,116	0,117	0,042
	PURAQUEQUARA (PU)	49	0,370	0,284 ± 0,125	0,180	0,186 ± 0,101	0,203	0,284 ± 0,125
		50	0,283		0,200		0,190	
		51	0,391		0,149		0,251	
		52	0,149		0,227		0,138	
		53	0,114		0,188		0,141	
		54	0,397		0,170		0,055	

*Valores de rendimento alto destacados na cor azul e baixo na cor vermelha.

A análise dos resultados das fases hexânicas presente nas tabelas (9) e (10) ainda mostrou por ANOVA houve diferença entre a quantidade de cera presente na geoprópolis da

espécie *M. seminigra* em relação a da espécie *M. interrupta* conforme demonstrado no gráfico 2 abaixo:

Gráfico 2 - Comparativo entre as médias das fases hexânicas das espécies *M. seminigra* e *M. interrupta*.



* Espécies de *Melipona*: (1) *M. seminigra*; (2) *M. interrupta*.

O gráfico 2 acima mostra que as colunas de cores mais escuras com valor numérico de referência (1) para *M. seminigra* apresentam maior rendimento frente as da *M. interrupta*. O teste ANOVA com 95% de confiança foi aplicado e o parâmetro estatístico avaliado para comprovar a diferença entre os dados obtidos de rendimento hexânico das espécies foi o valor de P, sendo o P_{obtido} (0,0005) muito menor que o de $P_{\text{referência}}$ (0,05). A diferença existente pôde ser confirmada utilizando o Teste t que forneceu para o valor do parâmetro F, o $F_{\text{calculado}}$ (14,02) muito maior que o de referência $F_{\text{crítico}}$ (4,02) evidenciando que houve diferença estatística quanto a presença de cera nas amostras de *M. seminigra* (maior quantidade) em relação as de *M. interrupta* (menor quantidade).

5.3. Análise Quimiométrica dos dados de Ressonância Magnética Nuclear

A média espectral das 162 amostras resultou em apenas 54 indivíduos favorecendo a intensidade dos sinais mais interessantes e uma melhor dispersão dos dados facilitando a inspeção visual dos gráficos quimiométricos. O ajuste dos parâmetros de análise para obtenção dos *fingerprints* dos extratos metanólicos por RMN geraram gráficos de PCA (*scores* e *loadings*) com boas variâncias além da, separação das amostras da espécie *M. seminigra* em grupos definidos de I a IV, conforme evidenciado nos gráficos na sequência:

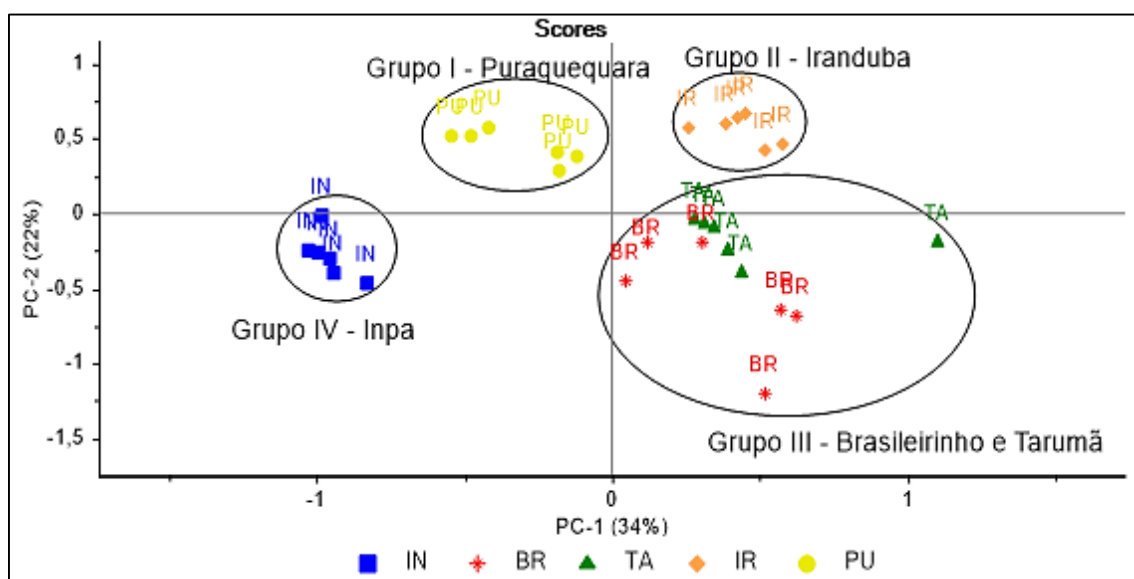


Figura 6 - Gráfico de *scores* (PC1xPC2) dispersão das amostras da espécie *M. seminigra* dos cinco pontos de coleta com somatória de 56% de variância explicada. Pré-processamento: SNV e Normalizado por *range*.

Analizando o gráfico de PCA (*scores*) e confrontado (PC1 x PC2) foi possível perceber a dispersão das amostras por regiões fitogeográficas formando quatro grupos, e com somatória de variância explicando 56% do modelo. A componente principal (PC1) apresentou Σ de 34% de variância explicando a separação dos grupos I e IV inseridos em ambientes com zona de mata já modificada. Já a componente principal (PC2) explicou 22% de variância do modelo, separando as amostras do grupo I (localizado na área urbana) do IV (parcialmente urbanizada) e o grupo II (mata primária) de III (zona de mata primária com vegetação secundária).

O gráfico de PCA (*loadings*) revelou que PC1 separou os grupos II e III e não os grupos I e IV. Já a PC2 separou os grupos I de IV e II de III. O PCA ainda mostrou um conjunto dos principais grupos de variáveis com pesos responsáveis pela dispersão de cada amostra em determinado grupo, como observado na figura (7).

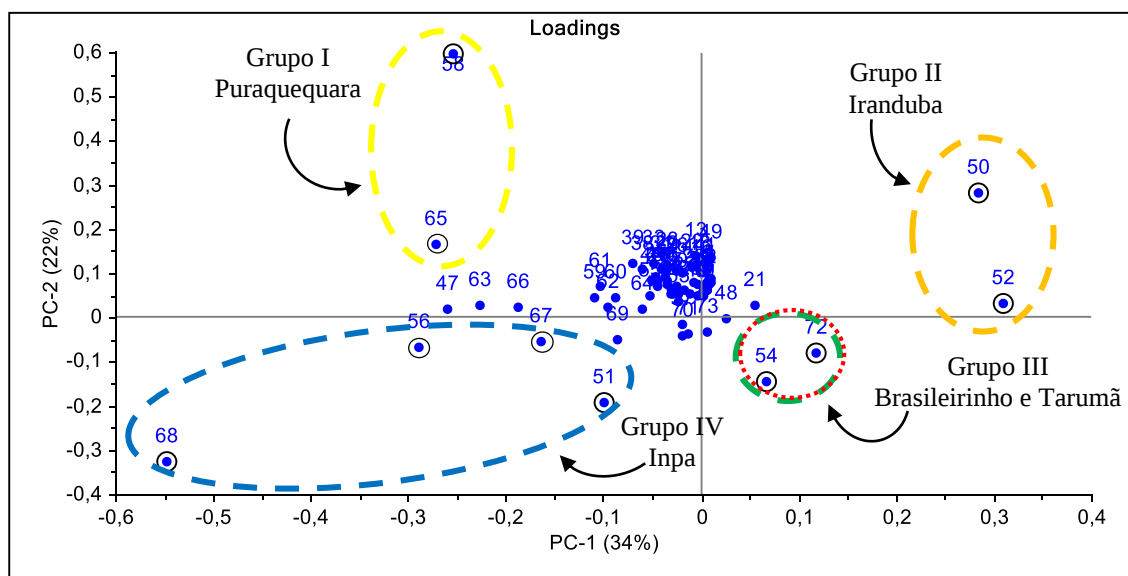


Figura 7 - Gráfico de *loadings* (PC1 x PC2) referente aos *bucketings* de maior peso nos espectros das amostras da espécie *M. seminigra* dos cinco pontos de coleta. Pré-processamento: SNV e Normalizado por *range*.

O gráfico de *loadings* apresentou para o grupo I (Puraquequara) as variáveis de maior peso **58** e **65** referentes aos deslocamentos espectrais mais baixos, **6.68-6.55 ppm** e **6.14-6.08 ppm** respectivamente. O grupo II (Irاندوبا) apresentou o **50** (**7.28-7.19 ppm**) e **52** (**7.10 e 7.01 ppm**). Tais sinais apresentados como dubletos e duplos dubletos (Figura 8) foram exclusivos dessas regiões (Figura 9) e os deslocamentos químicos foram mais determinantes que as multiplicidades sugerindo a possível presença de substâncias com características aromáticas.

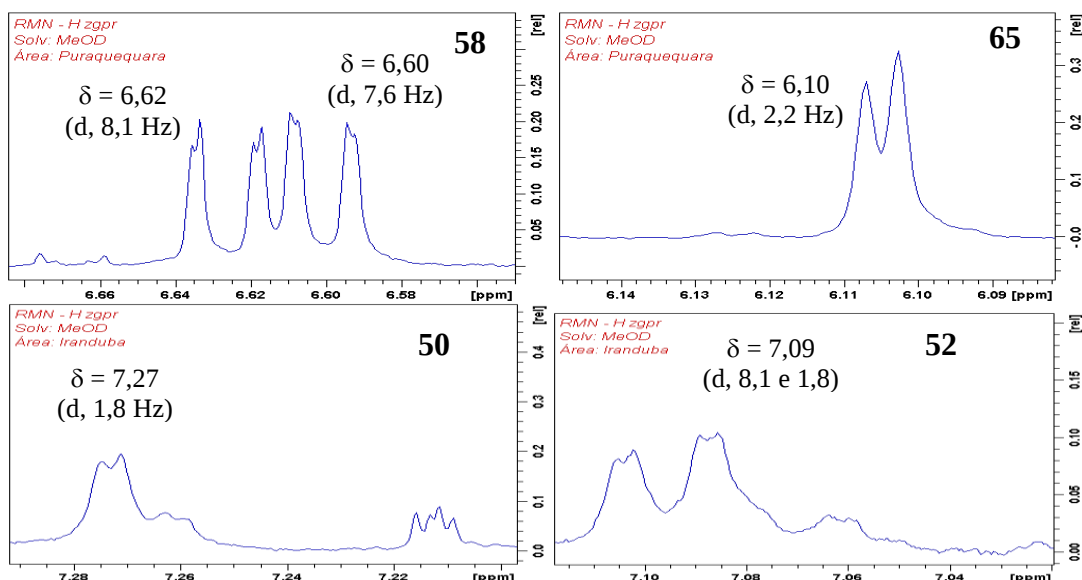


Figura 8 – Deslocamentos químicos referentes aos *loadings* **58** e **65** (Puraquequara) e **50** e **52** (Irاندوبا).

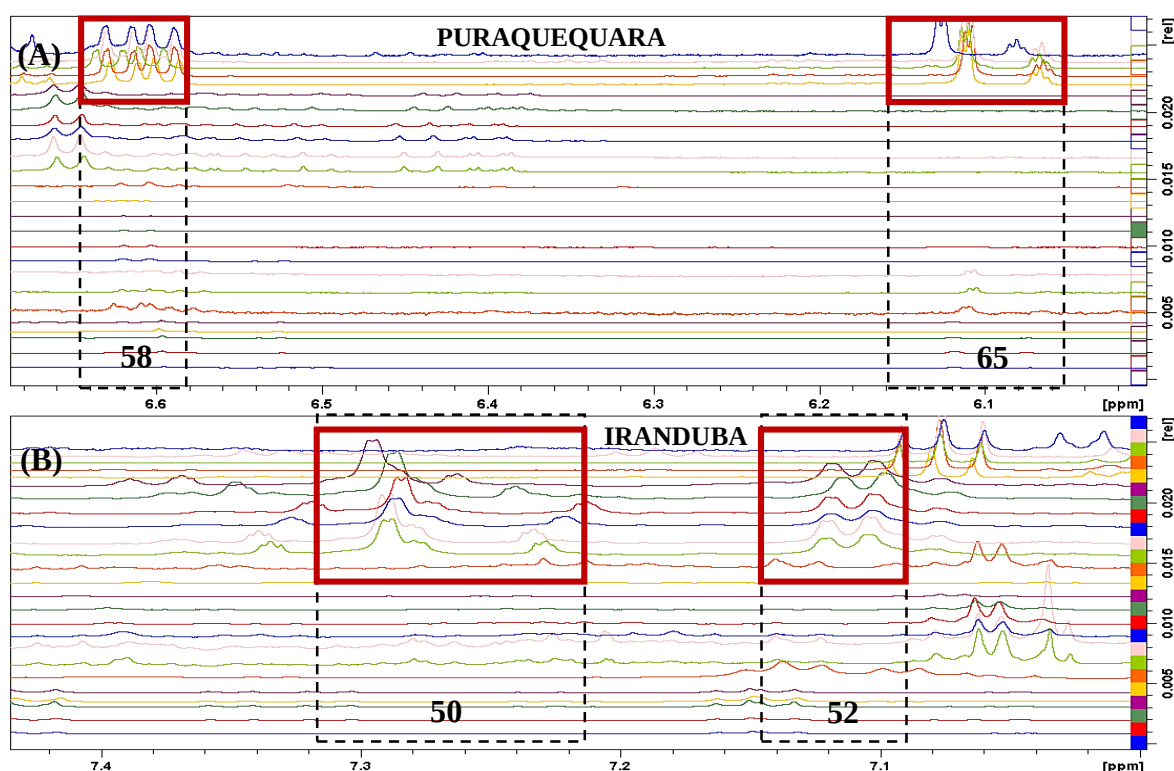


Figura 9 – Perfis espectrais das 30 amostras de *M. seminigra* com a representação dos sinais (destaque vermelho) exclusivos dos *loadings* das regiões: (A) Puraquequara 58 e 65; (B) Iranduba 50 e 52;

Já o grupo III (Brasileirinho e Tarumã) revelou os valores de peso 54 (6.98-6.87 ppm) referentes a singletos e 72 (5.50-5.60 ppm) uma área com ausência de sinal, conforme figura 10 (A) e (B) abaixo:

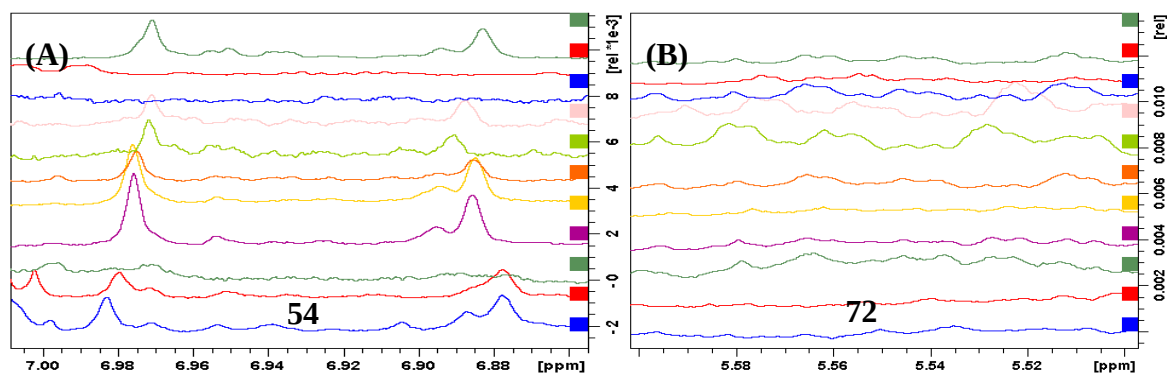


Figura 10 - Deslocamentos químicos referentes aos valores de peso 54 e 72 das áreas do Brasileirinho e Tarumã.

Os singletos e a área de deslocamento químico em que se encontram, pode ser indicativo segundo relato da literatura de anéis aromáticos ou de possíveis hidrogênios ligados a carbonos vinílicos próximos a um grupo fenil (Ph-CH=CH_2) (PAVIA *et al.*, 2010). Porém, não foi possível atribuir uma proposta de substância para os mesmos junto aos resultados dos mapas de contorno HSQC e HMBC.

O grupo IV (Inpa) apresentou os valores de *bucketings* de **51 (7,19-7,10 ppm)**, **56 (6,84 e 6,70 ppm)**, **67 (6,00-5,93 ppm)** e **68 (5,93-5,79 ppm)**. Os sinais revelaram multiplicidade referentes a dubletos, duplos dubletos e singletos cujos deslocamentos químicos sugeriram à presença de substâncias aromáticas da classe dos flavonoides, visto que, possuem valores de deslocamentos químicos característicos de sistemas dos anéis A e C (SLIMESTAD; ANDERSEN; FRANCIS, 1994; DE ALMEIDA *et al.*, 2005;).

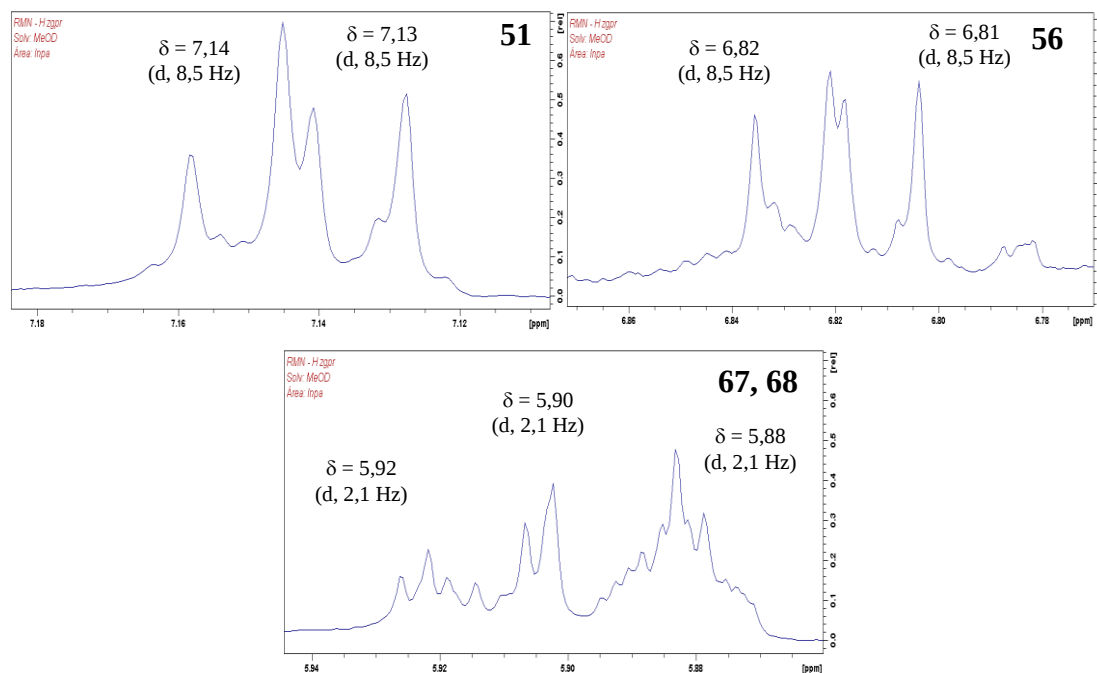


Figura 11 - Deslocamentos químicos dos *bucketings* 51, 56, 67 e 68 da área do Inpa.

Todos os sinais do grupo IV foram exclusivos da região do Inpa, não se fazendo presentes nos espectros das outras localidades como mostra a figura (12):

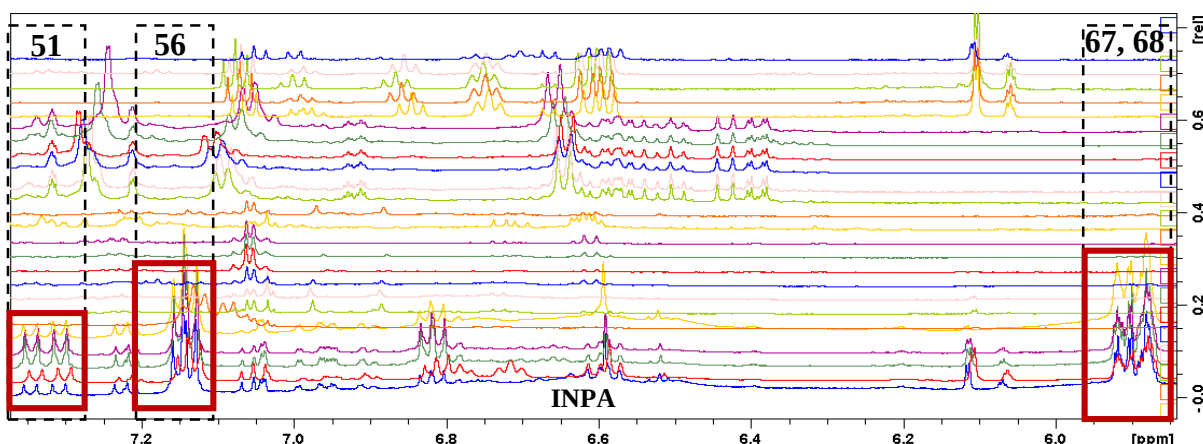


Figura 12 - Perfis espectrais das 30 amostras de *M. seminigra* com os sinais dos *loadings* 51, 56, 67 e 68 exclusivos da região do Inpa;

As 30 amostras de extrato metanólico da espécie *M. seminigra* foram distinguíveis entre si e alocadas em quatro grupos distintos pelos gráficos de PCA (*scores* e *loadings*), configurando que as mesmas possuem composição química diferenciada, provavelmente afetada pela região de coleta das resinas para compor a geoprópolis.

A somatória (PC1xPC2) da variância de 56% foi representativa para explicar o modelo de PCA (*scores*) permitindo estabelecer o grau de distinção entre os grupos (I, II, III e IV) e que corroborou junto a informação obtida por análise de agrupamento do gráfico de HCA:

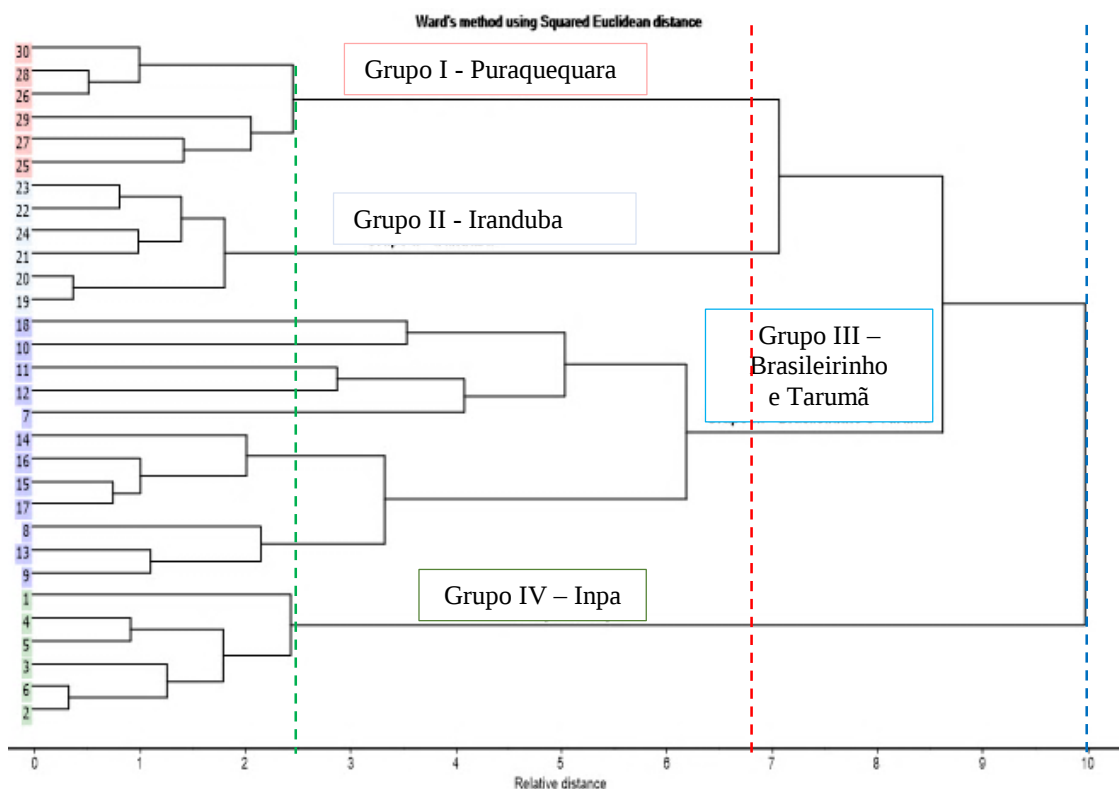


Figura 13 - Dendrograma (HCA) distância euclidiana das amostras da espécie de *M. seminigra* com representação dos principais grupos formados.

A representação dos grupos no dendrograma de HCA mostrou que o grupo IV (Inpa) foi o de maior índice diferenciação química com cerca de 10 (linha azul) em relação aos outros grupos. O distanciamento pôde ser explicado por possuir quatro *bucketings* no PCA (*loadings*) (Figura 7) que representam os sinais de deslocamentos químicos de H^1 na região dos aromáticos **51 (7,19-7,10 ppm)**, **56 (6,84 e 6,70 ppm)**, **67 (6,00-5,93 ppm)** e **68 (5,93-5,79 ppm)** (Figura 12). Os indivíduos do grupo IV apresentam similaridade química em torno de 2,5 (linha verde).

O grupo I (Puraquequara) e grupo II (Iranduba) apresentaram similaridade química em torno de 7 (linha vermelha). O valor é consequência da componente principal PC2 (22%) (Figura 7) que separa os grupos I e II pertencentes a mesma faixa de valores positivos de 0,0-0,6 ao longo do eixo x dos valores negativos dos grupos III e IV.

Outro ponto importante que influenciou na disposição dos grupos I e II no HCA foi o gráfico de peso das variáveis (Figura 14). Os *bucketings* 58 e 65 (grupo I) e 50 e 52 (grupo II) foram responsáveis pela separação no gráfico de PCA (*loadings*) por possuírem importância equivalente para os seus espectros, o que provavelmente ocasionou a aproximação destes no dendograma de HCA.

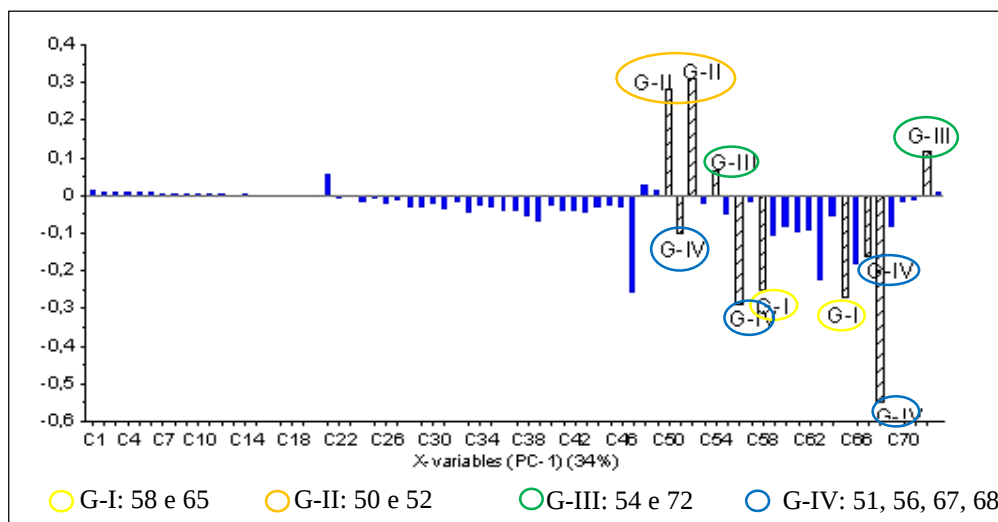


Figura 14 – Gráfico de pesos dos *bucketings* (PC1) das 30 amostras da espécie *M. seminigra*.

O gráfico de pesos também auxiliou para determinar a classificação do grupo III no gráfico de HCA, como um intermediário entre os grupos I, II e o IV, já que os *bucketings* das suas amostras representados por (G-III) apresentam menor contribuição (0,1) de peso em relação aos outros *bucketings* na PC1 (34%) e em PC2 (22%).

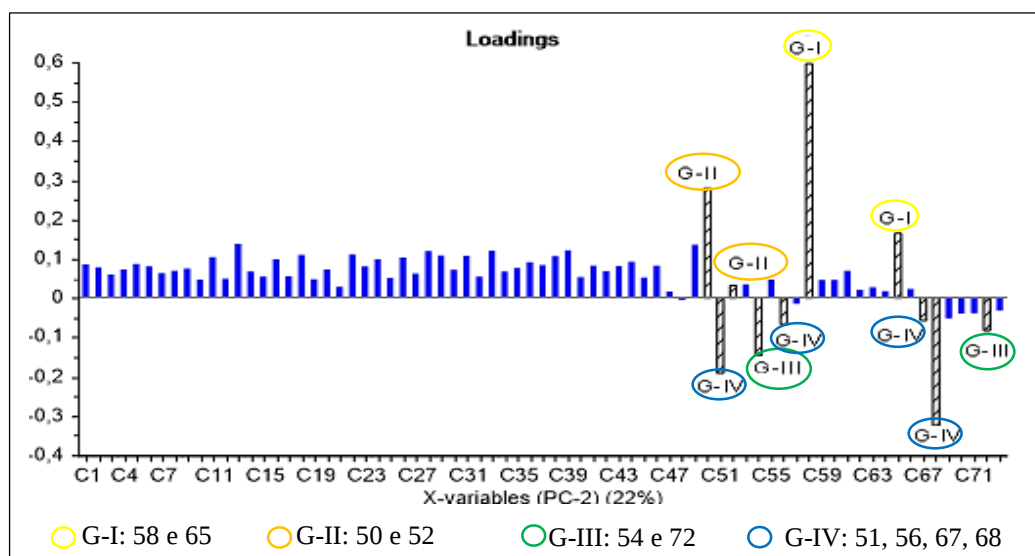


Figura 15 – Gráfico de pesos dos *bucketings* (PC2) das 30 amostras da espécie *M. seminigra*.

A abelha *M. seminigra* por possuir uma característica mais generalista quanto à visita florística revelou na disposição de seus dados por PCA e HCA a formação de quatro grupos

distintos tanto quimicamente por seus deslocamentos quanto por região, o que já era esperado devido a margem grande de espécies vegetais frequentadas. Porém para a espécie *M. interrupta*, não foi possível definir uma classificação para as amostras por quimiometria. O gráfico de *biplot* das PCAs (PC1 x PC2) abaixo evidenciou o resultado.

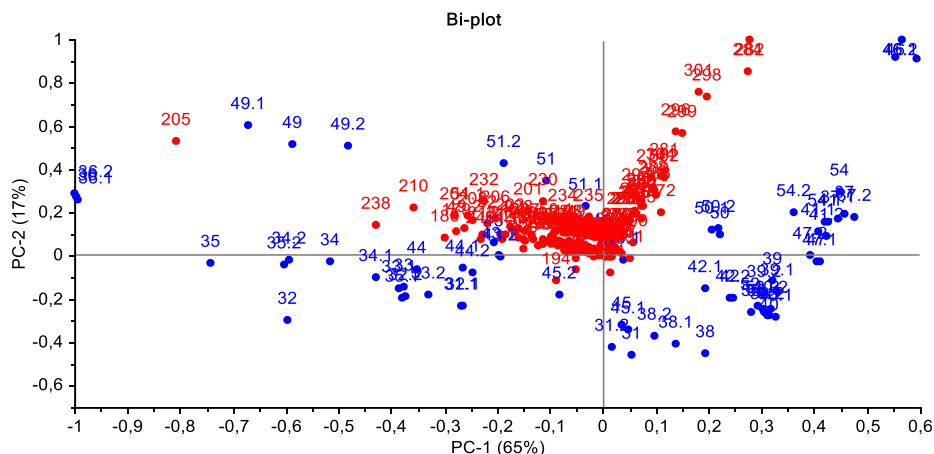


Figura 16 - Gráfico de *biplot* (PC1 x PC2) da dispersão dos *loadings* e *scores* das amostras da espécie *M. interrupta* dos cinco pontos de coleta com somatória de 77% de variância explicada.

Os perfis espectrais de RMN de H^1 das 24 amostras de *M. interrupta* comprovaram que os sinais químicos (dubletos e duplos dubletos) majoritários eram muito semelhantes na região dos aromáticos (linha tracejada), e que estavam presentes em todas as amostras. Outro fator importante observado nos espectros foi que, mesmo com a presença de alguns sinais químicos em determinados deslocamentos (linha vermelha), não foi possível para o estudo quimiométrico aplicado por PCAs causar uma separação de um ou mais grupos específicos de amostras.

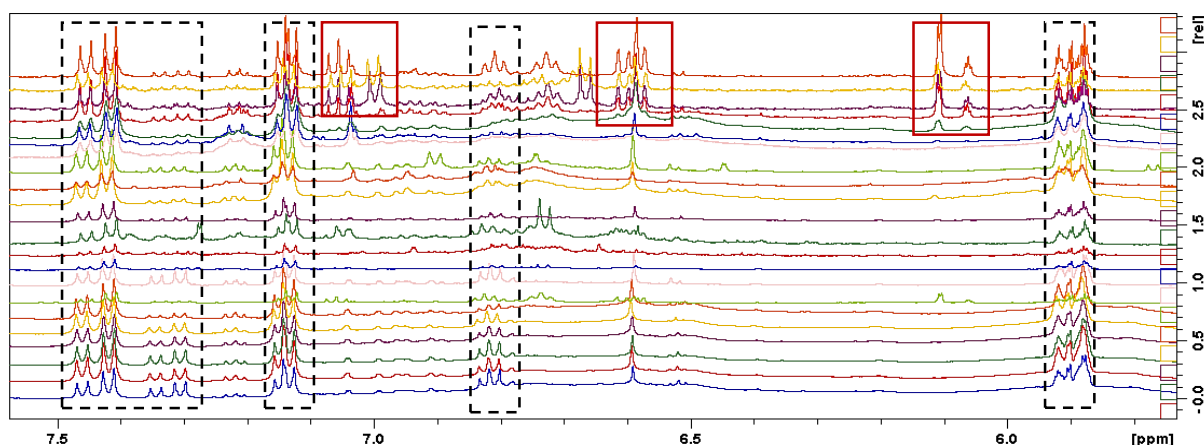


Figura 17 – Comparativos entre os 24 perfis espectrais das amostras de *M. interrupta* onde a linha tracejada indica sinais similares e a linha contínua vermelha revela sinais diferentes mas insuficientes para distinção química.

Ainda analisando os espectros de RMN de H^1 das amostras de cada ponto de coleta, Inpa (32), Brasileirinho (39), Tarumã (43), Iranduba (45,48) e Puraquequara (50), quando

comparados ao perfil espectral da amostra (3) de *M. seminigra* da região do Inpa revelaram pouca distinção entre os sinais químicos presentes na região dos aromáticos (linha tracejada).

Os deslocamentos presentes nos *bucketings* 51 (7,19-7,10 ppm), 56 (6,84 e 6,70 ppm), 67 (6,00-5,93 ppm) e 68 (5,93-5,79 ppm) encontrados para a espécie mais generalista, também estavam presentes nos espectros dos indivíduos da *M. interrupta* conforme evidenciado na figura (18):

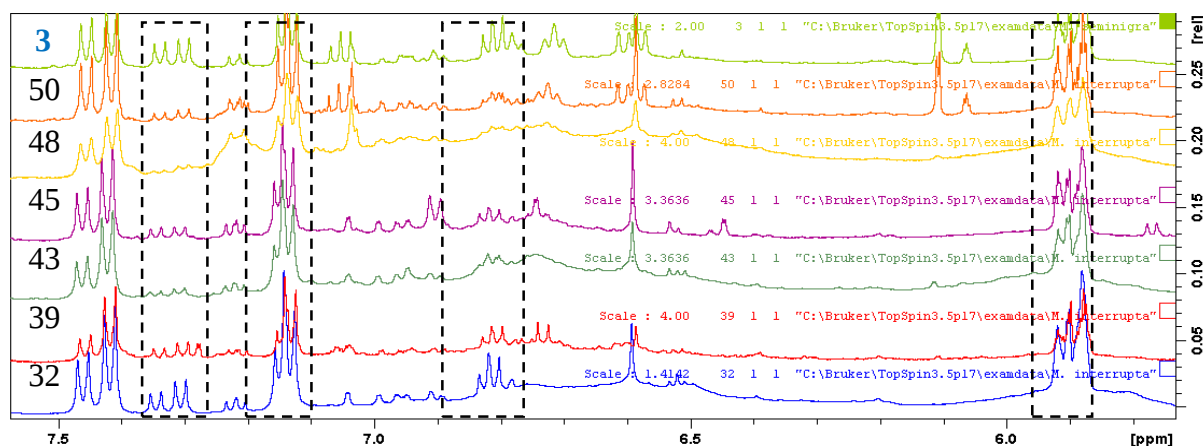


Figura 18 – Comparação entre os sinais químicos de H^1 das amostras (32, 39, 43, 45, 48, 50) de *M. interrupta* e a amostra (3) de *M. seminigra*.

As informações mostraram que mesmo sendo abelhas de espécie diferentes a composição química entre elas é bem similar. A explicação pode estar na sua característica mais restritiva, ou seja, a abelha *M. interrupta* visita uma quantidade menor de espécies de plantas, porém são as mesmas fontes polínicas visitadas pela espécie *M. seminigra* (FERREIRA; ABSY, 2013, 2017; OLIVEIRA; ABSY; MIRANDA, 2009). Assim, os sinais químicos destacados (Figura 18) nos espectros de H^1 (32, 39, 43, 45, 48 e 50) de *M. interrupta* sugeriram ser das mesmas substâncias aromáticas presentes no espectro da amostra (3).

Estudos químicos anteriores realizados com mel e pólen de *M. interrupta* e geoprópolis e pólen de *M. seminigra* comprovaram que determinadas classes químicas como flavonoides e ácidos fenólicos estão muito presentes na composição dos produtos de ambas as abelhas sem ferrão como por exemplo as substâncias naringenina, quercetina, ácido gálico, Ácido 4-hidroxibenzóico entre outros (VILLARREAL, 2010; DA SILVA et al., 2013; DA SILVA et al., 2013;)

Para certificar o grau de similaridade correspondente as amostras da *M. interrupta*, um grupo de cinco indivíduos (32, 37, 43, 47 e 54) representando os cinco pontos de coleta (Inpa, Brasileirinho, Tarumã, Iranduba e Puraquequara) foram analisadas por LC-MS, obtidos os perfis cromatográficos e comparados ao da amostra (4 - Inpa) da espécie *M. seminigra*:

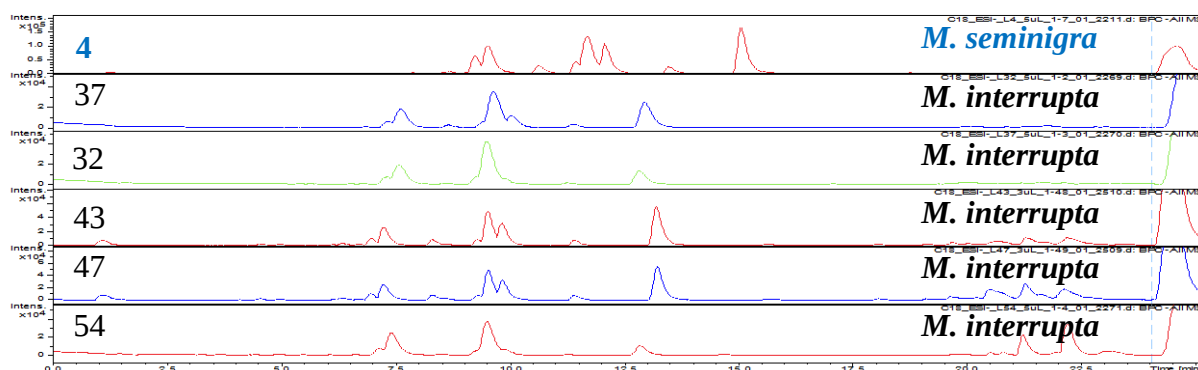


Figura 19 – Comparação entre os cromatogramas das amostras (32, 39, 43, 45, 48, 50) de *M. interrupta* e a amostra (4) de *M. seminigra* obtidos por LC-MS.

Os perfis cromatográficos comprovaram que os extratos da espécie *M. interrupta* apresentaram pouca distinção química, impossibilitando a aplicação de um padrão de análise quimiométrica.

O cuidado com os parâmetros de análise e aplicação dos métodos quimiométricos junto aos espectros de RMN H^1 contribuíram de forma eficaz para a obtenção de melhores resultados e para a retirada de informações químicas presentes nos extratos metanólicos de ambas as espécies. Os resultados enaltecem o aspecto mais generalista da espécie *M. seminigra* refletindo diretamente na discriminação química por regiões através das PCAs e dos espectros de RMN.

A técnica ainda munida das informações presentes nos cromatogramas de LC-MS confirmou que havia pouca distinção química entre as amostras de geoprópolis de *M. interrupta* com as amostras da área do Inpa da outra espécie, sugerindo assim que a abelha mais restritiva ao produzir sua geoprópolis possa visitar as mesmas espécies de plantas mesmo estando em regiões diferenciadas.

5.4. Caracterização das principais substâncias químicas a partir dos *bucketings* obtidos por análise Quimiométrica das amostras de *M. seminigra*

5.4.1. Caracterização SUBST-1 *bucketing* 58, deslocamento (6,68-6,55 ppm)

A partir das análises quimiométricas (PCA – *loadings*) dos espectros RMN de H^1 de *M. seminigra* foram obtidos os principais *bucketings* com os deslocamentos químicos das substâncias responsáveis pela tipificação nos grupos de amostras. Os deslocamentos foram explorados com experimentos de RMN 1D e 2D auxiliados pela técnica de LC-MS para obtenção da massa exata e os resultados comparados junto a literatura.

A análise de PCA revelou para o grupo I (Puraquequara) os valores **58** e **65**. O *bucketing* **58** (6,68-6,55 ppm) no espectro de RMN de H^1 foi escolhido para a tentativa de caracterização da substância **ácido anacárdico** (m/z : 347, 2590), responsável pela representação do grupo.

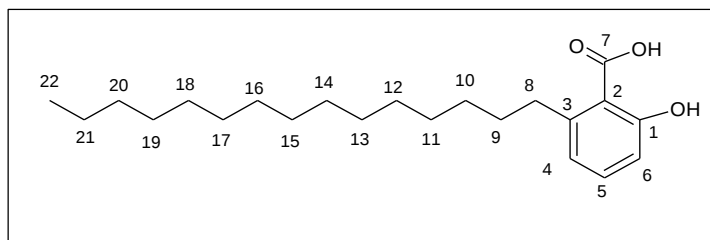
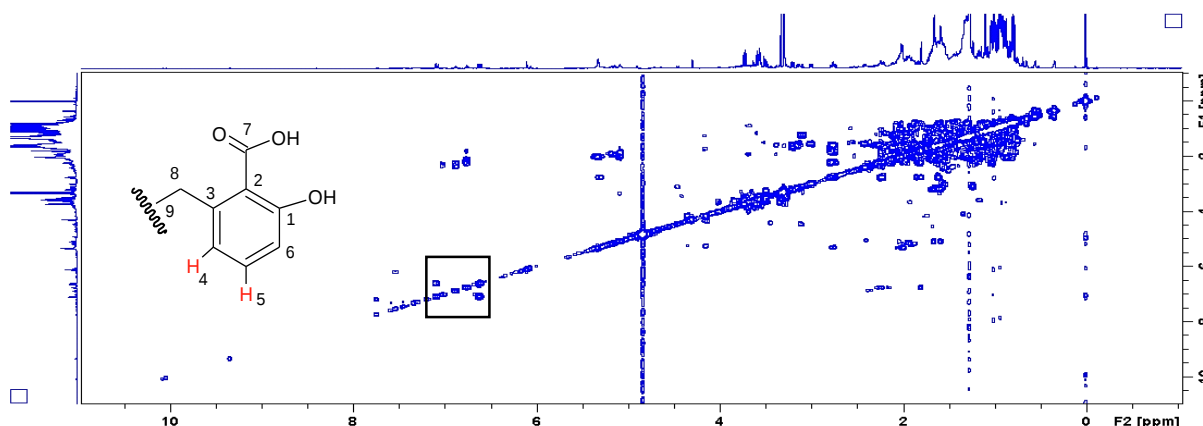
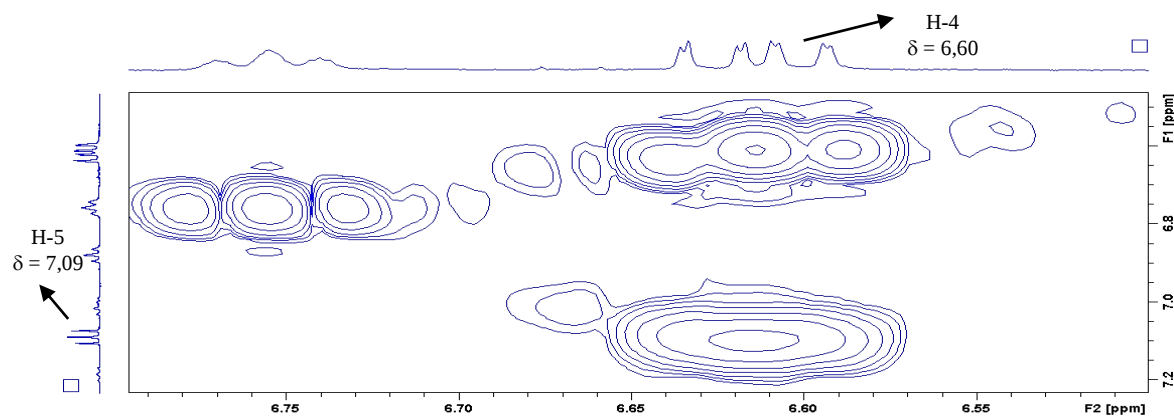


Figura 20 – Estrutura numerada do **ácido anacárdico**.

O deslocamento químico (6,68-6,55 ppm) apresentou quatro dubletos na região dos aromáticos. O sinal escolhido como ponto de partida foi o dubleto em δ 6,60 (d, 7,6 Hz - H-4) que acoplou na posição orto com hidrogênio em δ 7,09 (t, 8,20 Hz - H-5) observado no espectro de COSY (Espectros 1 e 2).

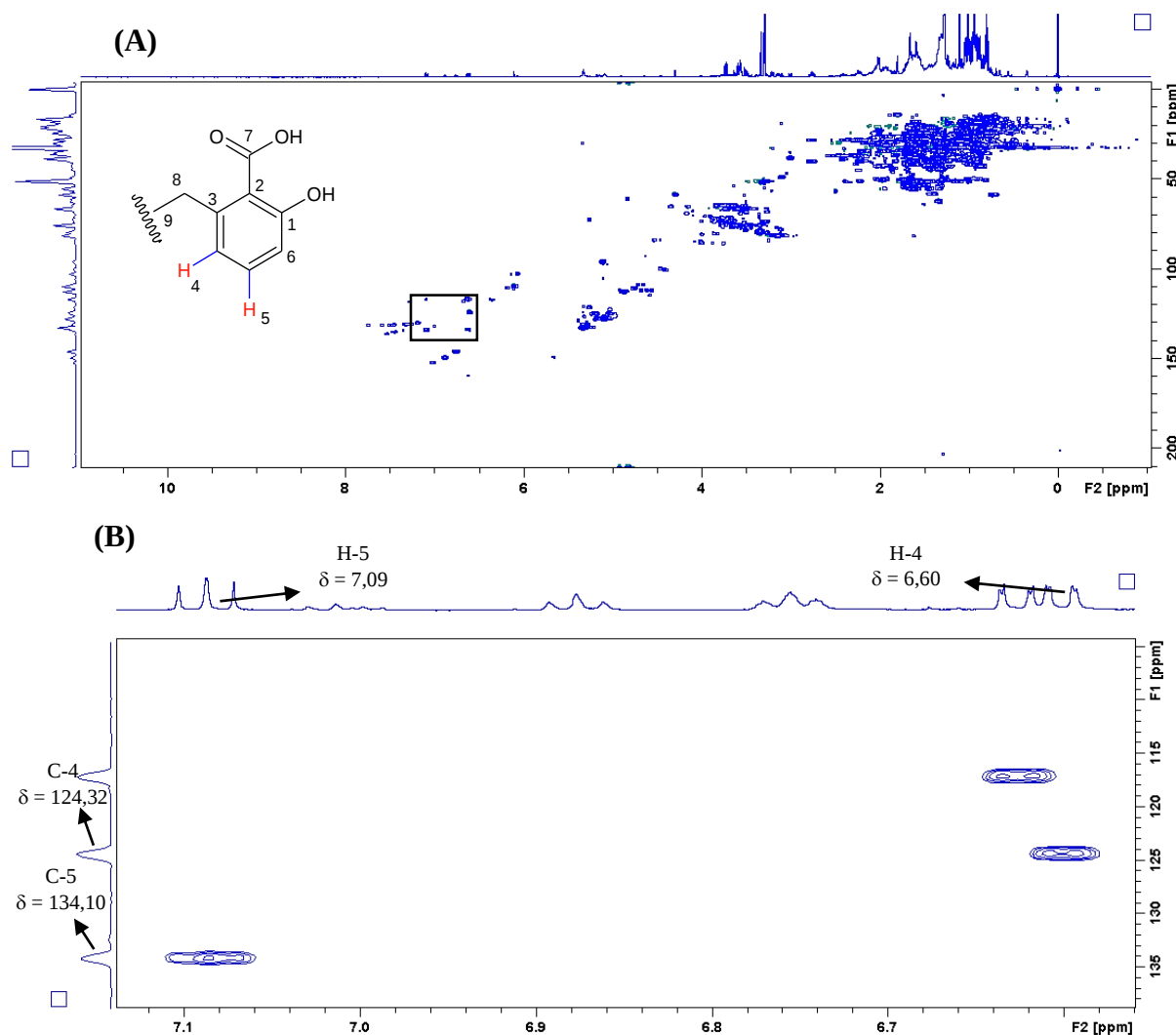


Espectro 1 - Espectro geral de COSY correlação H^1 - H^1 da substância sugerida como ácido anacárdico em CD_3OD (500 MHz).



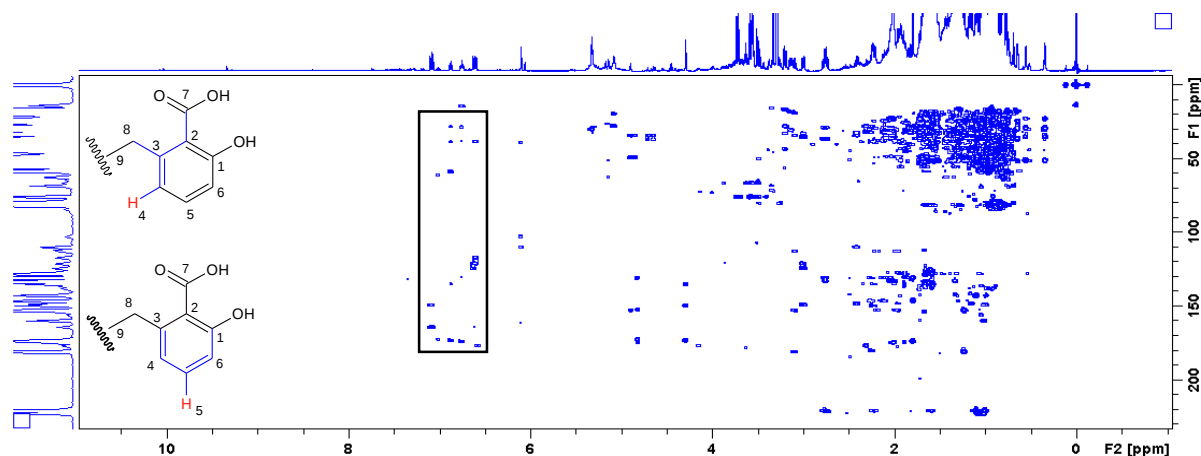
Espectro 2 - Ampliação da correlação H^1-H^1 para o *bucketing* 58 com δ 6,60 (H-4) e δ 7,09 (H-5) referente a substância ácido anacárdico em CD_3OD (500 MHz).

O espectro de HSQC mostra os hidrogênios em δ 6,60 (7,6 Hz - H-4) e δ 7,09 (8,20 Hz - H-5) correlacionado por J_1 com seus respectivos carbonos δ 124,32 (C-4) e δ 134,10 (C-5) conforme espectro (3).

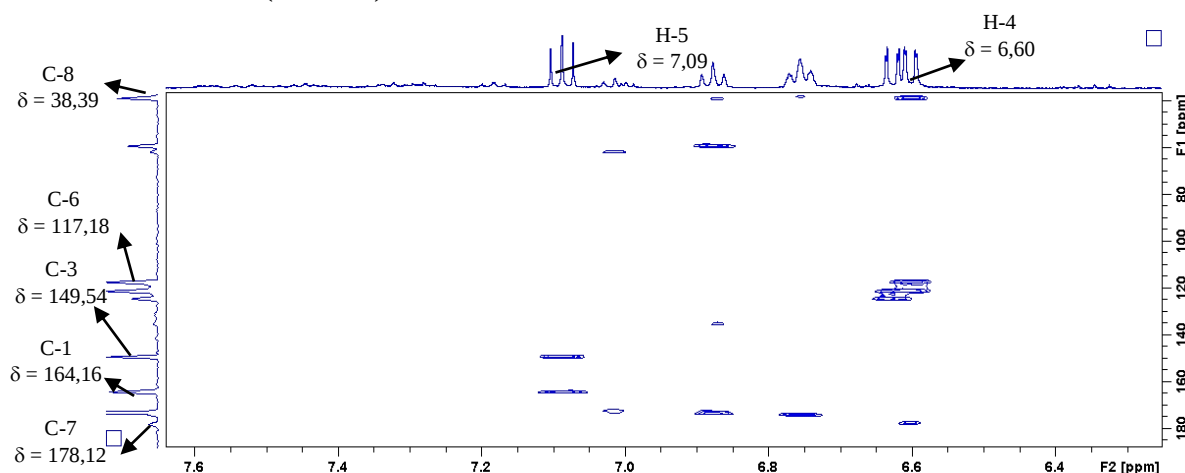


Espectro 3 - (A) Espectro geral de HSQC; (B) Ampliação da correlação de H^1-C^{13} δ 6,60 (H-4) com δ 124,32 (C-4) e δ 7,09 (H-5) com δ 134,10 (C-5), da substância sugerida como ácido anacárdico em CD_3OD (500 MHz).

O hidrogênio com deslocamento químico δ 6,60 (7,6 Hz - H-4) teve correlação por HMBC com os carbonos δ 38,39 (C-8), δ 117,05 (C-6), δ 178,12 (C-7) (Espectro 3) e o hidrogênio em δ 7,09 (7,53 Hz - H-5) apresentou correlação com os carbonos δ 149,54 (C-3) e δ 164,16 (C-1) (Espectro 4 e 4.1, Tabela 11).

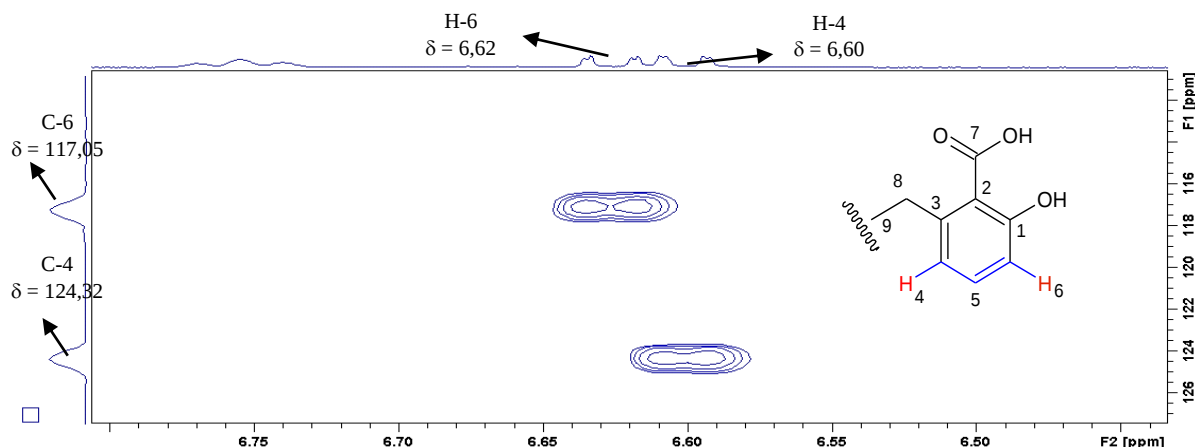


Espectro 4 - Espectro de HMBC correlação $H^1-C^{13}-C^{13}$ do *bucketing* 58, da substância sugerida como ácido anacárdico em CD_3OD (500 MHz).

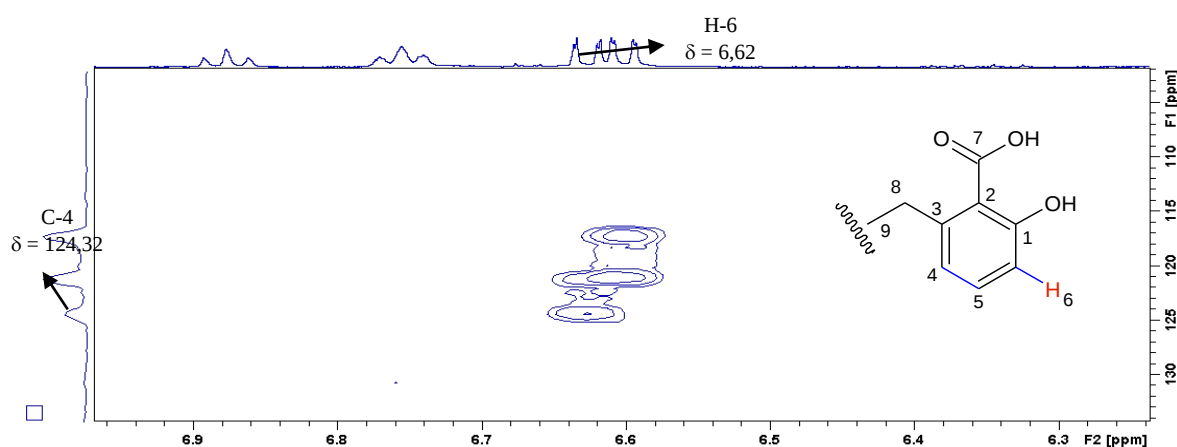


Espectro 4.1 - Ampliação da correlação $H^1-C^{13}-C^{13}$ δ 6,60 (H-4) com δ 38,39 (C-8), δ 117,05 (C-6), δ 178,12 (C-7) e δ 7,09 (H-5) com δ 149,54 (C-3) e δ 164,16 (C-1) do *bucketing* 58, da substância sugerida como ácido anacárdico em CD_3OD (500 MHz).

O hidrogênio aromático δ 6,62 (d, 8,16 Hz -C-6) ligado por J_1 ao carbono δ 117,05 (C-6) por HSQC apresentou o dubleto como multiplicidade (Espectro 5). Este hidrogênio apresentou correlação pelo mapa de contorno HMBC com o carbono δ 124,32 (C-4) que está diretamente ligado ao hidrogênio δ 6,60 (7,6 Hz - H-4), (Espectro 6, Tabela 11).

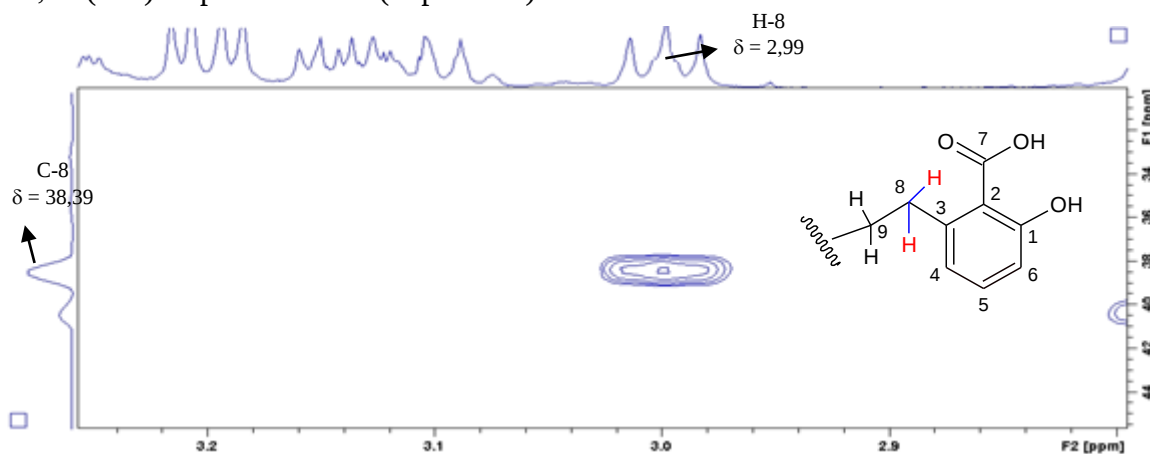


Espectro 5 - Espectro de HSQC, ampliação da correlação H^1-C^{13} δ 6,62 (H-6) com δ 117,18 (C-6) e δ 6,60 (H-4) com δ 124,32 (C-4) do *bucketing* 58, da substância sugerida como ácido anacárdico em CD_3OD (500 MHz).

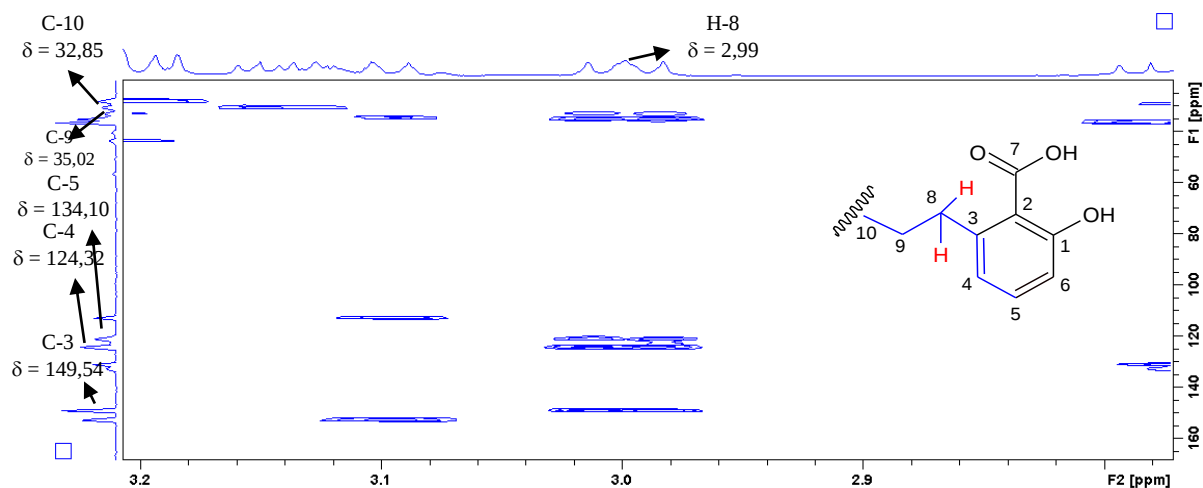


Espectro 6 - Espectro de HMBC, ampliação da correlação H^1-C^{13} δ 6,62 (H-6) com δ 124,32 (C-4), do *bucketing* 58, da substância sugerida como ácido anacárdico em CD_3OD (500 MHz).

O carbono δ 38,39 (C-8) pertencente a cadeia alifática da substância com *bucketing* 58 possui acoplamento direto (J_1) com o hidrogênio δ 2,99 (t, 7,45 - H-8) por HSQC (Espectro 7) e acoplamento com J_2 , J_3 e J_4 com os carbonos δ 32,85 (C-10) δ 35,02 (C-9), δ 124,32 (C-4) e δ 149,54 (C-3) respectivamente (Espectro 8).

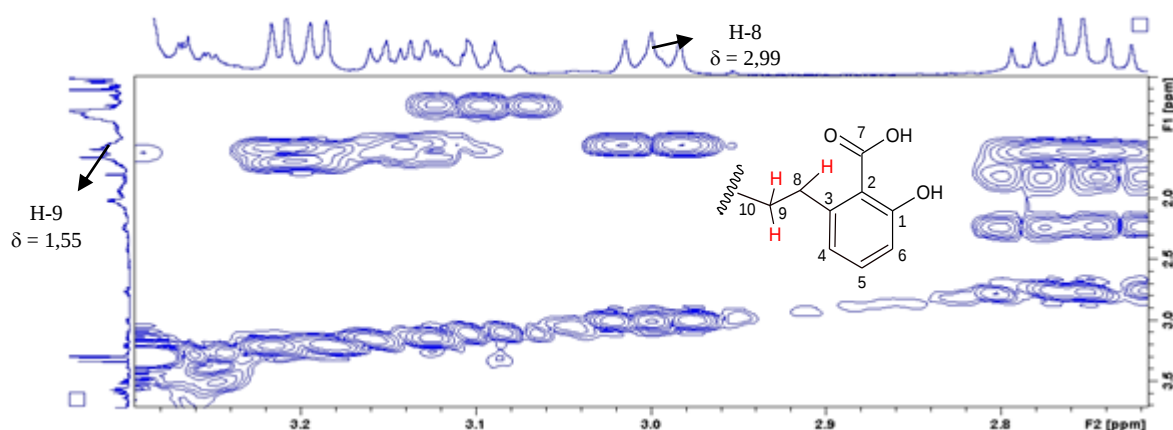


Espectro 7 - Ampliações da correlações por HSQC deslocamentos de δ 38,39 (C-8) com δ 2,99 (H-9).



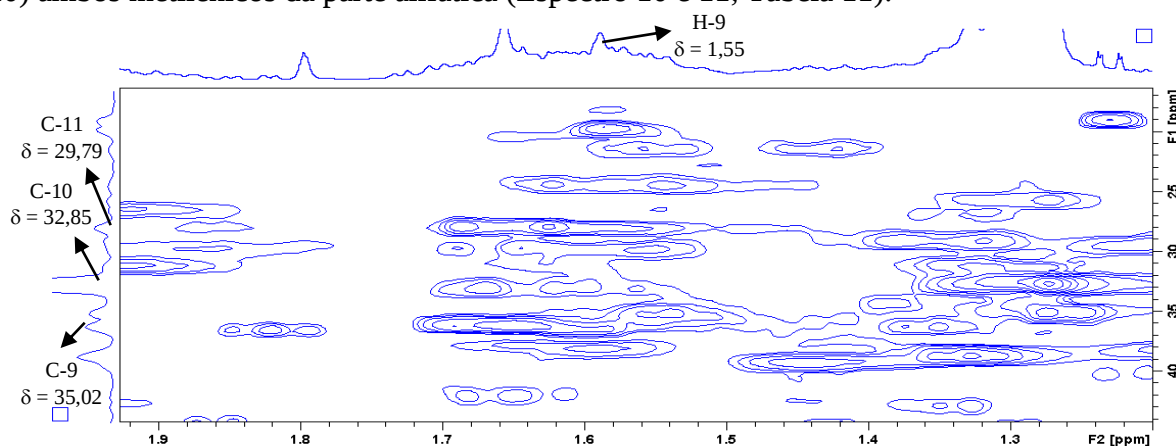
Espectro 8 - Ampliações das correlações de HMBC, deslocamentos de δ 2,99 (H-8) com δ 32,85 (C-10), δ 35,02 (C-9), δ 124,32 (C-4), δ 132,10 (C-5) e δ 149,54 (C-3) da substância ácido anacárdico em CD_3OD (500 MHz).

O hidrogênio δ 2,99 (t, H-8) do carbono δ 38,39 (C-8) apresenta correlação por COSY com o δ 1,55 (m, H-9) do carbono δ 35,02 (C-9) (Espectro 9).

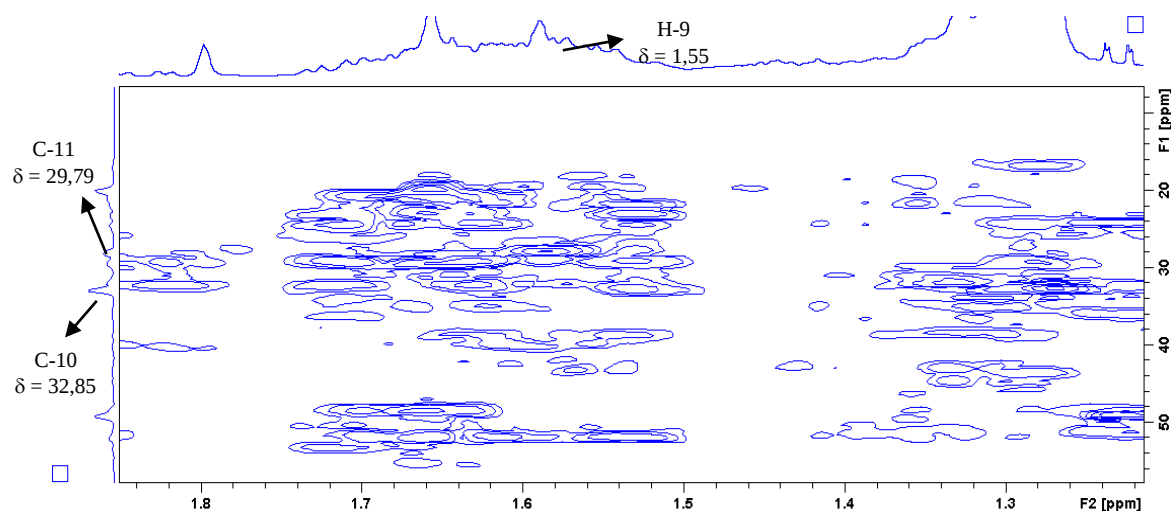


Espectro 9 - Correlação COSY, δ 2,99 (H-8) δ 1,55 (H-9), substância ácido anacárdico em CD_3OD (500 MHz).

O carbono δ 35,02 (C-9) e os (C-9 e C-10) tiveram correlação com o hidrogênio δ 1,55 (H-9), por HSQC e por HMBC (H-8) correlacionou com os carbonos δ 32,85 (C-9) e 29,79 (C-10) ambos metilênicos da parte alifática (Espectro 10 e 11, Tabela 11).

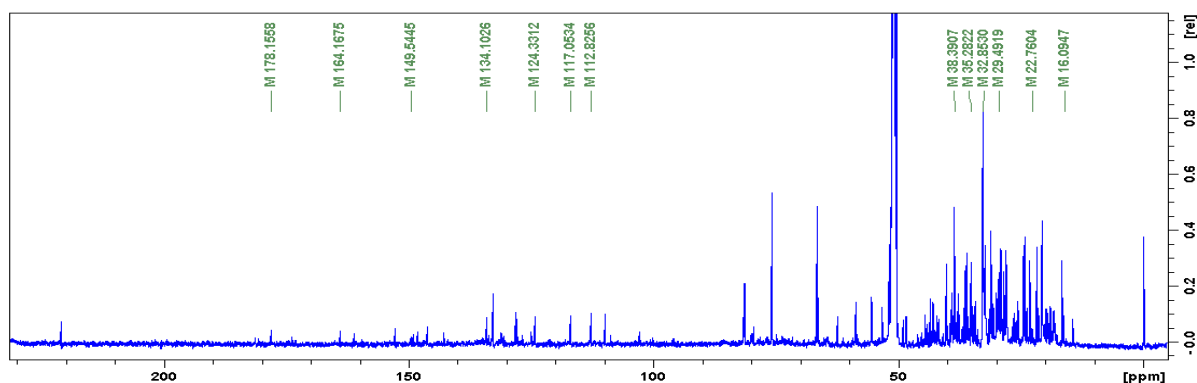


Espectro 10 - Correlações HSQC, carbonos (C-9, C-10 e C-11) com o hidrogênio δ 1,55 (H-9, H-10 e H-11).

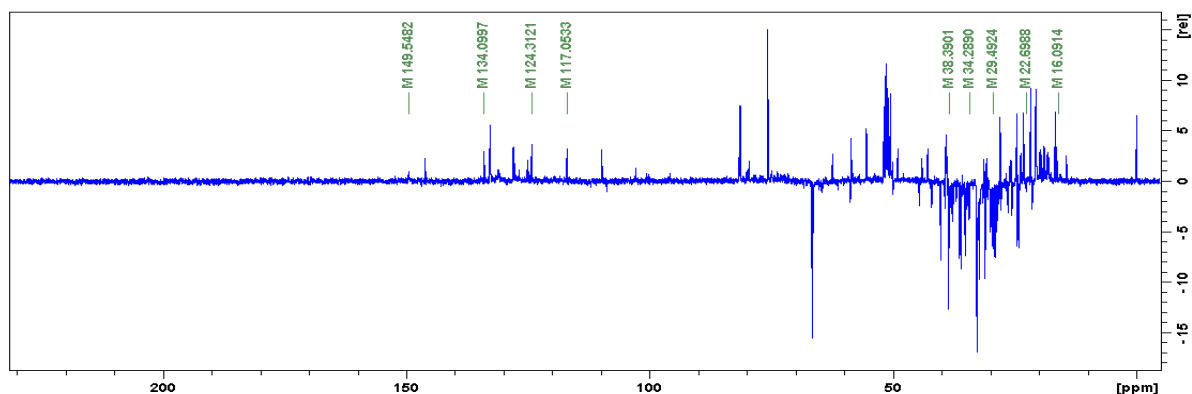


Espectro 11 - Correlações do hidrogênio δ 1,55 (H-9) por HMBC com os carbonos δ 32,85 (C-10) e 29,79 (C-11), do *bucketing* 58 da substância ácido anacárdico em CD_3OD (500 MHz).

Os carbonos (C-8, 9, 10 e 11) que compõem o início da cadeia alifática característica de carbonos metilênicos (CH_2), o carbono sp^2 δ 149,54 (C-3) do anel aromático, o δ 164,16 (C-1) desprotegido por influência de elemento eletronegativo da hidroxila (OH) e o δ 178,12 (C-7) característico de ácido carboxílico (COOH), além dos δ 22,76 (C-21), δ 16,26 (C-22) finais tiveram suas presenças confirmadas nos espectros de C^{13} e Dept135 (Tabela 11).



Espectro 12 - Espectro de C^{13} com os principais deslocamentos dos carbonos do *bucketing* 58 da substância ácido anacárdico em CD_3OD (125 MHz).



Espectro 13 - Espectro de Dept 135, referente aos carbonos do anel aromático início da cadeia alifática do *bucketing* 58 da substância ácido anacárdico em CD_3OD (125 MHz).

A substância encontrada apresentou os principais deslocamentos em ppm característicos de hidrogênios aromáticos 1,2,3-trissubstituído no espectro de RMN H^1 e quatro hidrogênios com δ referentes a carbonos metilênicos. Os dados das principais multiplicidades, correlações e deslocamentos tanto dos hidrogênios como dos carbonos da substância sugerida como ácido anacárdico foram comparados com as informações apresentadas nos estudos de Vieira, 2007 .

Uma amostra do conjunto das que representam a região do Puraquequara foi submetida a análise por LC-MS afim de obter a certificação da presença da substância.

A massa exata da substância caracterizada foi definida por LC-MS e apresentou o erro[ppm]: 0,6 e mSigma: 1,1. O espectro revelou a presença do íon precursor desprotonado m/z : 347.2590 $[M-H]^-$ e como primeiro fragmento ms^2 : 303.2770 $[M-44-H]^-$ referente a perda de CO_2 (Figura 57). A fórmula molecular apresentada para a substância foi $C_{22}H_{36}O_3$. O índice de deficiência de hidrogênio (IDH) calculado igual a 5 que confirmou a presença do anel aromático e 4 ligações duplas (π) corroborando com a estrutura comparada com os dados da literatura dos estudos de Vieira, 2007 e Morais *et al.*, 2017.



Figura 21 –Espectro de Massas (LC-MS), ácido anacárdico m/z : 347, 2590 $[M-H]^-$. (A) MS: 347, 2590; (B) MS^2 : 347,2590 $\rightarrow$ 303,2770.

O máximo de informações foram adquiridas para confirmar que a substância sugerida era o ácido anacárdico. Os principais deslocamentos químicos encontrados de hidrogênios e carbonos referentes ao anel aromático e da cadeia alifática quando comparados a literatura indicavam a presença da substância se aproximando dos valores relatados. Porém, os hidrogênios referentes aos carbonos metilênicos (CH_2) da estrutura não puderam ser atribuídos,

já que a área alifática apresentou um conjunto muito grande de multipletos sinais sobrepostos. As comparações foram realizadas juntos aos dados apresentados no estudo de Vieira, 2007.

Tabela 11 - Principais deslocamentos químicos de H^1 , C^{13} e correlações HMBC obtidos para o ácido anacárdico.

ácido anacárdico (Principais sinais obtidos)*				ácido anacárdico Vieira (2007)**	
Nº	δC^{13}	δH^1 (m, J)	HMBC	δC^{13}	δH^1 (m, J)
C-1	164,16	10,03 (s)	-	163,6	10,88 (s)
C-2	112,81	-	-	110,4	-
C-3	149,54	-	-	147,9	-
C-4	124,32	6,60 (d, 7,66)	6, 7	122,9	6,78 (d, 8,0)
C-5	134,10	7,08 (t, 7,53)	1, 3	135,5	7,38 (t, 7,6)
C-6	117,8	6,62 (d, 8,20)	4	115,9	6,83 (d 8,4)
C-7	178,12	-	-	176,1	-
C-8	38,39	2,99 (t, 7,45)	3, 4, 5, 8, 9	36,5	3,00 (t, 7,5)
C-9	35,02	1,55 (m)	9, 10	32,0	1,60 (m)
C-10	32,85	1,55 (m)	8, 9, 11	31,6	1,3 (m)
C-11	29,5	1,55 (m)	-	29,0	1,3 (m)
C-12	-	-	-	-	1,3 (m)
C-13	-	-	-	-	1,3 (m)
C-14	-	-	-	-	1,3 (m)
C-15	-	-	-	-	1,3 (m)
C-16	-	-	-	-	1,3 (m)
C-17	-	-	-	-	1,3 (m)
C-18	-	-	-	-	1,3 (m)
C-19	-	-	-	-	1,3 (m)
C-20	-	-	-	-	1,3 (m)
C-21	22,76	1,55 (m)	22	22,0	1,3 (m)
C-22	16,09	0,88 (t)	21	14,1	0,85 (t, 6,5)

*RMN de C^{13} e H^1 : ácido anacárdico em equipamento de 125 MHz e 500 MHz com CD_3OD .

** RMN de C^{13} e H^1 : ácido anacárdico em equipamento de 75 MHz e 300 MHz com $CDCl_3$.

A substância caracterizada como ácido anacárdico já havia sido identificada com a técnica de RMN H^1 e C^{13} em extratos etanólicos de própolis da espécie de abelha *Apis mellifera* da cidade de Teresina-PI. O estudo também realizou testes contra bactérias gram-negativas e positivas e atestou ser eficazes contra a ação das mesmas (SILVA *et al.*, 2008). Em outro estudo realizado com ácidos anacárdicos encontrado diretamente em castanhas de caju, revelou que os mesmos possuem atividade antioxidante preventiva (KUBO *et al.*, 2006).

A literatura aponta possíveis evidências da substância por ESI-EM em extratos etanólicos de própolis em dois exemplares da Ásia, duas da Índia e um possível derivado insaturado do ácido anacárdico como marcador no extrato de própolis de abelha sem ferrão da espécie *Tetragonisca angustula* (SAWAYA *et al.*, 2010).

Estudos realizados com extrato etanólicos (70%) obtidos por maceração da geoprópolis de *M. fasciculata* Smith da cidade de Palmeirândia – MA, indicaram por análise por CG-EM a presença da substância ácido anacárdico (ARAUJO *et al.*, 2015).

As substâncias derivadas dos ácidos anacárdicos já descritas na literatura indicam que as plantas da família Anacardiaceae são possíveis fontes polínicas para a composição das resinas das própolis das abelhas. Estudos indicam que os ácidos anacárdicos fazem parte do metabolismo secundários das plantas desta família (CORREIA; DAVID; DAVID, 2006).

A evidência justifica a presença do ácido anacárdico na composição química do extrato da geoprópolis de *M. seminigra*, uma vez que a espécie visita plantas da família Anacardiaceae, em especial o cajueiro. Em estudos realizados com material polínico coletado por *M. seminigra* da cidade de Manaus – AM indicaram a presença de pólen de cajueiro oriundo da visita durante o mês de setembro (ABSY; BEZERRA; KERR, 1980; FERREIRA; ABSY, 2017). Recentes estudos com material polínico da colmeia dessa abelha da região de Manaus (AM), indicaram uma frequência mensal de 6,45% de visita as plantas dessa família para coleta de material polínico como fonte alimentícia (OLIVEIRA; ABSY; MIRANDA, 2009). A informação corroborou com o dado apresentado no quadro (1) (pág. 10) do presente trabalho, a respeito da visita de plantas da família Anacardiaceae e os dados químicos de Vieira (2007) e Moraes *et al.* (2017) complementaram para a presença do ácido anacárdico.

5.4.2. Caracterização SUBST – 2 *bucketings* 51 e 68, deslocamentos (7,19-7,10 ppm) e (5,93-5,79 ppm).

A segunda substância foi caracterizada como sendo a **aromadendrina** (m/z : 287, 0548). Os sinais de H^1 eram pertencentes ao grupo de *bucketings* 51 e 68 de maiores pesos que foram responsáveis pela separação do grupo IV (Inpa) na análise de PCA (*loadings*).

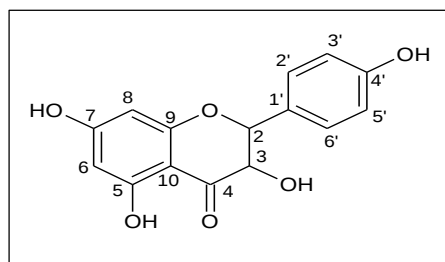
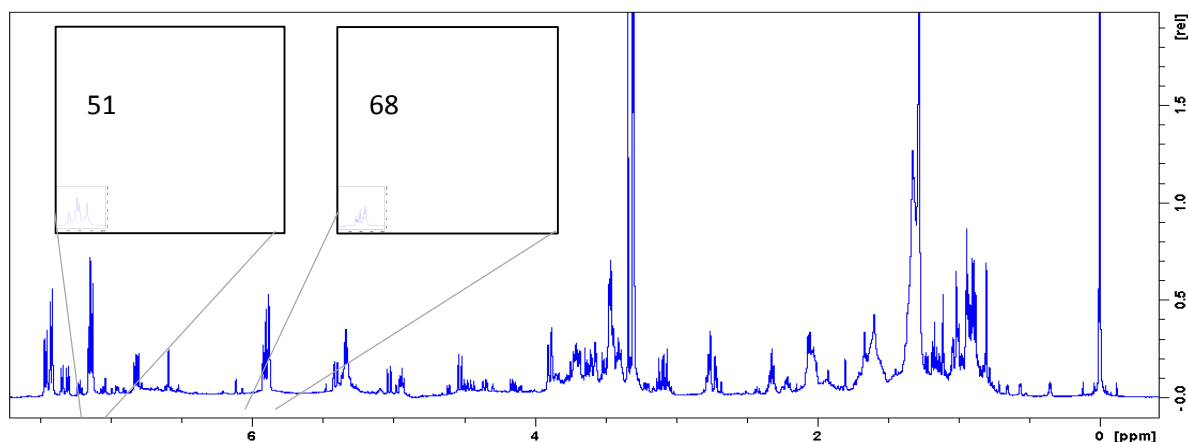


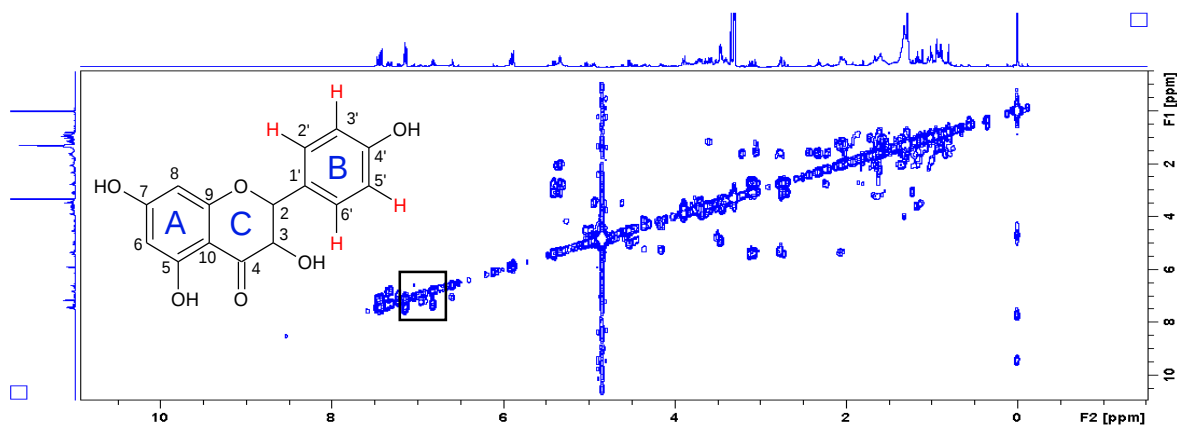
Figura 22 – Estrutura numerada da **aromadendrina**.

Os *bucketings* 51 e 68 possuem valores de deslocamento químico em (7,19-7,10 ppm) referentes a dubletos e (5,93-5,79 ppm) referentes a um grupo hidrogênios aromáticos, ambos os deslocamentos característicos de anéis de flavonoides (Espectro 14, Tabela 12).

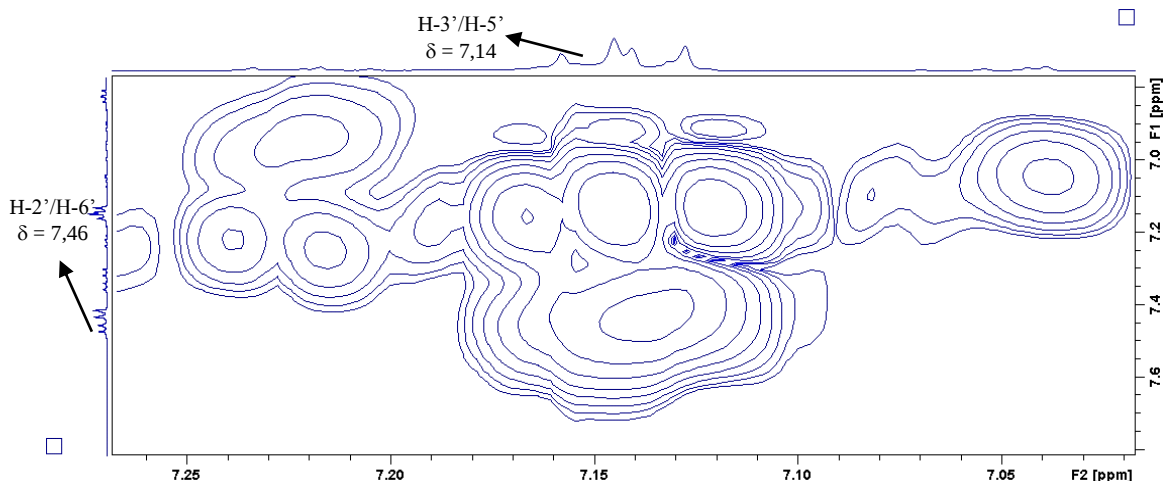


Espectro 14 - Espectro da região do Inpa com os *bucketings* 51 (7,19-7,10 ppm) e 68 (5,93-5,79 ppm).

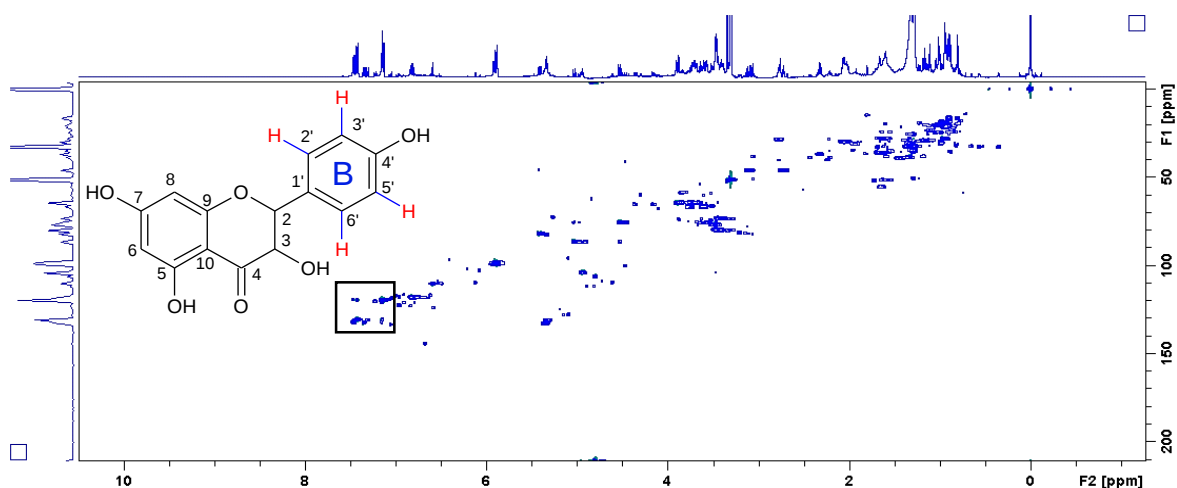
O dubleto inicial para a caracterização da substância foi o do *bucketing* 51 no deslocamento químico em δ 7,14 (2H, 8,5 Hz, H-3'/H5'), referente ao hidrogênio aromático anel (B) que por COSY, acoplou em orto com o dubleto de hidrogênio em δ 7,46 (2H, 8,5 Hz, H-2'/H-6') ambos com J peculiar de anel 1,4-dissubstituído mono oxigenado (Espectro 14 e 15.1, Tabela 24). No HSQC foi possível determinar o J_1 de seus carbonos δ 119,49 (C-3') e δ 132,11 (C-2') respectivamente (Espectro 16 e 16.1, Tabela 12).



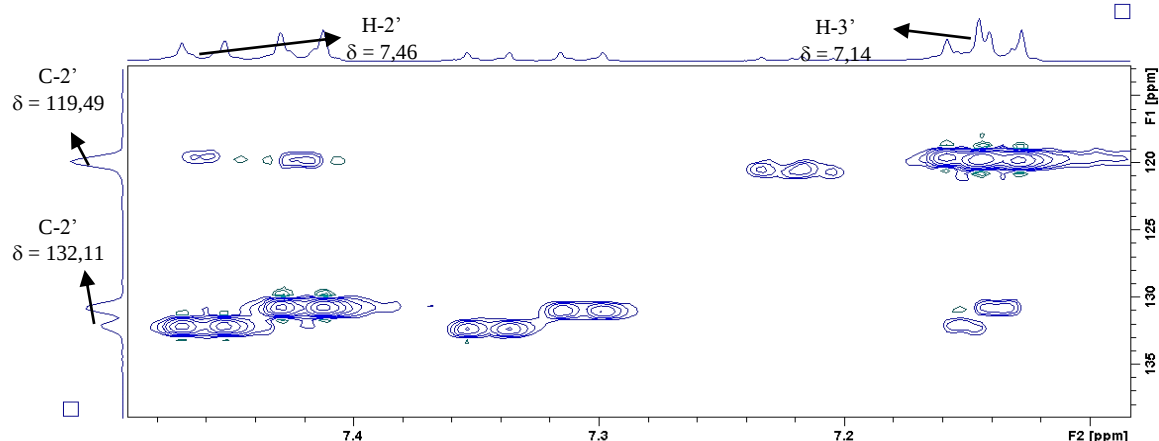
Espectro 15 - Espectro de COSY, região da correlação δ 7,14 (H-3'/H-5') com δ 7,46 (H-2'/H-6') do *bucketing* 51, substância sugerida como aromadendrina em CD₃OD (500 MHz).



Espectro 15.1 - Ampliação da correlação δ 7,14 (H-3'/H-5') com δ 7,46 (H-2'/H-6') por COSY referente ao *bucketing* 51, substância aromadendrina em CD₃OD (500 MHz).

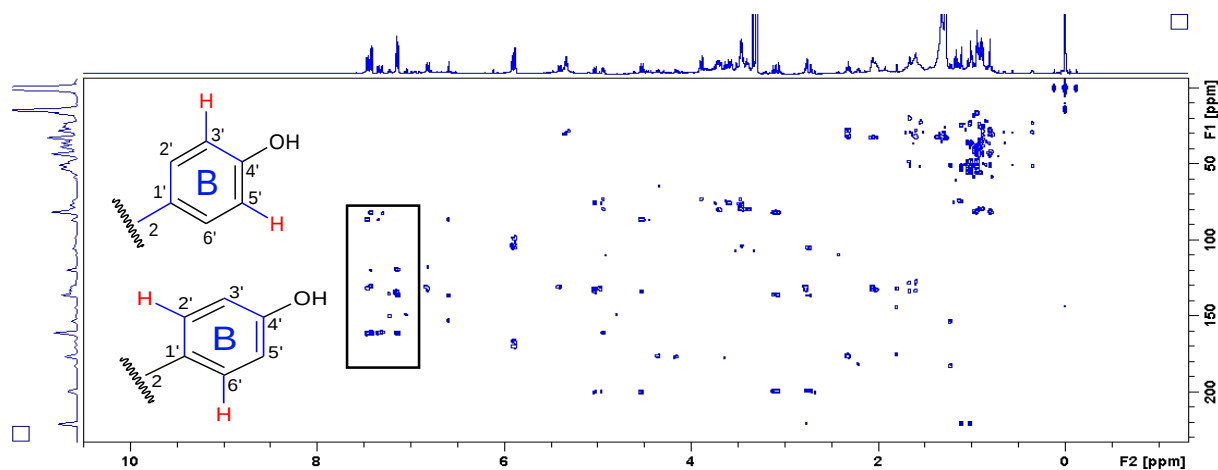


Espectro 16 - Espectro de HSQC, região da correlação δ 7,46 (H-2') com δ 132,11 (C-2') e δ 7,14 (H-3') com δ 119,49 (C-3') do *bucketing* 51, substância aromadendrina em CD₃OD (500 MHz).

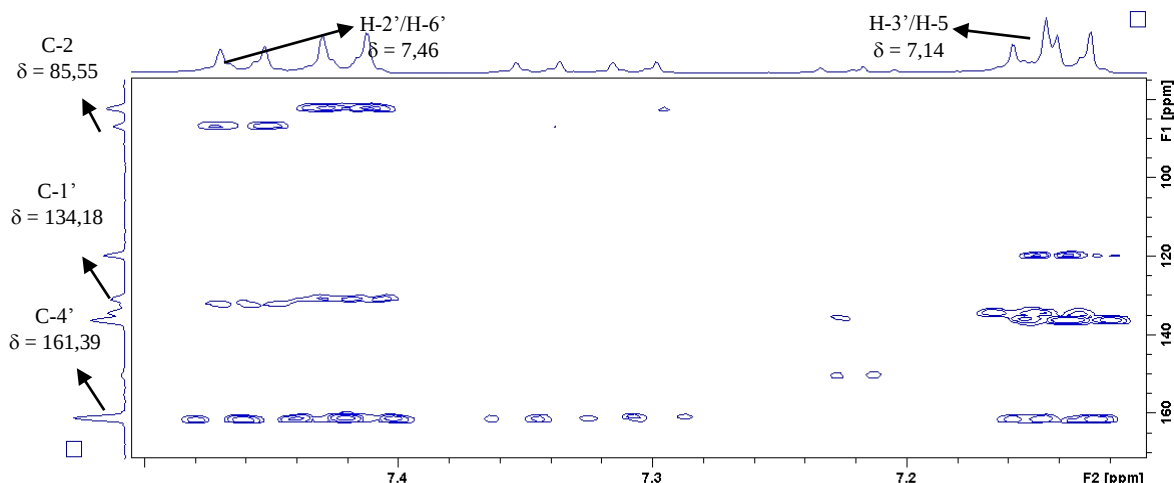


Espectro 16.1 - Ampliação da correlação δ 7,46 (H-2') com δ 132,11 (C-2') e δ 7,14 (H-3') com δ 119,49 (C-3') do *bucketing* 51, substância sugerida como aromadendrina em CD_3OD (500 MHz).

O hidrogênio δ 7,14 (H-3') apresentou correlação J_2 , J_3 e J_4 por HMBC com os carbonos δ 161,39 (C-4') ligado a um elemento eletronegativo e característico do anel B, o δ 134,18 (C-1') e o δ 86,56 (C-2) característico de anel C. Já o δ 7,46 (H-2') também por HMBC exibiu correlação J_2 e J_3 com os carbonos δ 134,18 (C-1') característico da ligação entre os anéis BC e δ 161,39 (C-4') mais desprotegido, ambos metilênicos (Espectro 17 e 17.1, Tabela 12).

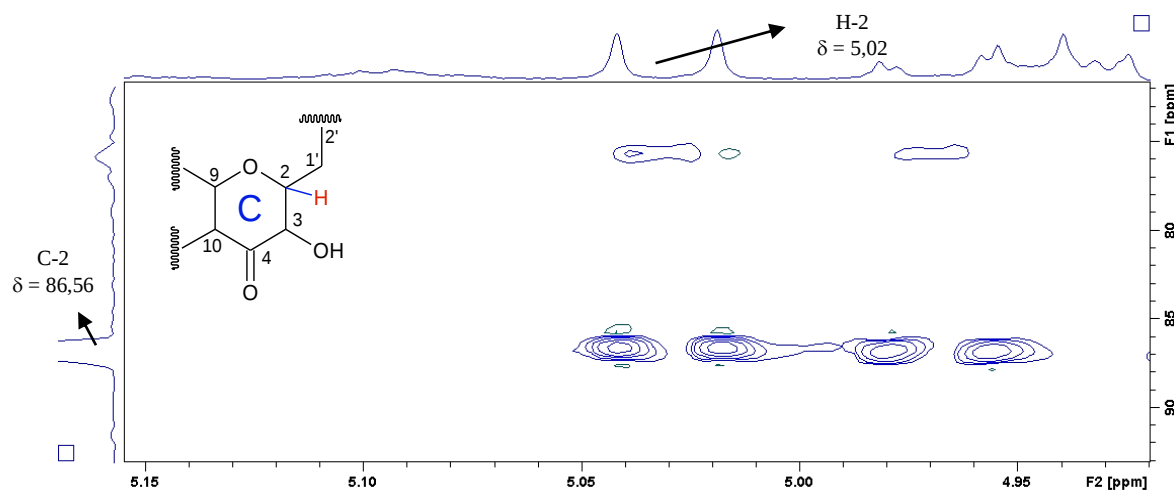


Espectro 17 - Espectro de HMBC, região da correlação δ 7,46 (H-2'/H6') e δ 7,14 (H-3'/H5) correlacionando com carbonos referente ao do *bucketing* 51, substância aromadendrina em CD_3OD (500 MHz).

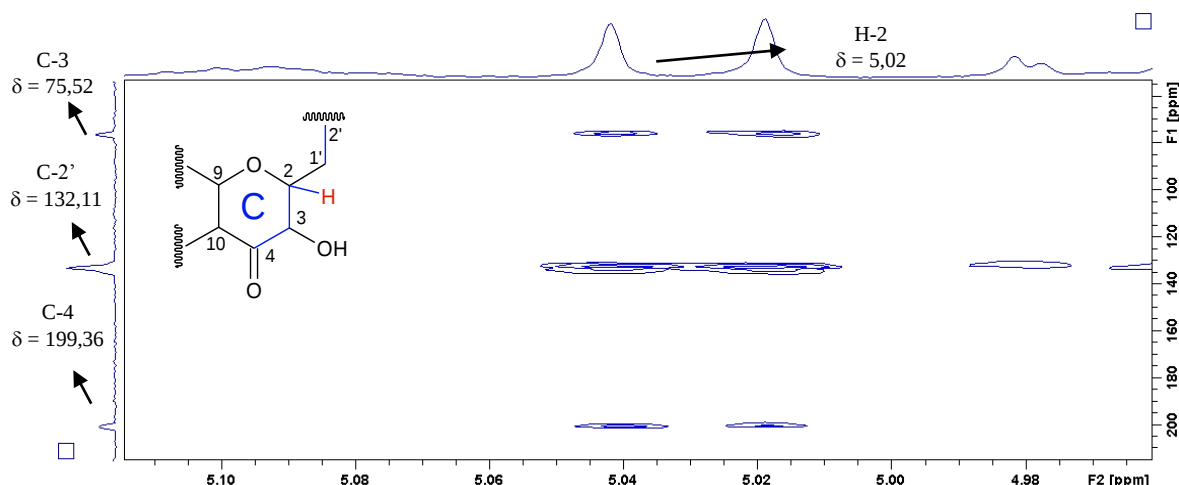


Espectro 17.1 - Ampliação da correlação δ 7,46 (H-2') com δ 134,18 (C-1'), δ 161,39 (C-4') e δ 7,14 (H-3'), δ 161,39 (C-4') com δ 85,55 (C-2) no espectro de HMBC, da substância aromadendrina presente no *bucketing* 51 por J₂, J₃ e J₄ em CD₃OD (500 MHz).

O carbono δ 85,55 (C-2) apresentou correlação direta (J₁) por HSQC com dubleto referente ao hidrogênio com δ 5,02 (11,6 Hz, H-2) (Espectro 18, Tabela 12). A análise do espectro de HMBC o hidrogênio metínico δ 5,02 (H-2) apresentou correlação J₁ com o carbono δ 75,52 (C-3), J₂ no δ 132,11 (C-2') e J₃ com o do δ 199,36 (C-4) característico de carbono carbonílico presente no anel C de um flavonoide (Espectro 19, Tabela 12).

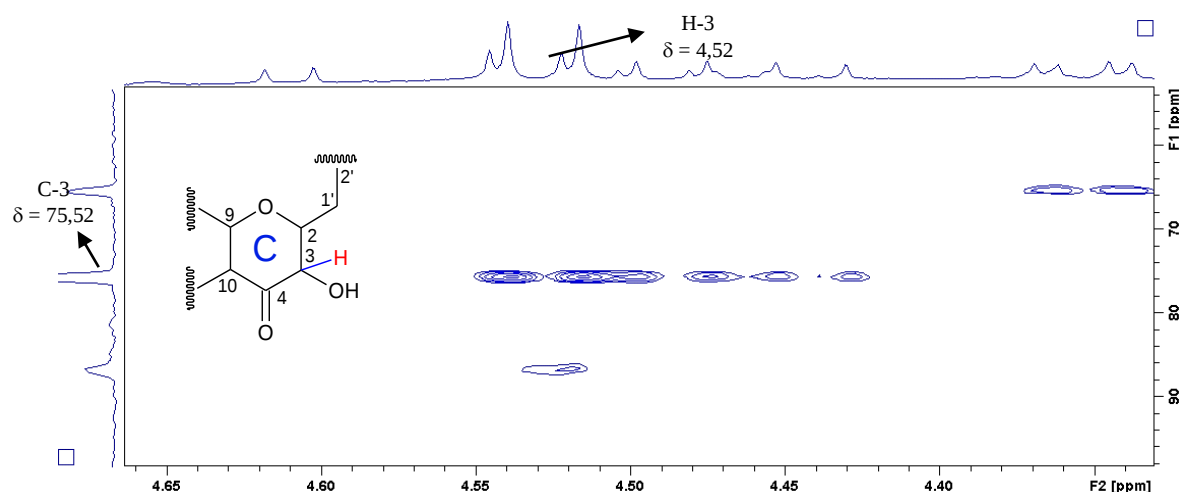


Espectro 18 - Ampliação da correlação J₁ do hidrogênio δ 5,02 (H-2) com o carbono δ 86,56 (C-2) no espectro de HSQC substância aromadendrina em CD₃OD (500 MHz).

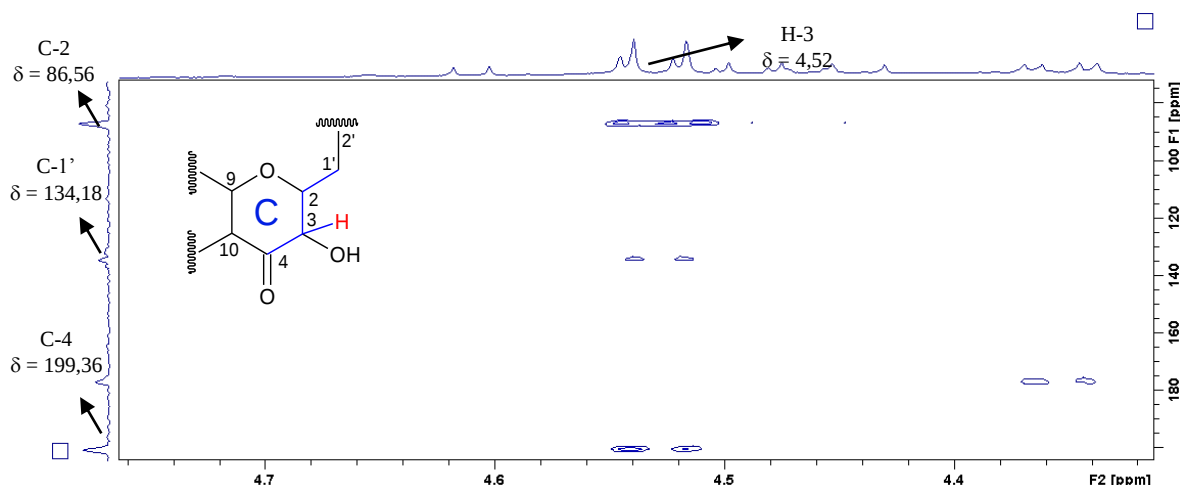


Espectro 19 - Ampliação da correlação J_1 , J_2 e J_3 do hidrogênio $\delta 5,02$ (H-2) com os carbonos $\delta 75,52$ (C-3), $\delta 132,11$ (C-2') e $\delta 199,36$ (C-4) no espectro de HMBC da substância aromadendrina em CD_3OD (500 MHz).

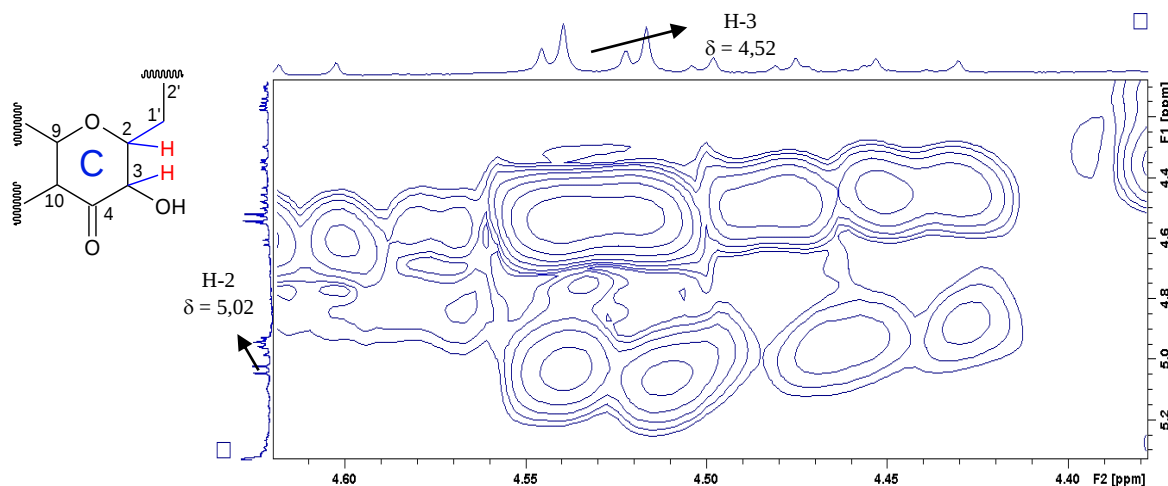
O carbono $\delta 75,52$ (C-3) pelo espectro de HSQC apresentou correlação direta com o hidrogênio $\delta 4,52$ (d, 11,6 Hz, H-3) (Espectro 20, Tabela 12). O hidrogênio $\delta 4,52$ (H-3) revelou também por HMBC correlação forte com os carbonos de $\delta 86,56$ (C-2), $\delta 134,18$ (C-1') e $\delta 199,36$ (C-4) (Espectro 21, Tabela 12). Este ainda apresentou acoplamento com hidrogênio $\delta 5,02$ (H-2) pelo espectro de COSY, ambos com constante alta $J = 11,6$ Hz característica de hidrogênios na posição anti (Espectro 22, Tabela 12).



Espectro 20 - Ampliação da correlação no espectro de HSQC do hidrogênio $\delta 4,52$ (H-3) com o carbono $\delta 75,52$ (C-3) da substância aromadendrina em CD_3OD (500 MHz).

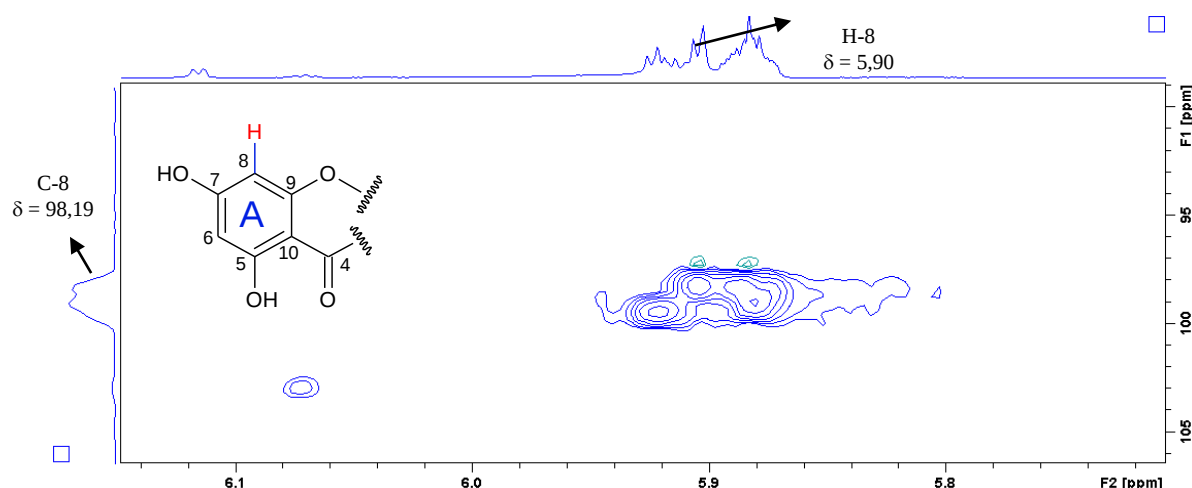


Espectro 21 - Ampliação da correlação no espectro de HMBC do hidrogênio δ 4,52 (H-3) com o carbono δ 86,56 (C-2), δ 134,18 (C-1') e δ 199,36 (C-4) da substância aromadendrina em CD_3OD (500 MHz).



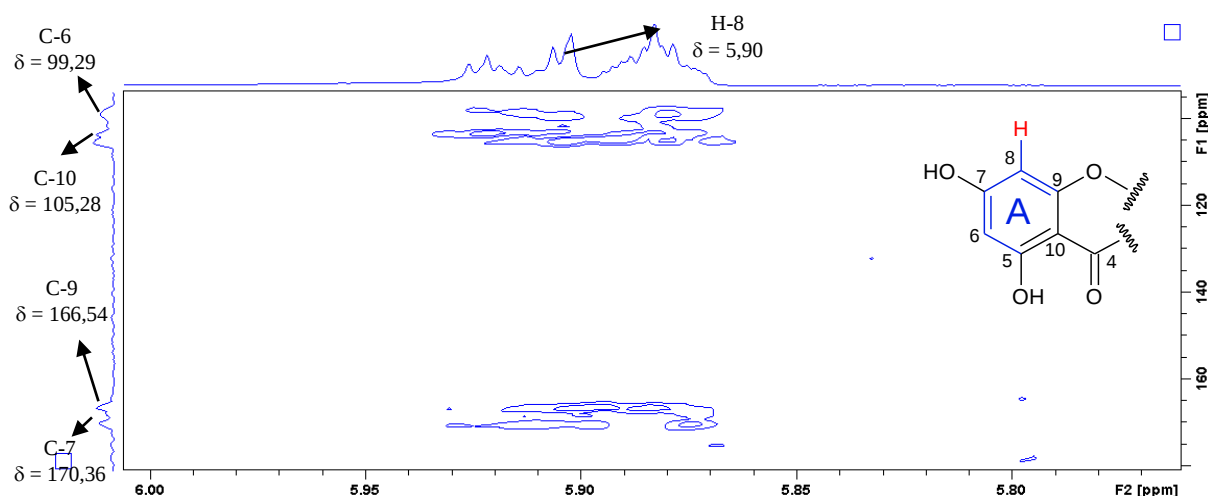
Espectro 22 - Ampliação da correlação no espectro de COSY do hidrogênio δ 4,52 (H-3) com hidrogênio δ 5,02 (H-2) da substância aromadendrina em CD_3OD (500 MHz).

Os valores de deslocamentos químicos do *bucketing* 51 forneceram informações estruturais (anéis aromáticos B e C) para compor o esqueleto de um flavonoide. Porém para a obtenção do possível anel A foi analisado deslocamento químico referente ao *bucketing* 68 (5,93-5,79 ppm). O conjunto de sinais de hidrogênio presentes no intervalo deste deslocamento do *bucketing* 68 foi definido o dubleto em δ 5,90 (2,13 Hz, H-8), acoplando com outro hidrogênio na posição meta. A análise por HSQC revelou seu carbono em δ 98,19 (C-8) (Espectro 23, Tabela 12).



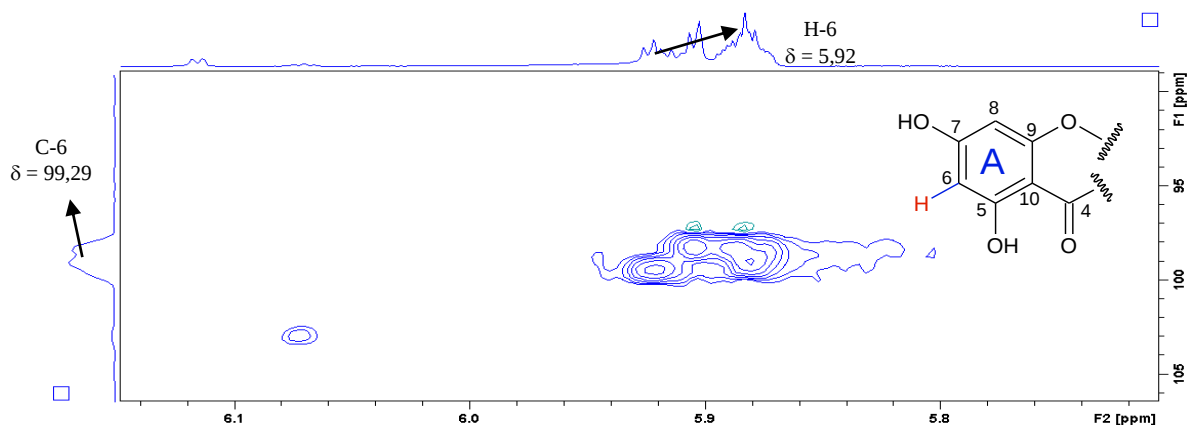
Espectro 23 - Ampliação da correlação no espectro de HSQC do hidrogênio δ 5,90 (H-8) com carbono δ 98,19 (C-8) do *bucketing* **68**, substância aromadendrina em CD_3OD (500 MHz).

As correlações J_2 e J_3 do hidrogênio meta δ 5,90 (H-8) com os carbonos δ 99,29 (C-6), δ 105,28 (C-5), δ 166,54 (C-9) e δ 170,36 (C-7) pelo espectro de HMBC (Espectro 24, Tabela 12) revelaram uma parte do anel A da substância flavonoídica.

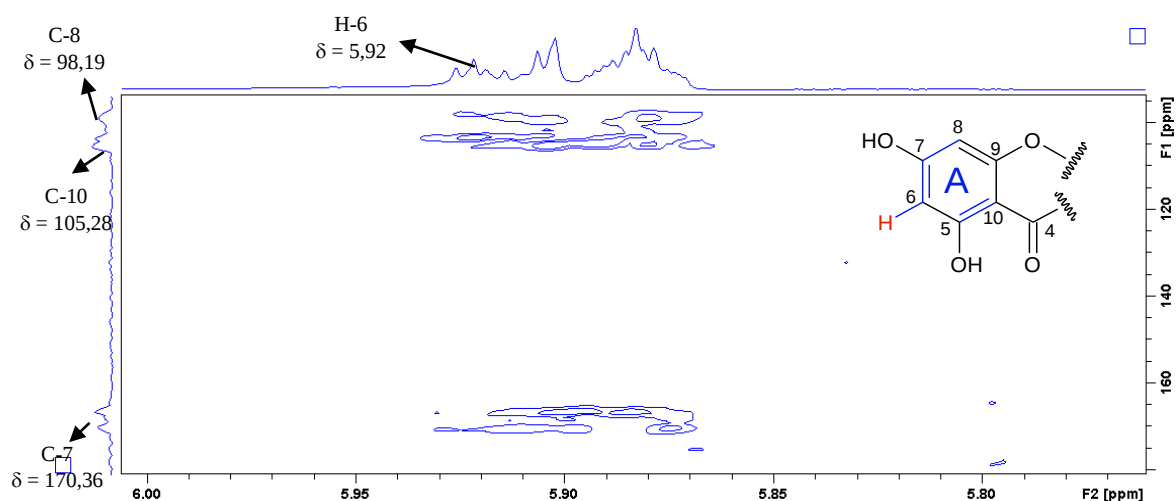


Espectro 24 - Ampliação da correlação no espectro de HMBC do hidrogênio δ 5,90 (H-8) com os carbonos (C-5, C-6, C-7 e C-9) do *bucketing* **68**, substância aromadendrina em CD_3OD (500 MHz).

O carbono δ 99,29 (C-6) identificado foi explorado por HSQC e revelou J_1 com o duplete de hidrogênio δ 5,92 (2,13 Hz, C-6) e a sua constante revelou acoplamento na posição meta, sugerindo ser o par do hidrogênio δ 5,90 (2,13 Hz, C-8). O acoplamento sugere que sejam hidrogênios presentes no anel (A) de flavonoides com substituições nos carbonos em 5 e 7 de flavonoides de característica 5,7-diidroxí. (Espectro 25, Tabela 12). Analisando o (H-6) foi possível por HMBC estabelecer as correlações J_2 δ 98,19 (C-8), δ 105,28 (C-5), δ 170,36 (C-7) (Espectro 26, Tabela 12).

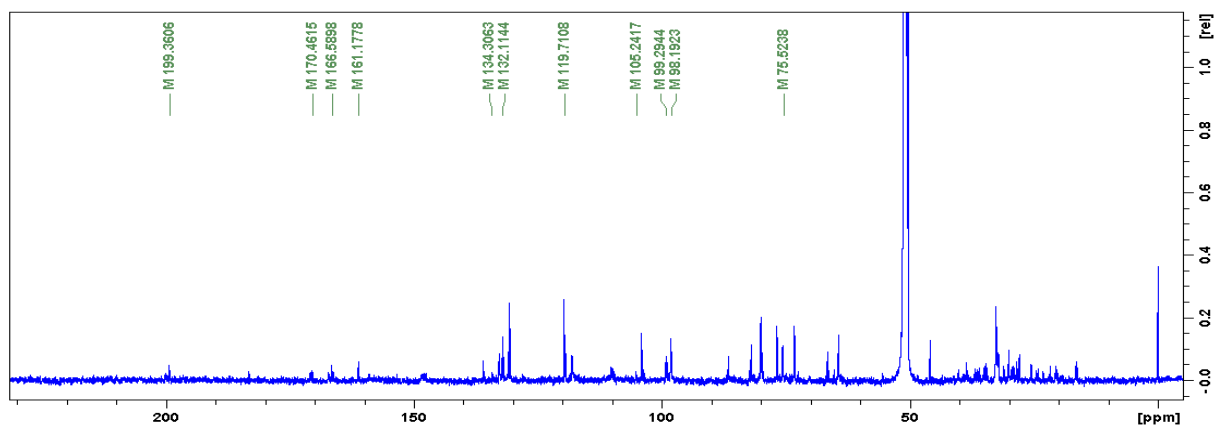


Espectro 25 - Ampliação da correlação no espectro de HSQC do hidrogênio δ 5,92 (H-6) com carbono δ 99,29 (C-6) do *bucketing* **68**, substância aromadendrina em CD_3OD (500 MHz).

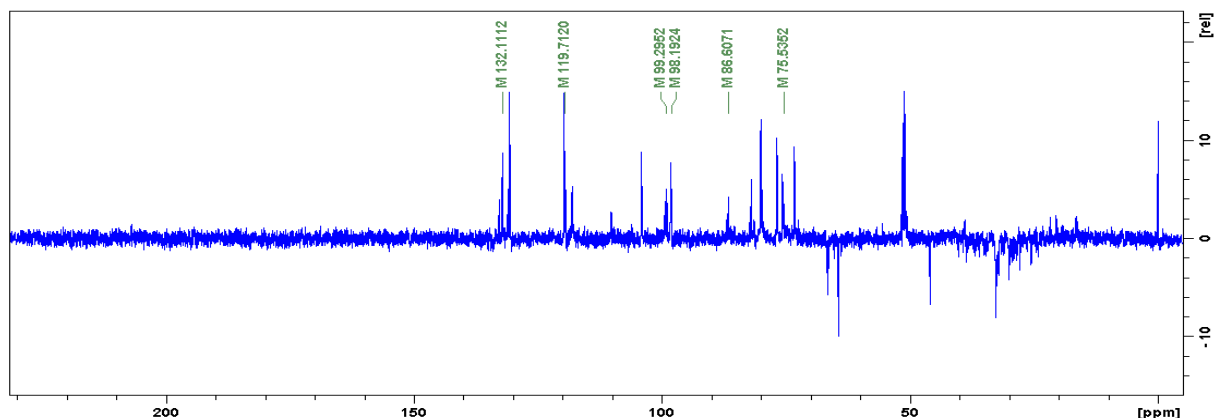


Espectro 26 - Ampliação da correlação no espectro de HMBC do hidrogênio δ 5,92 (H-6) com os carbonos (C-7, C-9 e C-10) do *bucketing* **68**, substância aromadendrina em CD_3OD (500 MHz).

Os dados de carbono foram explorados por espectros unidimensionais de C^{13} e Dept135 afim de obter a comprovação das informações encontradas para os carbonos hidroxilado e carbonila (Espectro 27 e 28, Tabela 12).



Espectro 27 - Espectro de C^{13} com os principais deslocamentos dos carbonos do sistema ABX da substância aromadendrina referente aos *bucketings* **51** e **68** em CD_3OD (125 MHz).



Espectro 28 - Espectro de Dept 135, referente aos carbonos da substância aromadendrina com os *bucketings* 51 e 68 em CD₃OD (125 MHz).

Os dados através dos experimentos de H^1 e C^{13} uni e bidimensionais forneceram informações que foram comparadas aos dados encontrados nos estudos de Almeida *et al.*, (2005), e organizadas na tabela (12). As comparações foram importantes para confirmar as correlações a respeito do possível flavonoide definido junto a literatura como aromadendrina.

Além dos dados espectroscópicos, uma representante das amostras do Inpa foi analisada por LC-MS para confirmar a presença do possível flavonoide.

O espectro revelou a massa exata de m/z : 287,0548 e fórmula química $C_{15}H_{11}O_3$, com erro[ppm]: 4.7 e mSigma: 3.3. O perfil de fragmentação do íon precursor ainda apresentou por ms^2 os íons m/z : 259,0579 $[M-CO-H]^-$, além dos m/z : 177,0575, 151,0050 e 125,0266 referentes as fragmentações dos anéis do flavonoide (Figura 23) mas também observado nos dados de fragmentação por EM (Figura 43, página 123).

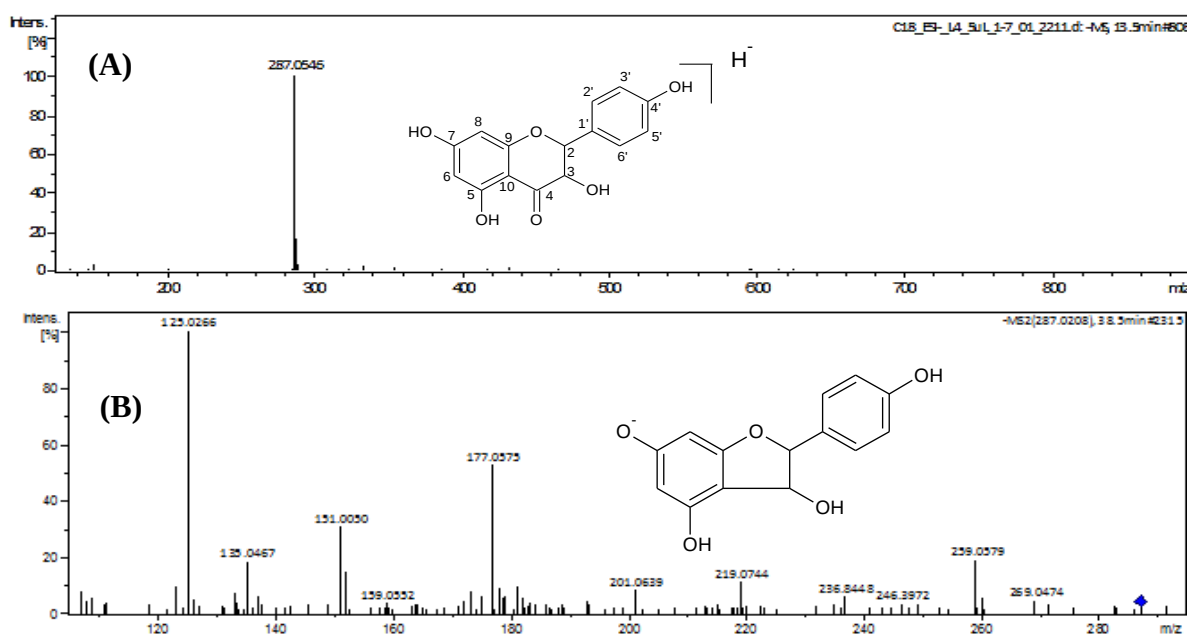


Figura 23 - Espectro de Massas (LC-MS), aromadendrina m/z : 287,0548 $[M-H]^-$. (A) MS: 287,0545; (B) MS²: 287,0545 → 259,0579, 177,0575, 151,0050 e 125,0266.

O IDH para a substância foi calculado pela fórmula molécula com o hidrogênio $C_{15}H_{12}O_3$, apresentando o resultado de 10 insaturações, o que confirmou a presença de três anéis (do sistema ABC) e 7 ligações do tipo π referente as seis duplas ligações dos anéis aromáticos e uma ligação referente ao carbono (C-4) grupo carbonila do anel C corroborando para a presença da substância aromadendrina.

Tabela 12 - Principais deslocamentos químicos de H^1 , C^{13} e correlação de HMBC obtidos para a aromadendrina.
aromadendrina (Principais sinais obtidos)* **aromadendrina De Almeida *et al.* (2005)****

Nº	δC^{13}	δH^1 (m, J)	HMBC	δC^{13}	δH^1 (m, J)
C-1'	134,18	-	-	129,6	-
C-2'	132,11	7,46 (d, 8,5)	2, 4'	130,7	6,83 (d, 8,5)
C-3'	119,49	7,14 (d, 8,5)	1', 4'	116,5	7,35 (d, 8,5)
C-4'	161,39	-	-	159,5	-
C-5'	119,49	7,14 (d, 8,7)	1', 4'	116,5	7,35 (d, 8,5)
C-6'	132,11	7,46 (d, 8,7)	2, 4'	130,7	6,83 (d, 8,5)
C-2	86,56	5,02 (d, 11,6)	2', 3, 4	85,3	5,28 (d, 11,6)
C-3	75,52	4,52 (d, 11,6)	1', 2, 4	74,0	4,73 (d, 11,6)
C-4	199,36	-	-	198,8	-
C-5	-	-	-	165,6	-
C-6	99,29	5,92 (d, 2,10)	7, 8, 10	97,7	5,89 (d, 2,10)
C-7	170,46	-	-	169,1	-
C-8	98,19	5,90 (d, 2,10)	6, 7, 9, 10	96,7	5,93 (d, 2,10)
C-9	166,54	-	-	164,9	-
C-10	105,28	-	-	102,2	-

*RMN de C^{13} e H^1 : aromadendrina em equipamento de 125 MHz e 500 MHz com CD_3OD .

** RMN de C^{13} e H^1 : aromadendrina em equipamento de 75 MHz e 300 MHz com $CDCl_3$.

5.4.3. Caracterização SUBST – 3 bucketings 51 (7,19-7,10 ppm) e 68 (5,93-5,79 ppm).

A terceira substância foi sugerida a partir de deslocamentos presentes nos *bucketings* 51 e 68, como sendo a **naringenina-4'- β -glicopiranosídeo** (m/z : 433,1125).

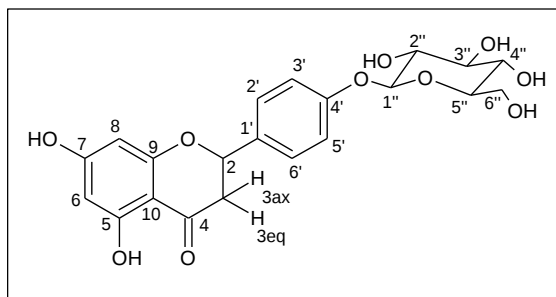
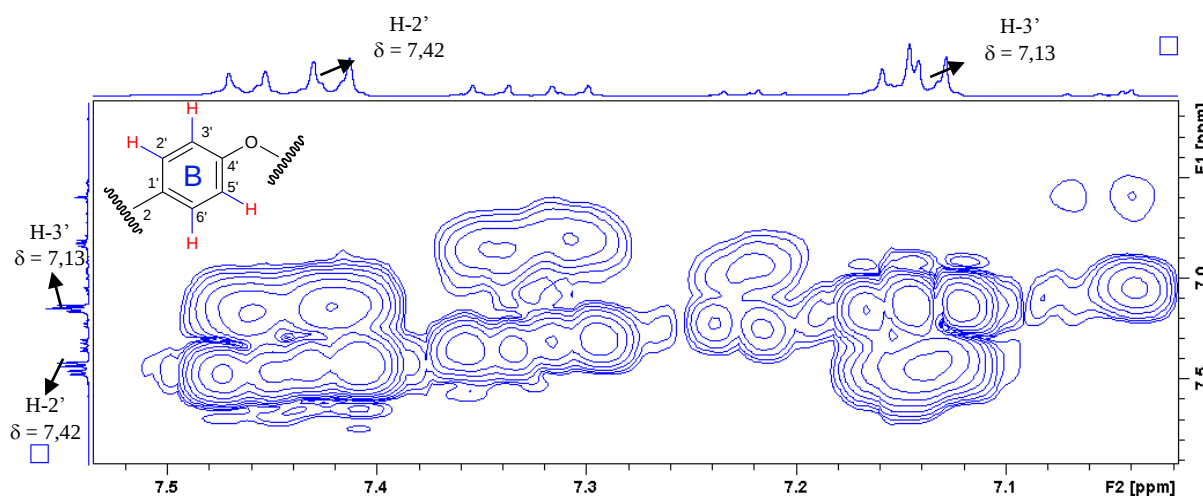
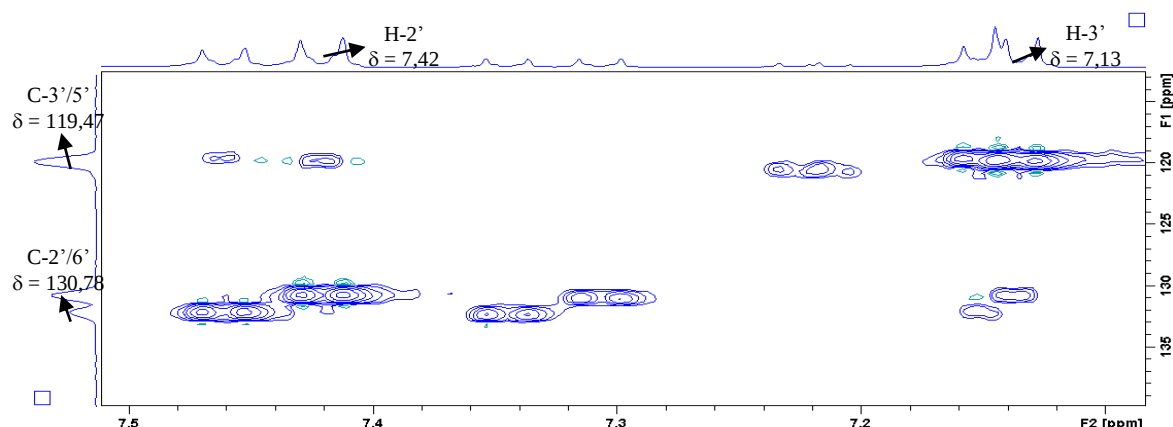


Figura 24 – Estrutura numerada da **naringenina-4'- β -glicopiranosídeo**.

O deslocamento do *bucketing* 51 ainda revelou a presença de hidrogênio δ 7,13 (d, 2H, 8,6 Hz, H-3'/5') acoplando na posição *orto* com o hidrogênio δ 7,42 (d, 2H, 8,6 Hz, H-2'/6') pelo espectro COSY (Espectro 29). O hidrogênio δ 7,13 (H-3'/5') e o δ 7,42 (H-2'/6') apresentaram correlação J_1 com os carbonos δ 119,47 (C-3'/5') e δ 130,78 (C-2'/6') pelo mapa de contornos longos de HSQC (Espectro 30, Tabela 13).

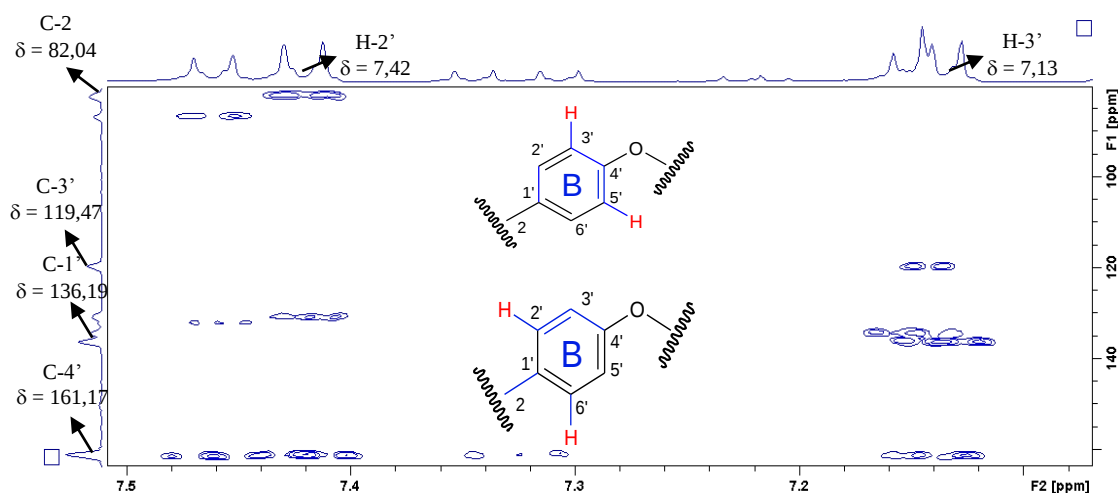


Espectro 29 - Ampliação da correlação δ 7,13 (H-3'/H-5') com δ 7,42 (H-2'/H-6') por COSY do *bucketing* 51 da substância naringenina-4'- β -glicopiranosídeo em CD₃OD (500 MHz).



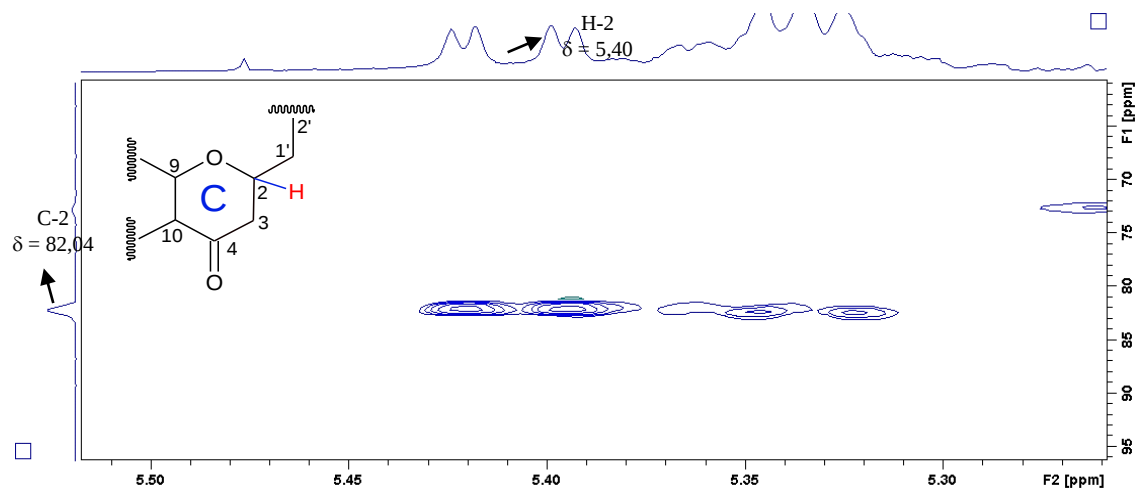
Espectro 30 - Ampliação da correlação do δ 7,13 (H-3'/H-5') com o carbono δ 119,47 (C-3'/5'), δ 7,42 (H-2'/H-6') com δ 130,78 (C-2'/6') por HSQC, do *bucketing* 51 em CD₃OD (500 MHz).

O hidrogênio δ 7,13 (H-3'/5') apresentou correlação J_2 e J_3 com os carbonos δ 136,19 (H-1') e δ 161,17 (H-4'). Já o hidrogênio δ 7,42 (H-2'/6') revelou correlação com os carbonos δ 82,04 (H-2), δ 119,47 (H-3') e δ 161,17 (H-4') por HMBC (Espectro 31 Tabela 13).

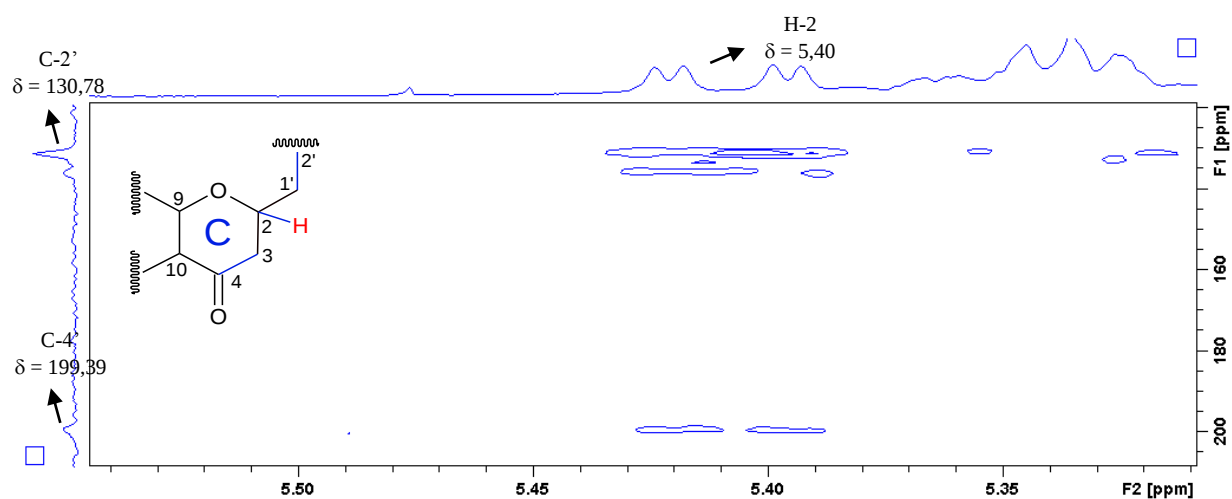


Espectro 31 - Ampliação da correlação no espectro de HMBC dos hidrogênios δ 7,13(H-3'), δ 7,42(H-2') com os carbonos (C-2, C-1', 3' e 4') do *bucketing* 51 da substância naringenina-4'- β -glicopiranosídeo em CD₃OD (500 MHz).

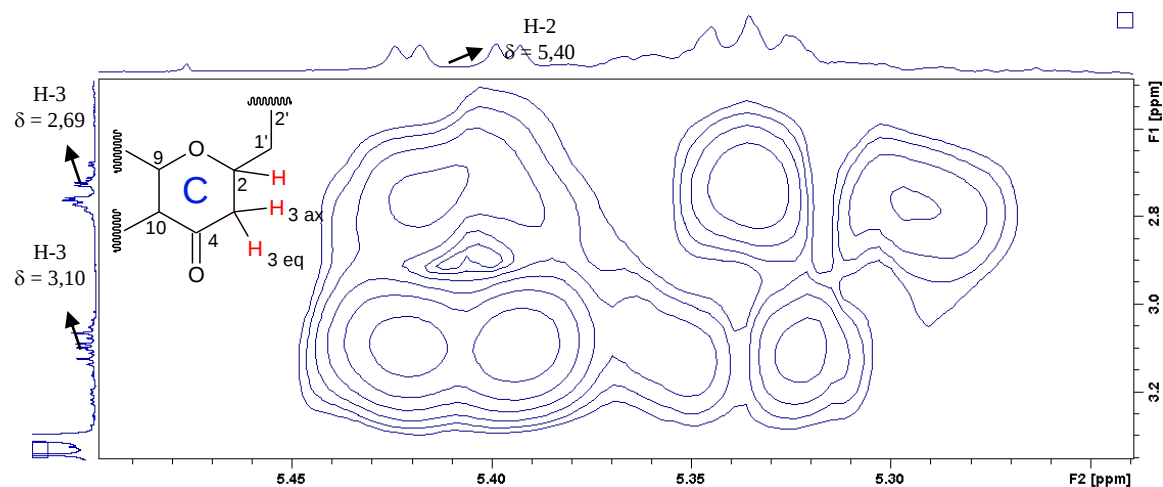
O carbono δ 82,04 (H-2) revelou ligação direta com o hidrogênio δ 5,40 (dd, 3,0 e 12,6 Hz, H-2) por HSQC (Espectro 32, Tabela 30) e por HMBC o hidrogênio δ 5,40 (H-2) apresentou correlação J_2 com o carbono δ 199,39 (C-4) e J_3 com o carbono δ 130,78 (H-2') (Espectro 33, Tabela 13). Finalmente, o deslocamento químico em δ 5,40 (H-2) apresentou pelo espectro de COSY acoplamento com os hidrogênios em δ 2,74 (dd, 3,0 e 17,07 Hz, H-3_{eq}) e δ 3,10 (dd, 12,6 e 17,07 Hz, H-3_{ax}) (Espectro 34).



Espectro 32 - Ampliação da correlação hidrogênio δ 5,40 (H-2) com o carbono δ 130,78 (C-2) por HSQC da substância naringenina-4'- β -glicopiranosídeo em CD_3OD (500 MHz).

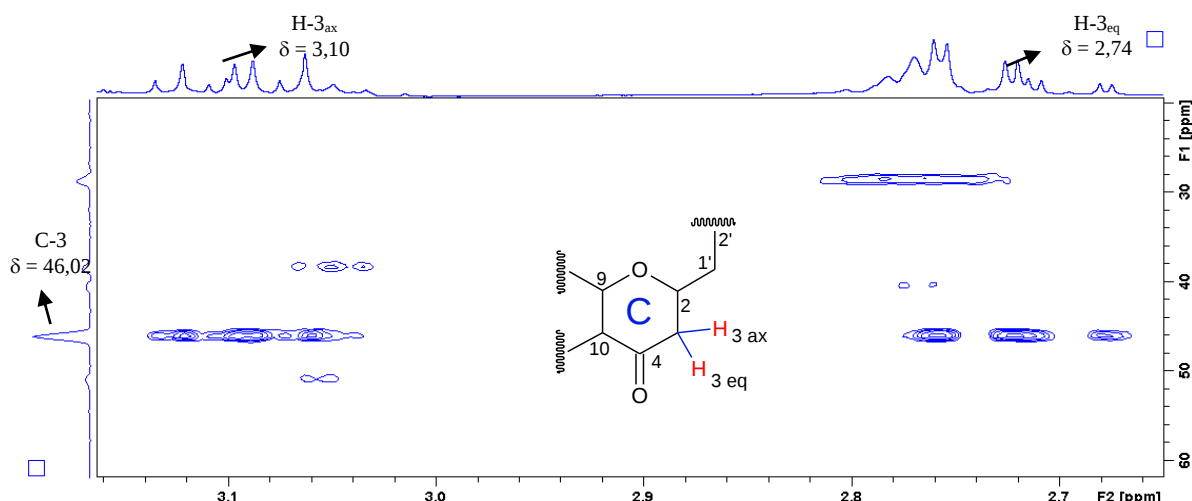


Espectro 33 - Ampliação da correlação no espectro de HMBC dos hidrogênios δ 5,40 (H-2) com os carbonos δ 130,78 (C-2') e δ 199,39 (C-4') da substância naringenina-4'- β -glicopiranosídeo em CD_3OD (500 MHz).

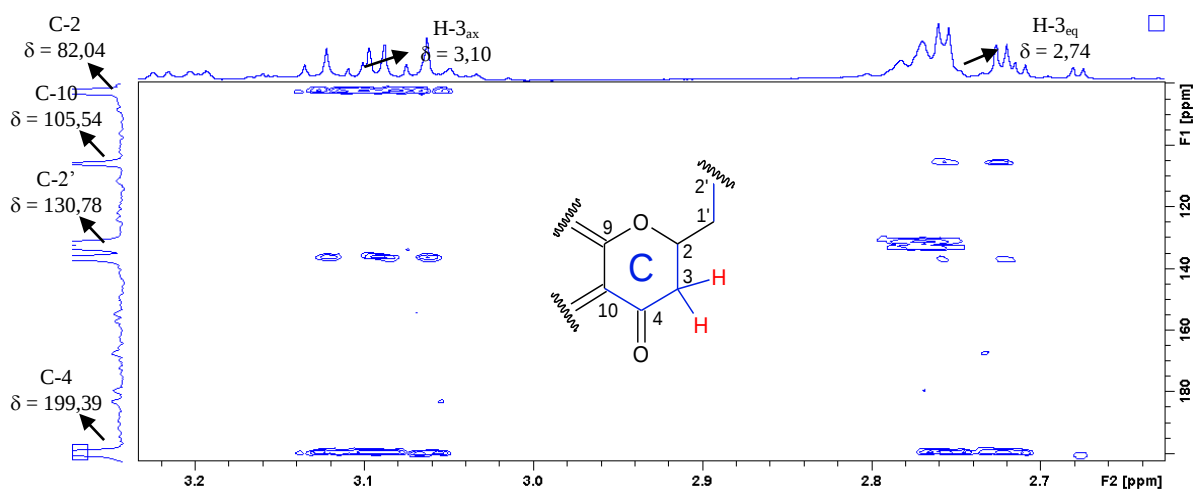


Espectro 34 - Ampliação da correlação δ 5,40 (H-2) com δ 2,74 (H-3_{eq}) e δ 3,10 (H-3_{ax}) por COSY da substância em CD_3OD (500 MHz).

Os hidrogênios δ 3,10 (H-3_{ax}) e δ 2,74 (H-3_{eq}) estavam diretamente ligados ao carbono δ 46,02 (C-3) pelo espectro de HSQC (Espectro 35, Tabela 13). O hidrogênio na posição (H-3_{ax}) apresentou correlação J₂ com os carbonos δ 82,04 (C-2) e δ 199,39 (C-4) e o (H-3_{eq}) revelou correlação J₂ δ 199,39 (C-4), J₃ δ 105,34 (C-10) e J₄ 130,78 (C-2') por HMBC (Espectro 36, Tabela 13).

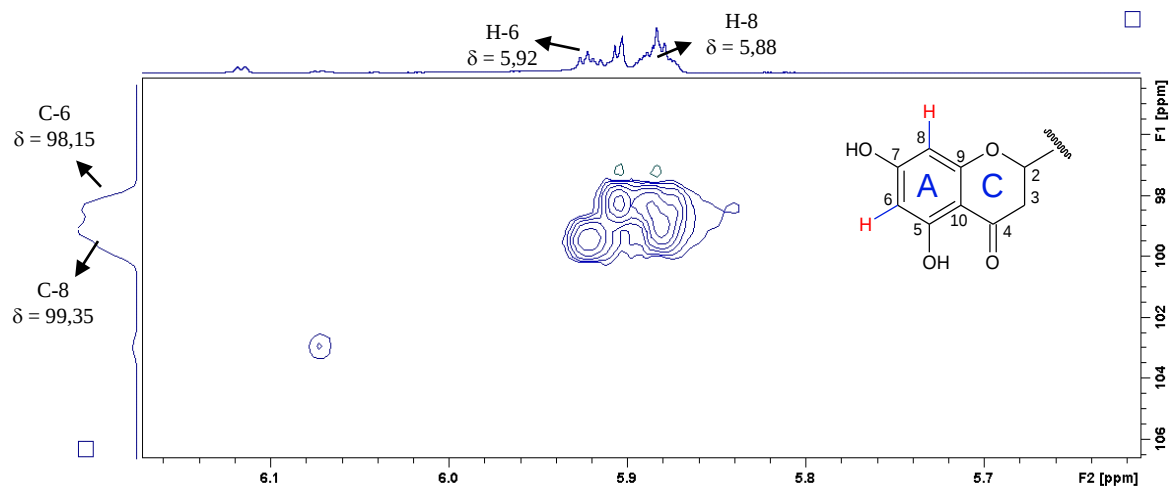


Espectro 35 - Ampliação da correlação dos hidrogênios δ 2,74 (H-3) e δ 3,10 (H-3) com o carbono δ 46,02 (C-2) por HSQC da substância naringenina-4'- β -glicopiranosídeo em CD₃OD (500 MHz).

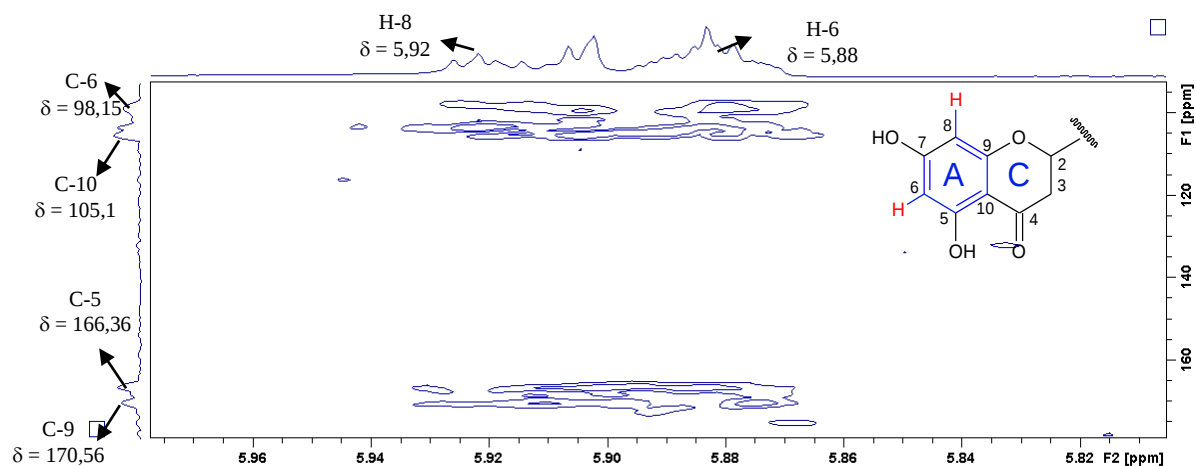


Espectro 36 - Ampliação da correlação no espectro de HMBC dos hidrogênios δ 2,74 (H-3_{eq}) e δ 3,10 (H-3_{ax}) com os carbonos (C-2, C-2', C-4 e C-10) da substância naringenina-4'- β -glicopiranosídeo em CD₃OD (500 MHz).

O anel C foi fechado pelo deslocamento de hidrogênio que o *bucketing* **68** apresentou em δ 5,88 (d, 2,10 Hz, H-8) que acoplou em J₁ com o δ 99,35 (C-8) e o outro δ 5,92 (d, 2,10 Hz, H-6) de H¹ com δ 98,15 (C-6) por HSQC (Espectro 37, Tabela 13). O hidrogênio δ 5,88 (H-8) acoplou com os carbonos δ 98,15 (C-6), δ 105,1 (C-10), δ 166,36 (C-5) e δ 170,56 (H-9). Já o H¹ em δ 5,92 (H-6) com o C¹³ δ 105,1 (C-10) e δ 170,56 (H-9) (Espectro 38, Tabela 13).

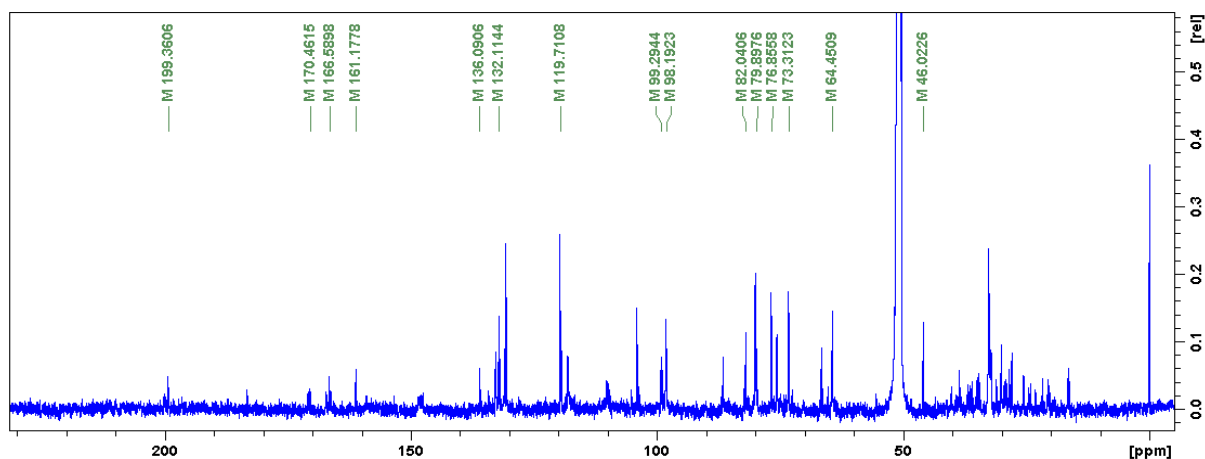


Espectro 37 - Ampliação da correlação no espectro de HSQC dos hidrogênios δ 5,88 (H-8) e δ 5,92 (H-6) com os carbonos (C-6 e C-8), da substância naringenina-4'- β -glicopiranosídeo em CD_3OD (500 MHz).

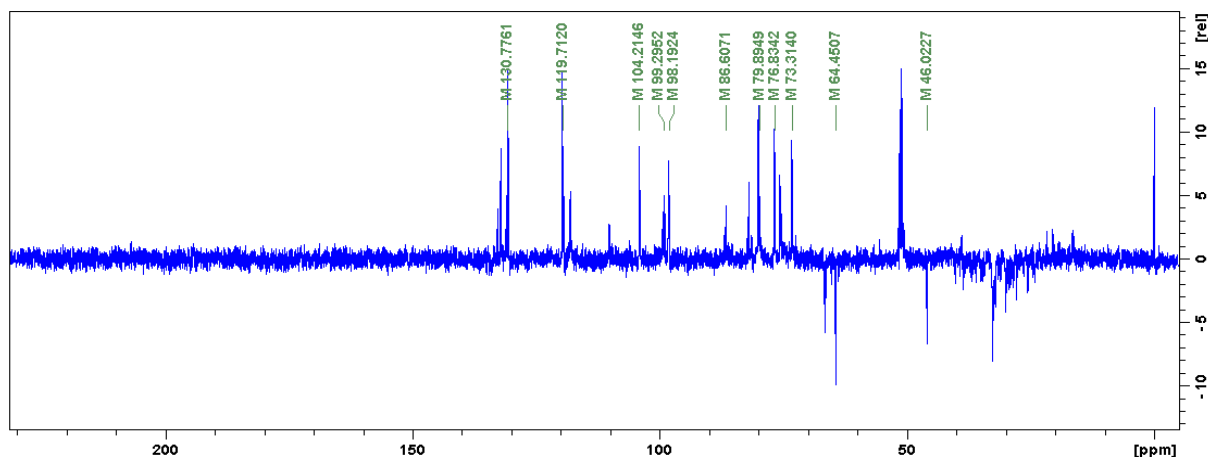


Espectro 38 - Ampliação da correlação no espectro de HMBC dos hidrogênios δ 2,74 (H-3_{eq}) e δ 3,10 (H-3_{ax}) com os carbonos (C-5, 6, 9 e 10), da substância naringenina-4'- β -glicopiranosídeo em CD_3OD (500 MHz).

Os deslocamentos dos carbonos foram revelados por de C^{13} e Dept135 (Espectros 39 e 40).

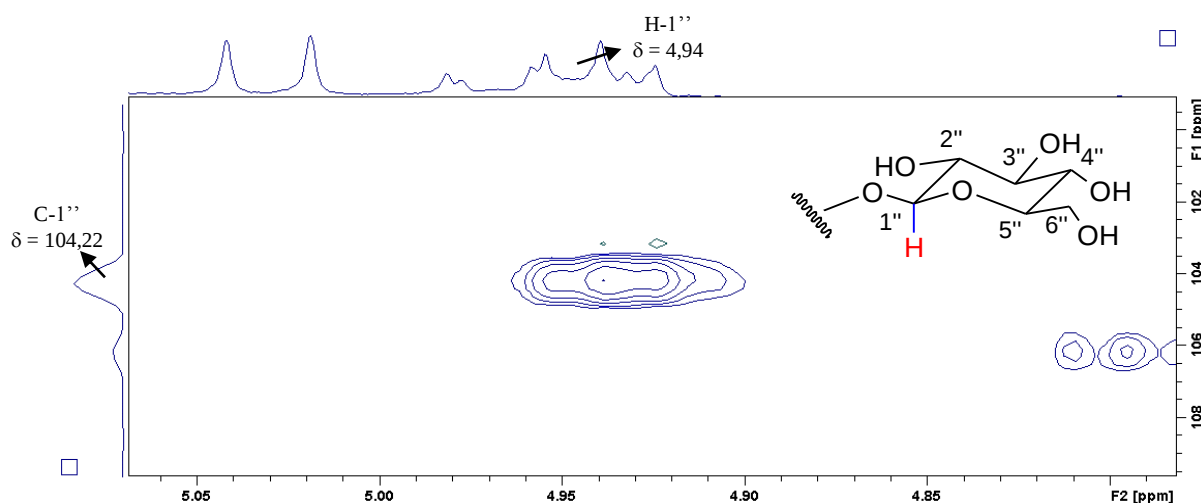


Espectro 39 - Espectro de C^{13} com os principais deslocamentos dos carbonos do sistema ABX referente ao *bucketing* 51 e 68 da substância naringenina-4'- β -glicopiranosídeo em CD_3OD (125 MHz).



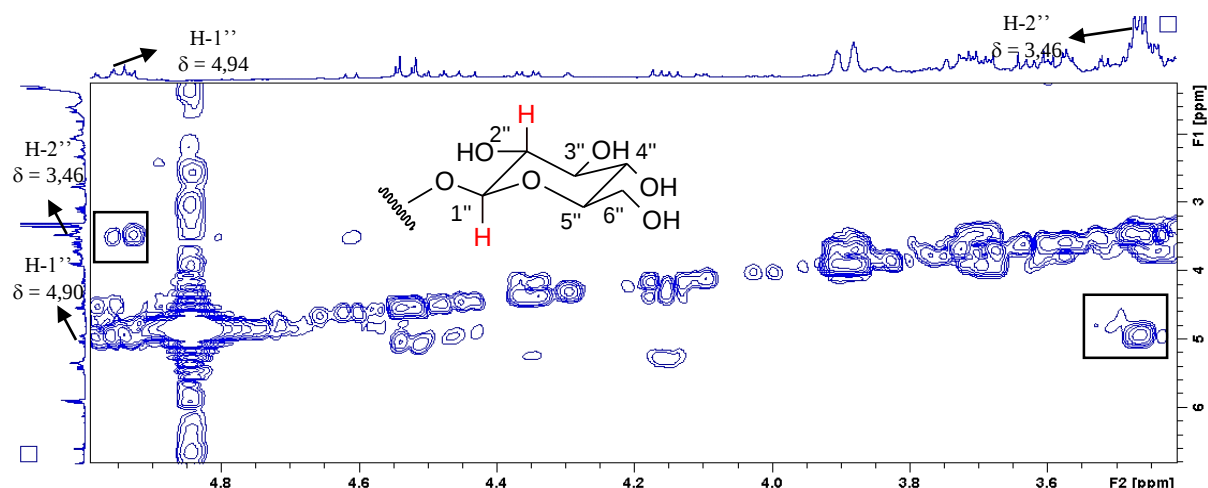
Espectro 40 - Espectro de Dept 135, referente aos carbonos da substância naringenina-4'-β-glicopiranosídeo com *bucketings* 51 e 68 em CD₃OD (125 MHz).

Analisando o espectro de RMN H^1 foi possível identificar a presença de um duplete em δ 4,94 (7,5 Hz, H-1'') característico de H^1 anomérico (Tabela 13) e que está diretamente ligado ao carbono δ 104,22 (C-1''), característico de anomérico com configuração do tipo β . Os deslocamentos químicos tanto do H^1 quanto do C^{13} são observados por HSQC, (Espectro 41, Tabela 13).



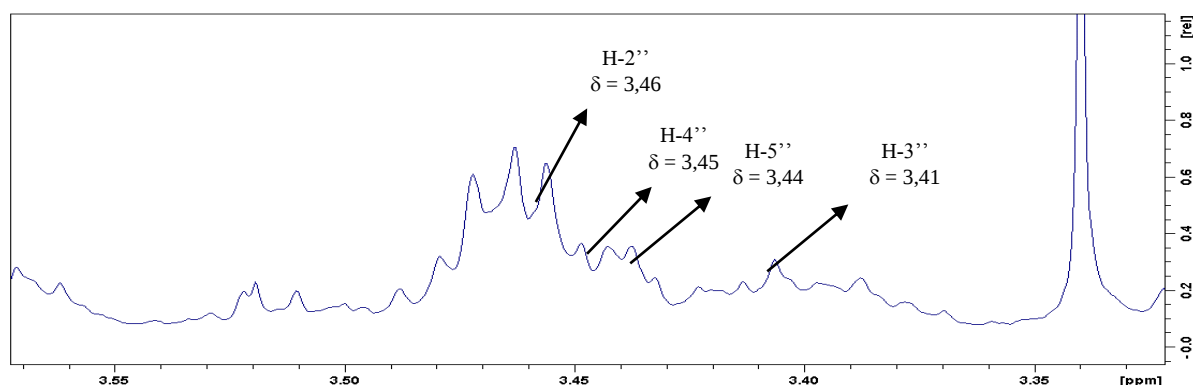
Espectro 41 - Ampliação da correlação no espectro de HSQC do hidrogênio δ 4,94 (H-1'') com o carbono (C-1'') da substância naringenina-4'-β-glicopiranosídeo com *bucketings* 51 e 68 em CD₃OD (500 MHz).

O duplete do hidrogênio anomérico δ 4,94 (7,5 Hz, H-1'') correlacionou com o hidrogênio em δ 3,46 (d, 3,41 Hz, H-2'') e este correlaciona com δ 4,94 (7,5 Hz, H-1''), ambos por COSY (Espectro 42).

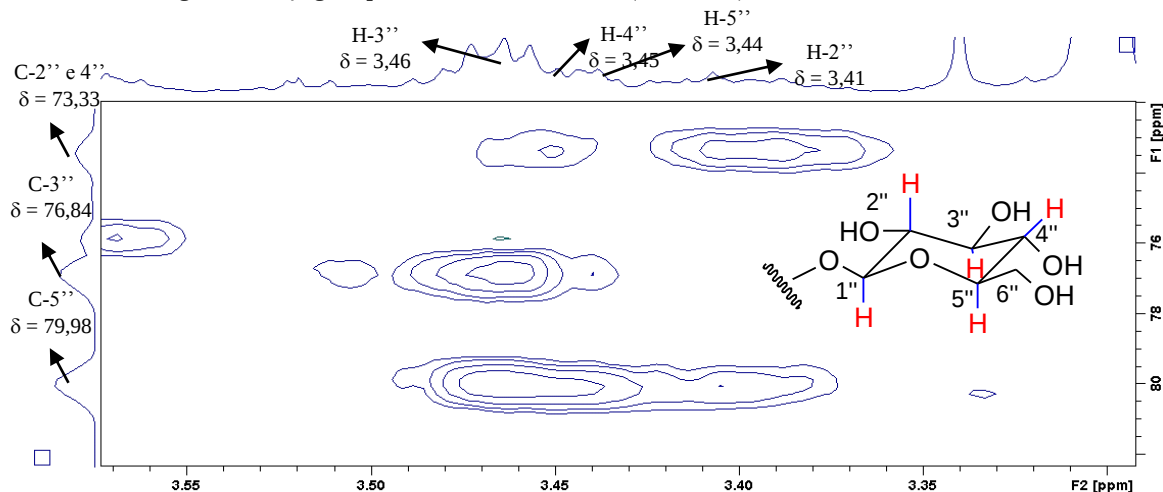


Espectro 42 - Ampliação da correlação no espectro de COSY do hidrogênio δ 4,94 (H-1'') com o H¹ δ 3,46 (H-2'') da substância naringenina-4'- β -g em CD₃OD (500 MHz).

Pelo espectro de H¹ foi possível identificar os sinais dos hidrogênios δ 3,46 (d, 3,41 Hz, H-2''), δ 3,45 (H-4'') δ 3,44 (H-5''), δ 3,41 (H-3'') e pelo de HSQC os acoplamentos com os seus respectivos carbonos δ 76,84 (C-3''), δ 73,32 (C-4''), δ 79,98 (C-5'') e δ 73,82 (C-2'') referentes a estrutura do glicopiranosídeo. (Espectros 43 e 44, Tabelas 13).

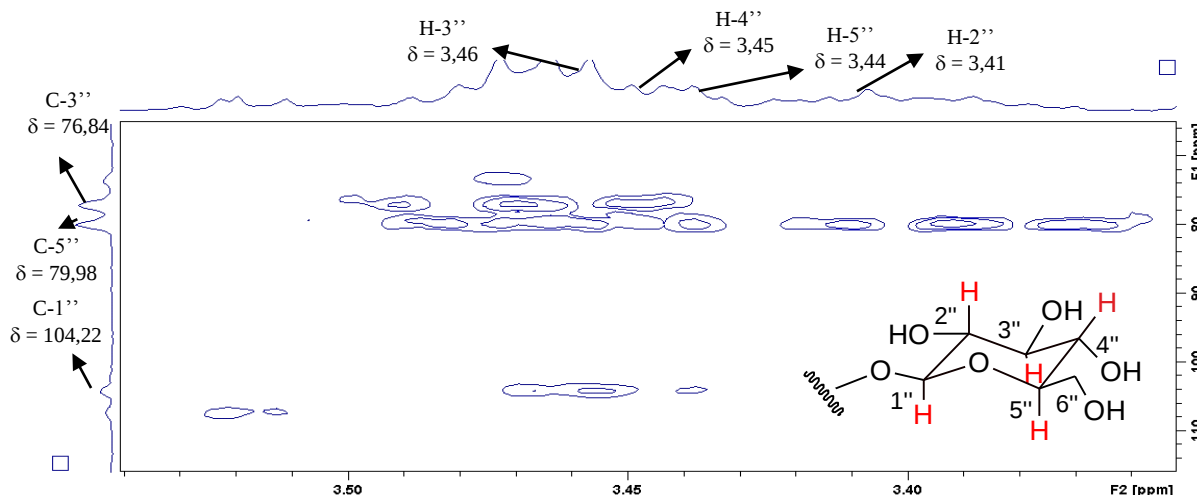


Espectro 43 - Espectro de RMN H¹, hidrogênios δ 3,46 (H-2''), δ 3,41 (H-3''), δ 3,45 (H-4'') e δ 3,44 (H-5''), da substância naringenina-4'- β -glicopiranosídeo em CD₃OD (500 MHz).



Espectro 44 - Ampliação da correlação no espectro de HSQC dos hidrogênios (H-1'', H-2'', H-3'' e H-4'') com os carbonos (C-2'', 3'', 4'' e 5'') da substância encontrada em CD₃OD (500 MHz).

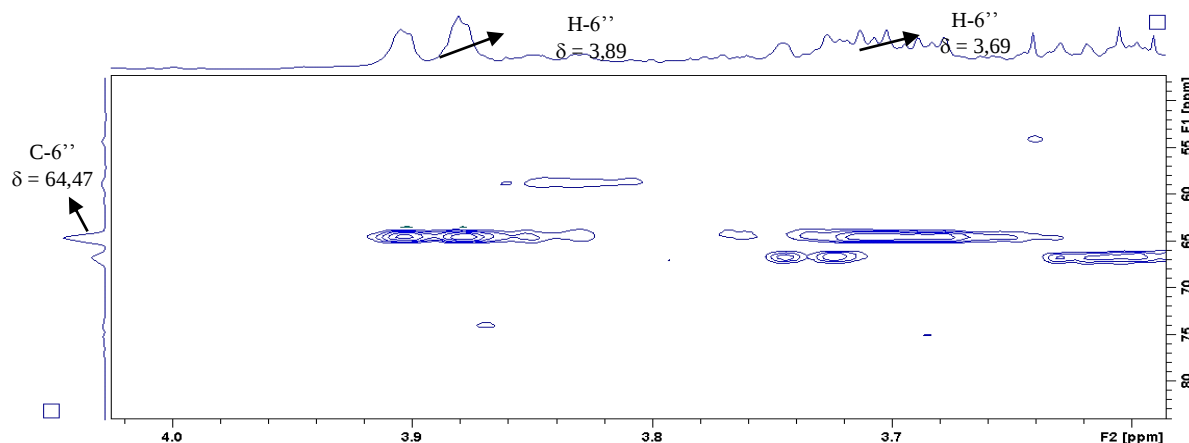
As correlações de J_2 , J_3 e J_4 dos carbonos pertencentes a cadeia de açúcar, foram observados junto ao espectro de HMBC. As definições de longa distância foram atribuídas para o H^1 δ 3,46 ($H-2''$) com o δ 76,84 ($C-3''$), o H^1 δ 3,41 ($H-3''$) com o carbono δ 79,98 ($C-5''$), o H^1 δ 3,45 ($H-4''$) com os carbonos δ 104,22 ($C-1''$ – fraco), δ 76,84 ($C-3''$) e δ 79,98 ($C-5''$), o H^1 δ 3,44 ($H-5''$) com os C^{13} δ 76,84 ($C-3''$) e δ 104,22 ($C-1''$ – fraco) (Tabela 13).



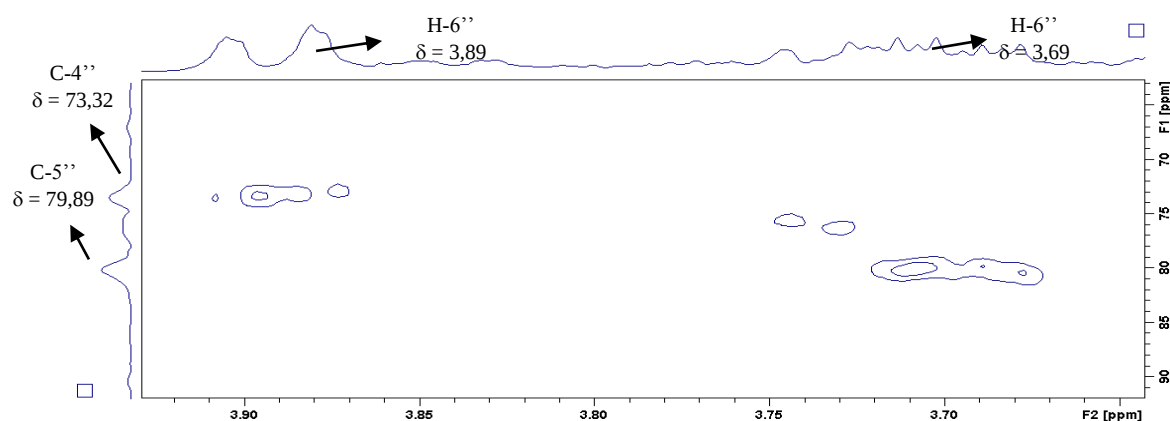
Espectro 45 - Ampliação da correlação no espectro de HMBC dos hidrogênios ($H-1''$, $H-2''$, $H-3''$ e $H-4''$) com os carbonos ($C-2''$, $3''$, $4''$ e $5''$) da substância encontrada em CD_3OD (500 MHz).

O espectro de RMN de H^1 apresentou no deslocamento entre 3,92 e 3,67 ppm sinais dos hidrogênios característicos do $H-6''$ do açúcar encontrados na literatura. O H^1 em δ 3,89 (dd, 12,03 e 2,05 Hz, $H-6''$) e δ 3,69 (m, $H-6''$) (Tabela 13). Ambos ($H-6''$) apresentaram por HSQC correlação com o C^{13} δ 64,47 ($C-6''$) (Espectro 46, Tabela 13). Por HMBC o H^1 δ 3,89 ($H-6''$) correlacionou por J_3 com o carbono δ 73,32 ($C-4''$) e o H^1 δ 3,69 (m, $H-6''$) por J_2 com o C^{13} δ 79,98 ($C-5''$) (Espectro 47, Tabela 13).

Os deslocamentos de carbonos do açúcar foram comprovados junto aos espectros de C^{13} e Dept135 (Espectros 39 e 40) e comparados com a literatura.



Espectro 46 - Ampliação do espectro de HSQC, deslocamento dos hidrogênios ($H-6''$) acoplando com seu respectivo ($C-6''$) carbono da substância encontrada em CD_3OD (500 MHz).



Espectro 47 - Ampliação do espectro de HMBC, hidrogênios δ 3,89 e δ 3,9 (H-6'') acoplando J₃ e J₂ com os respectivos carbonos δ 73,32 (C-4'') e δ 79,98 (C-5'') da substância encontrada em CD₃OD (500 MHz).

Os dados obtidos para a substância foram comparados com as informações dos trabalhos realizados por Da Silva *et al.*, (2013) que permitiram definir a mesma como sendo a naringenina-4'- β -glicopiranosídeo. Os deslocamentos de carbonos e hidrogênio e suas correlações foram organizados e Tabelados conforme evidenciado abaixo:

Tabela 13 - Principais deslocamentos de H¹, C¹³ e HMBC para a naringenina-4'- β -glicopiranosídeo.

naringenina-4'- β -glicopiranosídeo (Principais sinais obtidos)*				naringenina-4'- β -glicopiranosídeo Da Silva <i>et al.</i> (2013)**	
Nº	δ C ¹³	δ H ¹ (m, J)	HMBC	δ C ¹³	δ H ¹ (m, J)
C-1'	136,19	-	-	134,1	-
C-2'	130,78	7,42 (d, 8,6)	2, 2', 3', 4'	128,79	7,43 (d, 8,5)
C-3'	119,57	7,13 (d, 8,6)	1', 3', 4'	117,84	7,13 (d, 7,0)
C-4'	161,17	-	-	159,2	-
C-5'	119,47	7,13 (d, 8,6)	1', 3', 4'	117,84	7,14 (d, 7,0)
C-6'	130,78	7,42 (d, 8,6)	2, 2', 3', 4'	128,79	7,43 (d, 8,5)
C-2	82,04	5,40 (dd, 3,0 e 17,07)	2', 4	80,13	5,41 (dd, 3,5 e 12,5)
C-3 _{ax}	46,02	3,10 (dd 12,6 e 17,07)	2, 4, 1'	44,03	3,10 (dd, 12,5 e 17,0)
C-3 _{eq}	46,02	2,74 (dd 3,0 e 17,07)	4, 10, 2'	44,03	2,74 (dd, 3,0 e 17,0)
C-4	199,39	-	-	197,4	-
C-5	166,36	-	-	164,7	12,10
C-6	98,15	5,92 (d, 2,10)	5, 8, 9, 10	96,21	5,91 (d, 2,5)
C-7	-	-	-	165,4	-
C-8	99,35	5,88 (d, 2,10)	6, 7, 9	97,12	5,89 (d, 2,0)
C-9	170,85	-	-	168,3	-
C-10	105,28	-	-	103,3	-
C-1''	104,22	4,94 (d, 7,5)	-	102,21	4,90 (d, 7,5)
C-2''	73,32	3,46 (d, 3,41)	3''	74,91	3,47 (d, 3,0)
C-3''	76,84	3,41 (m)	5''	77,99	3,46 (d, 3,5)
C-4''	73,32	3,45 (m)	1'', 3'', 5''	71,38	3,48 (m)
C-5''	79,8	3,44 (m)	3''	78,19	3,45 (m)
C-6''	64,47	3,69 (m)	4'', 5''	62,52	3,70 (dd, 12,2 e 6,0)
C-6''	64,47	3,89 (dd, 12,03 e 2,05)	4'', 5''	62,52	3,91 (dd, 12,2 e 2,0)

*RMN de C¹³ e H¹: aromadendrina em equipamento de 125 MHz e 500 MHz com CD₃OD.

** RMN de C¹³ e H¹: aromadendrina em equipamento de 75 MHz e 300 MHz com CD₃OD.

Além das correlações encontradas por RMN ^1H e ^{13}C , foi realizado o LC-MS de uma amostra representante do Inpa e obtido o perfil abaixo:

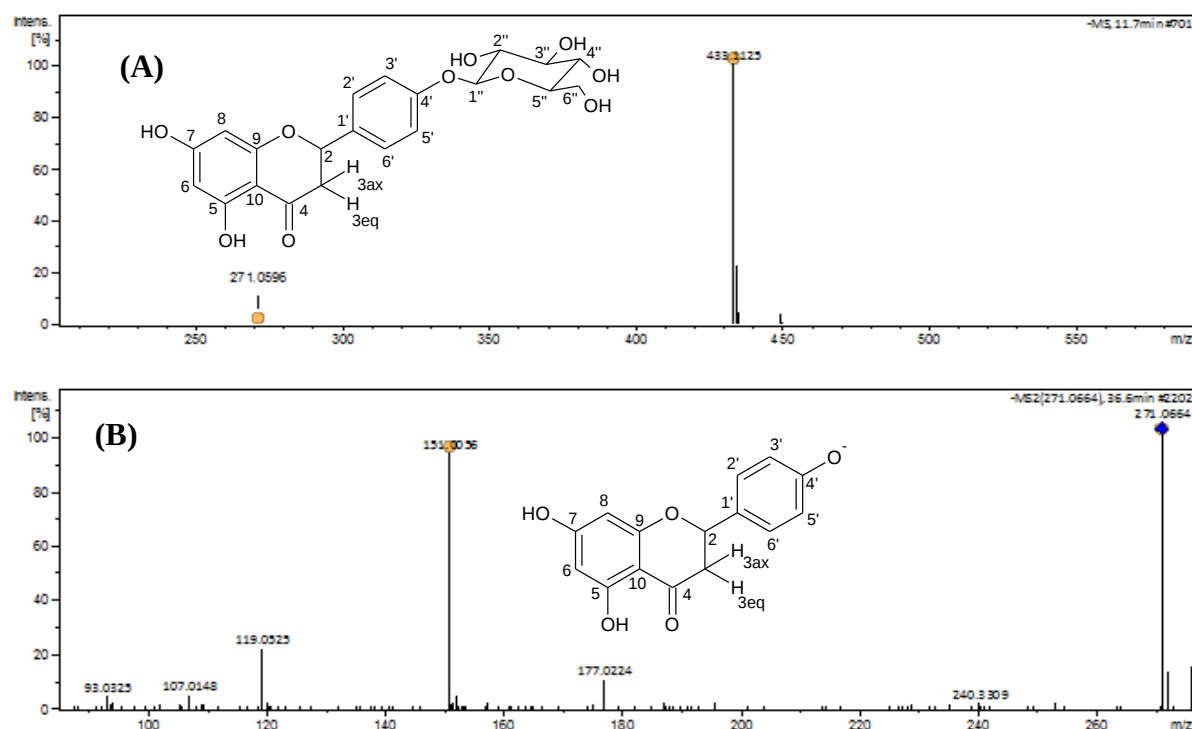
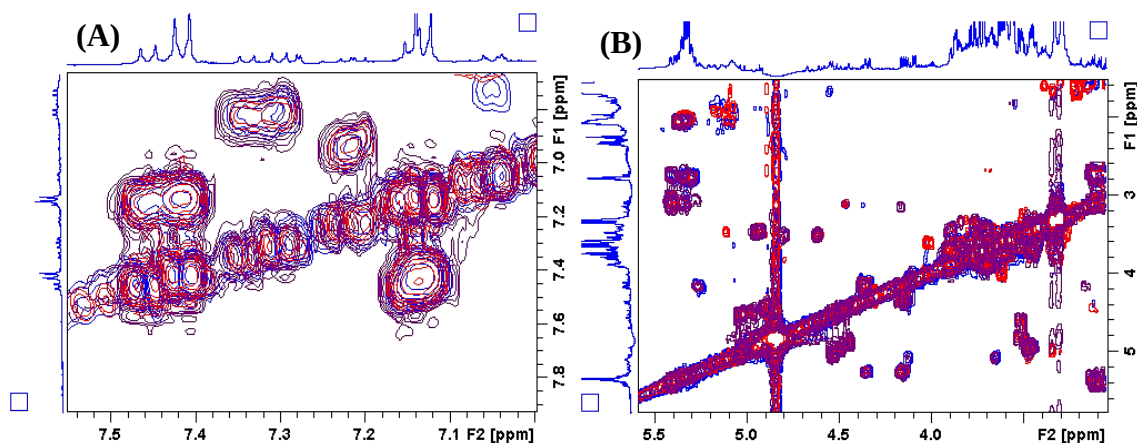


Figura 25 - Espectro de Massas (LC-MS), naringenina-4'-β-glicopiranosídeo m/z : 433,1125 $[\text{M}-\text{H}]^-$. (A) MS: 271,0603; (B) MS²: 271,0603 → 115,0036, 177,0224, 151,0050, 119,0525, 107,0148 e 93,0325.

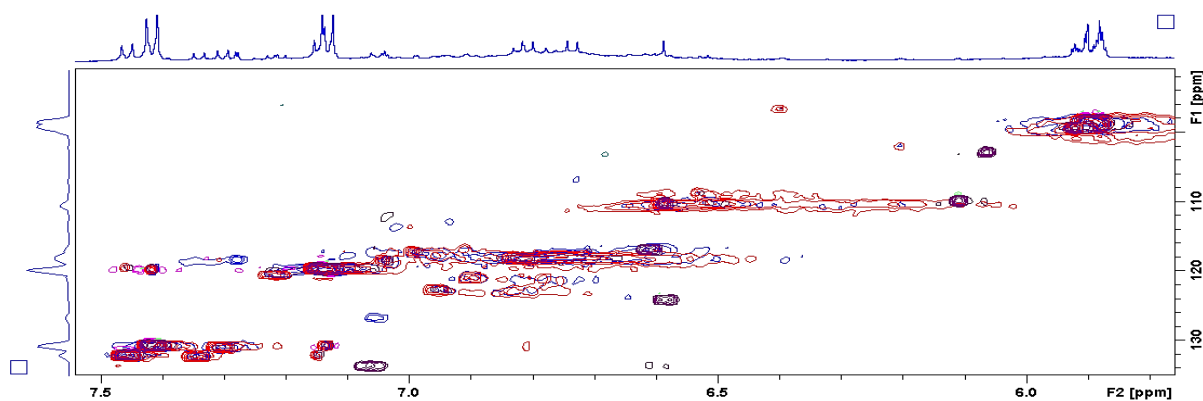
A massa molecular exata obtida foi m/z : 433,1125 e a fórmula molecular com o hidrogênio foi $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_3$ e o cálculo de (IDH) forneceu o resultado de 11 ligações π , ou seja, 7 ligações duplas presentes nos anéis A e C e 1 representando a carbonila em C-4, mais 4 quatro estruturas cíclicas. O espectro ainda apresentou o erro[ppm]: 3.6 e mSigma: 3.8, o que garantiu a presença da para a Naringenina-4'-β-Glicopiranosídeo.

Os dados obtidos pelos *bucketings* 51 e 68 por quimiometria revelaram os principais deslocamentos químicos no espectro de RMN possibilitando a caracterização de substâncias flavonoídicas: aromadendrina (m/z : 287,0545) e a naringenina-4'-O-β-glicopiranosídeo (m/z : 433,1125) responsáveis pela tipificação do grupo IV das amostras da região do Inpa separadas pelo gráfico de PCA (*scores*).

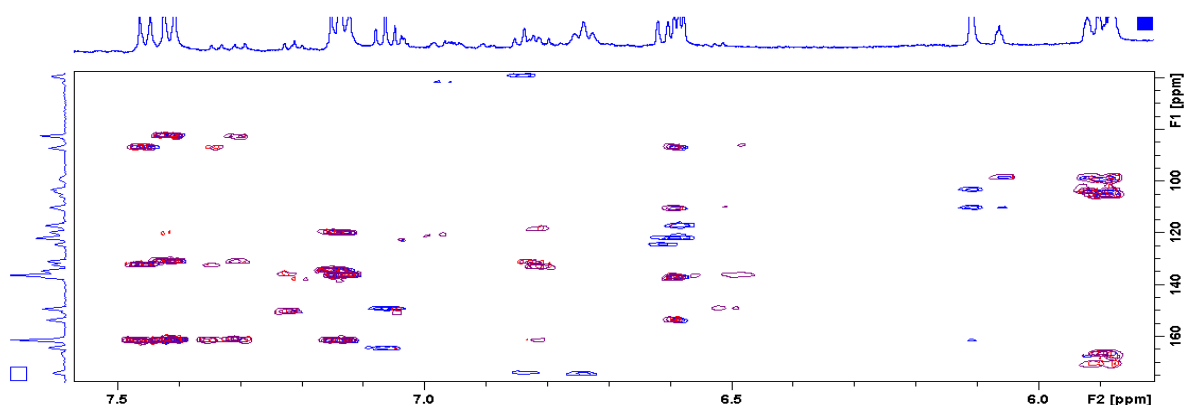
A análise dos perfis espectrais de RMN ^1H e cromatográficos (Figuras 17, 18 e 19, pág. 70) das amostras de *M. interrupta* revelaram ser bem similares ao perfil espectral das amostras do INPA da urucu boca de renda (*M. seminigra*). A constatação ocorreu pela presença das principais correlações por COSY, HSQC e HMBC das substâncias aromadendrina e naringenina-4'-O-β-glicopiranosídeo encontradas nas amostras de *M. seminigra* (Tabelas 12 e 13).



Espectro 48 - Ampliação da correlação no espectro de COSY (H^1-H^1): (A) δ dos H^1 dos anéis A e B; (B) δ dos H^1 anéis C; das substâncias aromadendrina e naringenina-4'- β -glicopiranosídeo em CD_3OD (500 MHz).



Espectro 49 - Ampliação da correlação no espectro de HSQC: (A) δ dos carbonos dos anéis A e B; (B) δ dos carbonos anéis C; das substâncias aromadendrina e naringenina-4'- β -glicopiranosídeo em CD_3OD (500 MHz).



Espectro 50 - Ampliação da correlação no espectro de HMBC: (A) δ dos carbonos dos anéis A e B; (B) δ dos carbonos anéis C; das substâncias aromadendrina e naringenina-4'- β -glicopiranosídeo em CD_3OD (500 MHz).

A variação dos valores de deslocamentos tanto para hidrogênios quanto carbonos ficou entre $\Delta\delta_H^1 = 0,15$ e $\Delta\delta_C^{13} = 0,13$, ou seja, comprovando que as substâncias também estavam presentes de forma expressiva nas amostras da abelha mais restritiva (*M. interrupta*).

Em estudo realizado no município de Manaus-AM utilizando a técnica de RMN houve a confirmação da presença de substâncias flavonoídicas como a naringenina-4'-O- β -

glicopiranosídeo, naringenina e um derivado da aromadendrina nos extratos metanólicos de geoprópolis da espécie de *M. interrupta* (DA SILVA *et al.*, 2013). Porém outros estudos químicos realizados com extratos metanólicos e etanólicos de geoprópolis de *M. seminigra* foi possível detectar por análise em cromatografia líquida de alta resolução as substâncias naringenina e aromadendrina (DE OLIVEIRA, 2016).

Outros estudos com extratos etanólicos do pólen de *M. seminigra* obtidos no município de Manaus-AM indicaram por CLAE a presença da substância flavonoídica naringenina (VILLARREAL, 2010). A mesma já tinha sido detectada por CLAE em amostras de mel da mesma espécie (DA SILVA *et al.*, 2013). As informações da literatura corroboraram para que afirmar que a composição química entre as espécies é bem similar e que possui relação direta com as espécies de plantas visitadas, já que ambas as abelhas visitam fontes as mesmas fontes polínicas.

Outros estudos com produtos oriundos de abelhas sem ferrão já haviam comprovado derivados dos flavonoides encontrados. O estudo com extratos etanólicos de material oriundo do ninho de *Trigona spinipes* coletados no município de Fortaleza-CE revelaram através da técnica de RMN, a presença da substância 7-metil-éter-aromadendrina, um flavonol (FREITAS *et al.*, 2008).

A investigação química do geoprópolis de *M. subnitida* revelou pelas técnicas de LC-ESI-MS e RMN H^1 e C^{13} a presença das substâncias 7-O-metil-naringenina, 7-O-metil-aromadendrina, 7,4-di-O-metil-aromadendrina e 5-O-metil aromadendrina, todas apresentaram atividade antioxidante significativa (DE SOUZA *et al.*, 2013).

O estudo ainda revela que a espécie urucu boca de renda (*M. seminigra*) carrega grandes quantidades de pólen de famílias muito estudadas pela literatura, cerca de 25,64% da família Myrtaceae (*Myrcia spp.*) e 16,81% da Fabaceae (*Mimosa pudica*) (VILLARREAL, 2010), ou seja, espécies de plantas ricas em substâncias flavonoídicas (ricas em propriedades antioxidantes) como os derivados da naringenina e aromadendrina, servem de fonte para captação de alimentos e material para a composição da geoprópolis de ambas as espécies de abelha.

5.4.4. Caracterização SUBST – 4 bucketings 50 e 52 deslocamentos (7,28-7,19 ppm) e (7,10-7,01 ppm).

A quarta substância sugerida foi a **guttiiferona C** (m/z : 669,4333) (Figura 26). Esta apresentou valores de *bucketings* de 50 e 52 no gráfico de PCA (*loadings*) com seus respectivos deslocamentos (7,28-7,19 ppm) e (7,10-7,01 ppm) no espectro de RMN de H^1 (Espectro 51) os quais foram responsáveis pela separação do grupo II (Irاندوبا) das demais localidades.

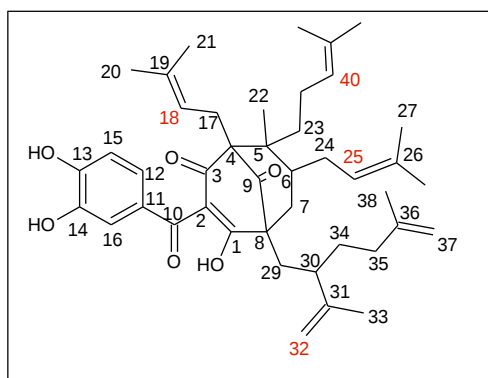
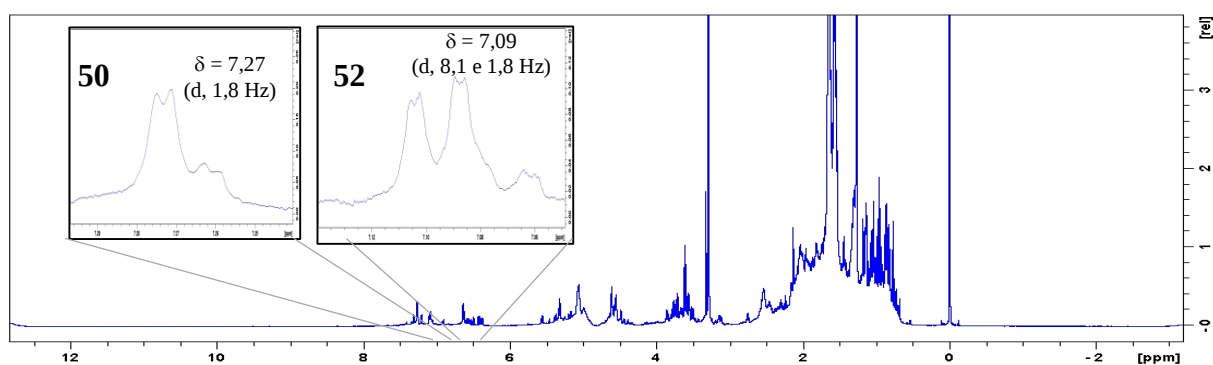
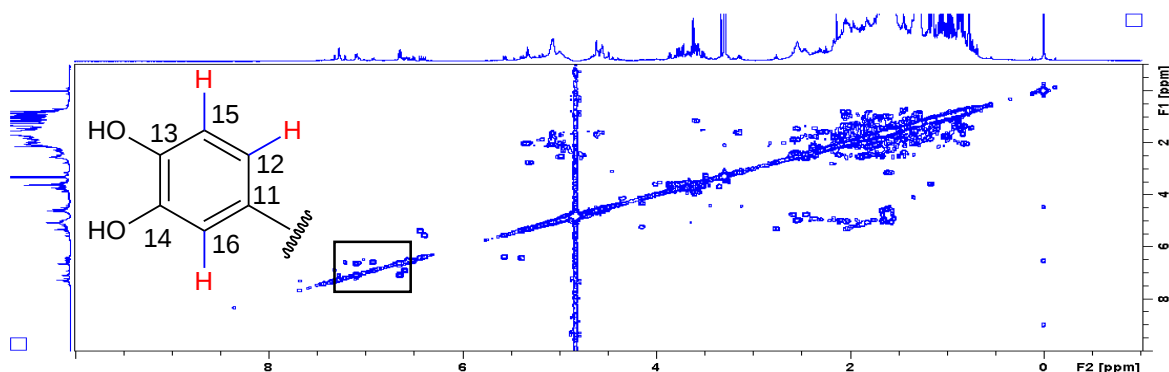


Figura 26 – Estrutura numerada da guttiiferone C.

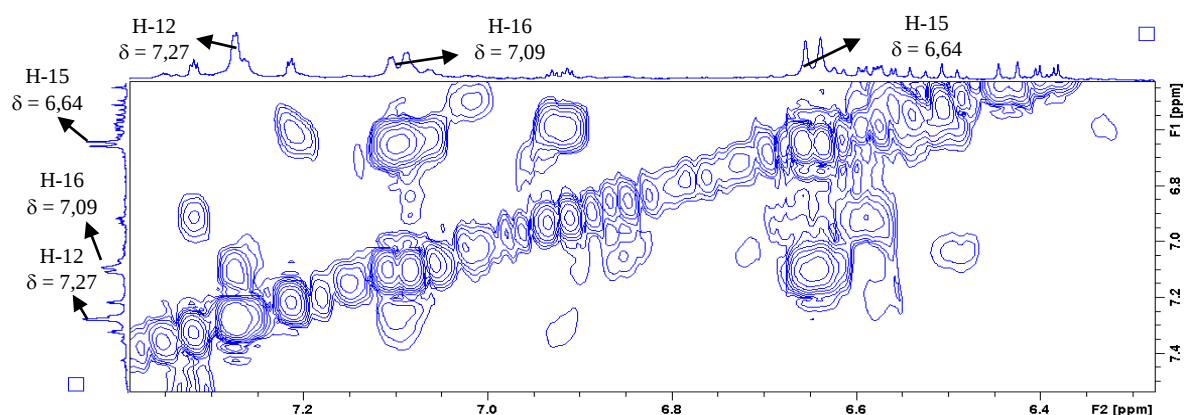


Espectro 51 - Espectro da região do Irاندوبا com os *bucketings* 50 (7,28-7,19 ppm) e 52 (7,10-7,01 ppm).

No *bucketing* 52 o valor definido de deslocamento químico foi o do hidrogênio em δ 7,09 (dd, 8,10 e 1,80 Hz, H-16), o qual acoplou por COSY com os H^1 em δ 6,64 (d, 8,10, H-15) e com o H^1 δ 7,27 (d, 1,80 Hz, H-12). O H^1 δ 6,64 (H-15) correlacionou com δ 7,09 (H-16) e o δ 7,27 (H-12) com o δ 7,09 (H-16) (Espectro 52 e 52.1, Tabela 15).

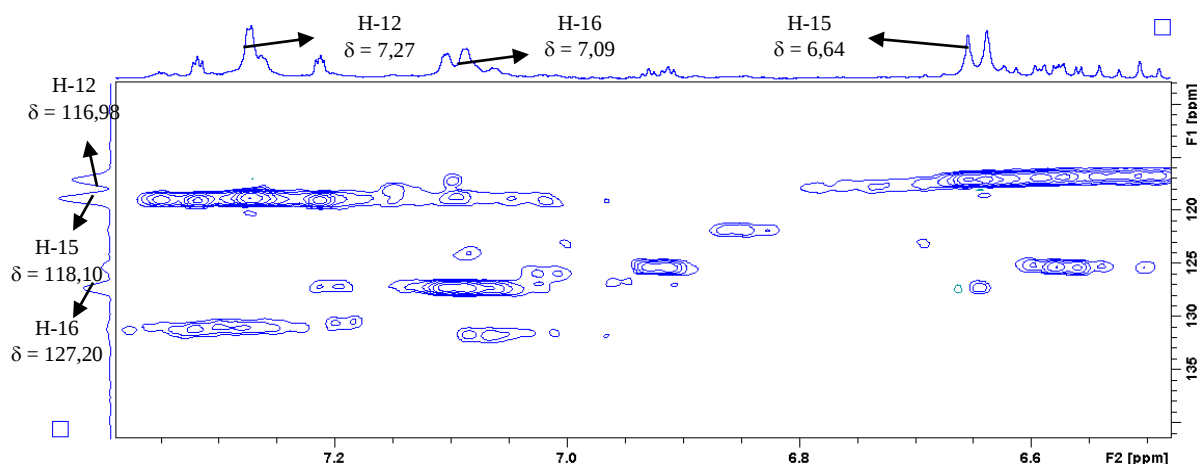


Espectro 52 - Espectro de COSY, região da correlação dos H^1 δ 7,09 (H-16) com δ 6,64 (H-15) e δ 7,27 (H-12) da substância Guttiiferone C com sinal presente no *bucketing* 52 em CD_3OD (500 MHz).



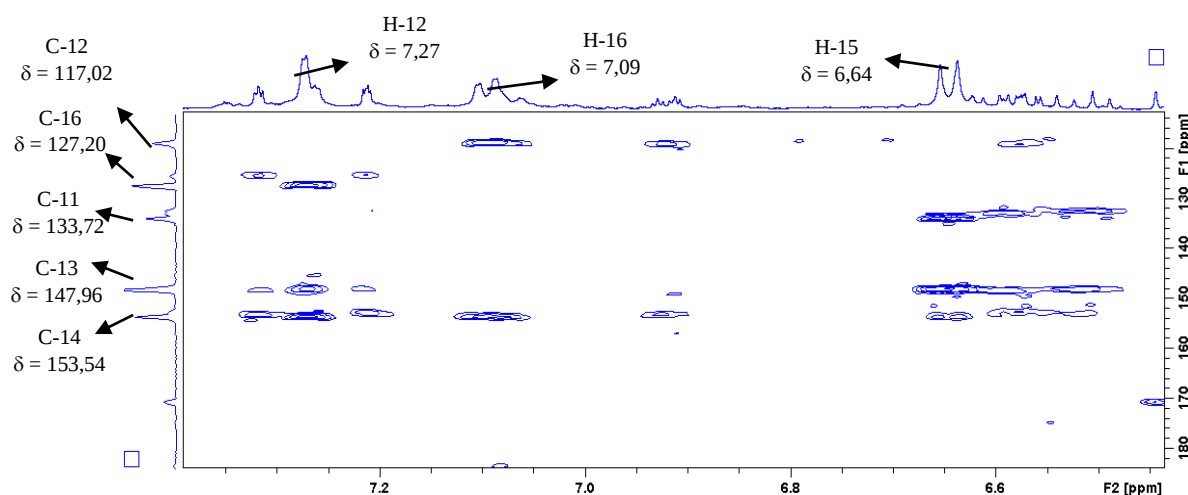
Espectro 52.1 - Ampliação da correlação por COSY dos H^1 δ 7,09 (H-16) com δ 6,64 (H-15) e δ 7,27 (H-12) da substância Guttiiferone C com sinal presente no *bucketing* 52 em CD_3OD (500 MHz).

O espectro de HSQC mostrou as correlações diretas (J_1) dos hidrogênios com os seus respectivos carbonos δ 127,20 (C-16), δ 118,10 (C-12) e δ 116,98 (C-15) (Espectro 53, Tabela 16).



Espectro 53 - Correlação (HSQC) δ 7,09 (H-16), δ 6,64 (H-15), δ 7,27 (H-12) com os δ 127,20 (C-16), δ 118,10 (H-15), δ 117,02 (C-12) da substância Guttiiferone C do *bucketing* 50 e 52 em CD_3OD (500 MHz).

Por HMBC o hidrogênio δ 7,09 (H-16) apresentou correlações com os carbonos δ 153,54 (C-14), δ 118,10 (C-12) e δ 133,72 (C-11), o hidrogênio δ 6,64 (H-15) correlacionou com os carbonos δ 153,54 (C-14), δ 118,10 (C-12) e o H^1 em δ 7,27 (H-12) revelou encadeamento com os C^{13} δ 127,20 (C-16), 147,98 (C-13), δ 153,54 (C-14) (Espectro 54, Tabela 17).



Espectro 54 - Ampliação da correlação (HMBC) δ 7,09 (H-16), δ 6,64 (H-15), δ 7,27 (H-12) com os δ (C-11, C-12, 13, 14 e 16) da substância Guttiferone C do *bucketing* 50 e 52 em CD₃OD (500 MHz).

A parte aromática da substância foi identificada pelos experimentos de RMN 1D e 2D. Porém buscou-se investigar a massa através dos perfis de fragmentação pelas de baixa e alta resolução (ESI-EM e LC-MS) para definir a substância **guttiferona C** como sendo a que possuía o anel aromático tri substituído. Assim, os resultados geraram os seguintes perfis de fragmentação:

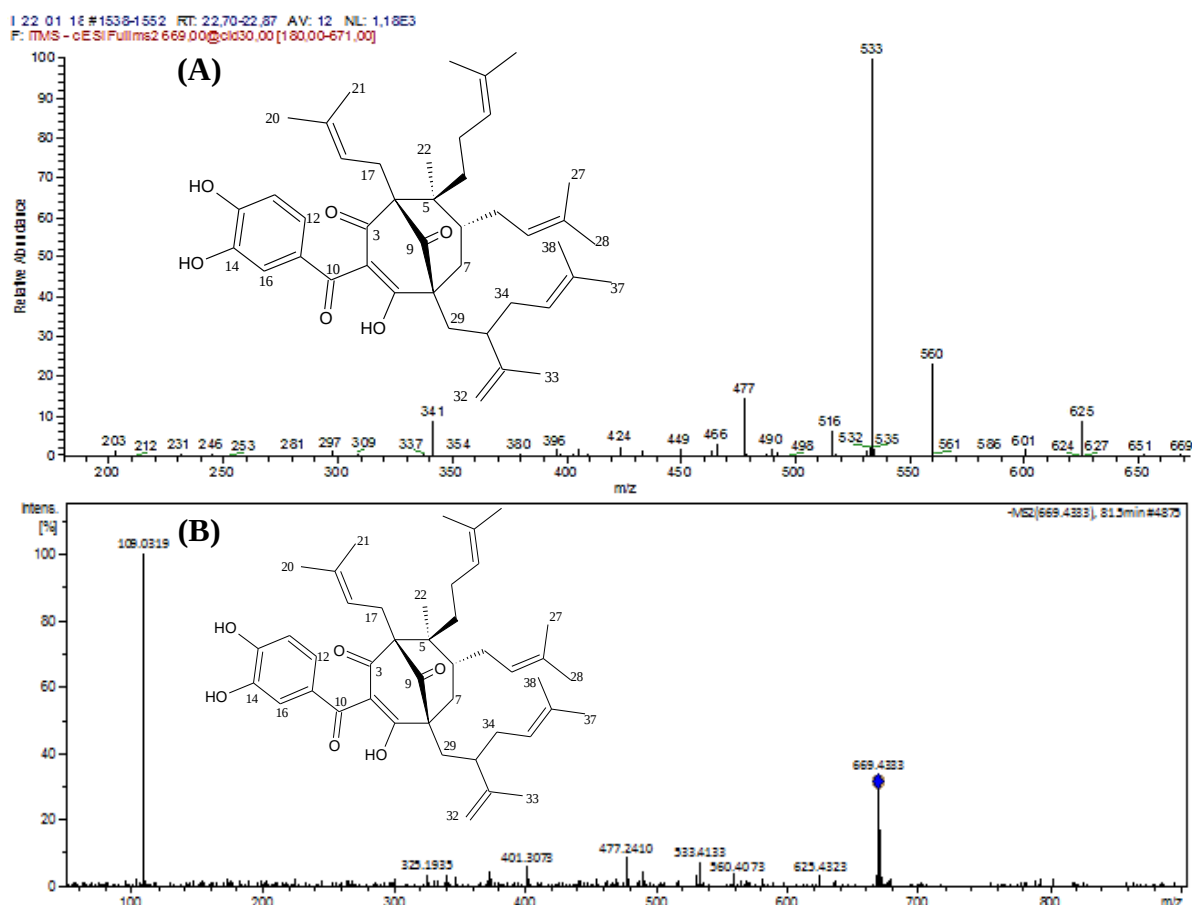


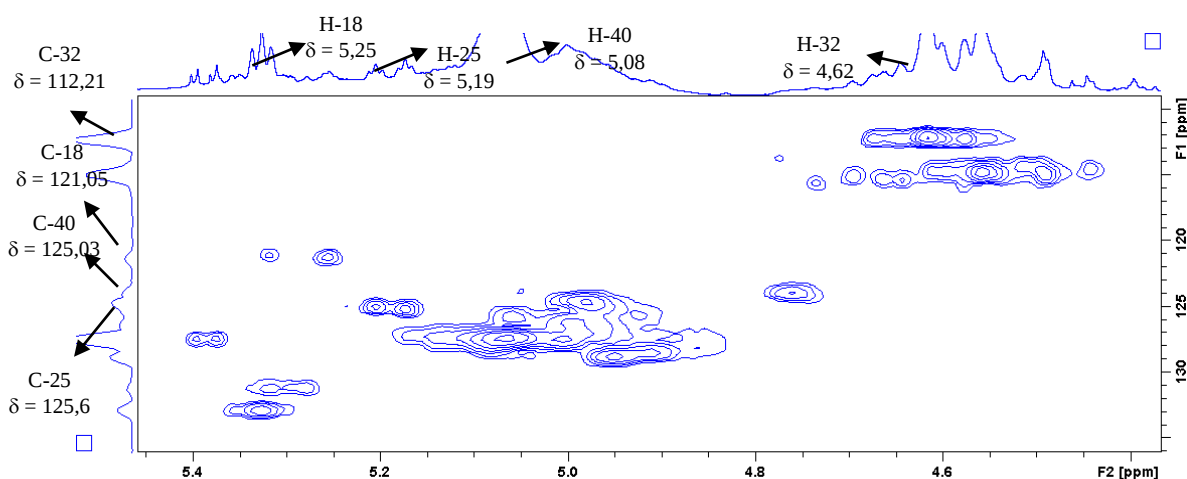
Figura 27 - Perfil de fragmentação ms^2 , $[M-H]^-$ dos íons: (A) ESI-EM m/z : 669 (30 eV); (B) LC-ESI-MS m/z : 669,4333;

A substância sugerida apresentou o mesmo perfil de fragmentação da benzofenona prenilada **guttiferona C**, além da massa de alta resolução de m/z : 669,4333 e fórmula molecular de $C_{43}H_{58}O_6$ com Erro[ppm]: 3,0 e mSigma: 1,4. O IDH calculado apresentou resultado de 15 corroborando com a estrutura sugerida, já que indicou 12 ligações duplas e 3 anéis.

O primeiro fragmento tanto no ESI-EM quanto por LC-MS foi o m/z : 560,4073 configurando a perda inicial de m/z : 109.0319, equivalente ao anel aromático tri substituído definido pelos deslocamentos dos H^1 δ 7,09 (H-16), δ 6,64 (H-15) e δ 7,27 (H-12) encontrados por RMN de H^1 e de C^{13} além do HSQC e HMBC.

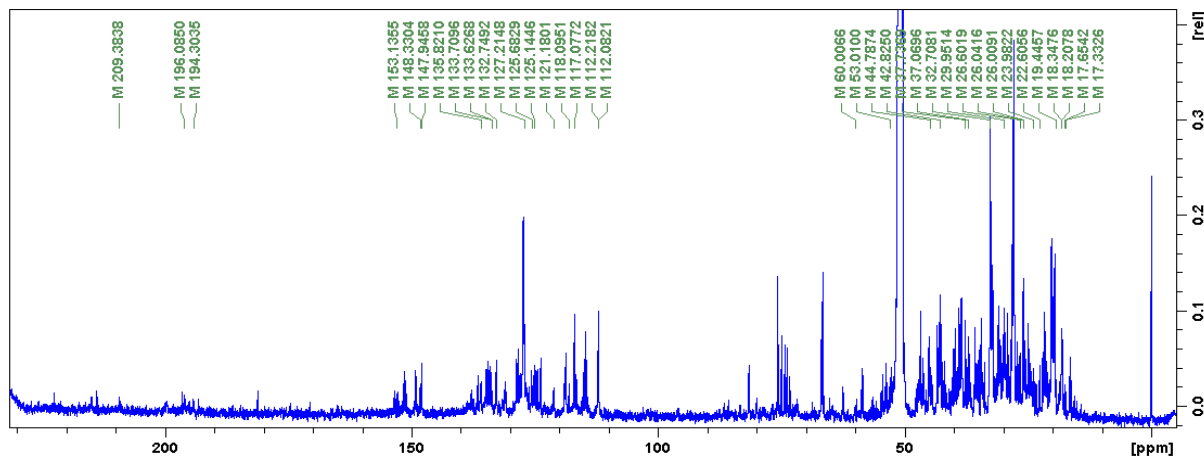
Os dados de massas (explorados no **item 5.3.2**, pág. 129) foram comparados junto a literatura de Lopes, 2014 e De Souza *et al.*, 2018 e as Database: HMDB, Pubchem e ChemSpider para auxiliar na proposta de identificação. Já os de RMN foram comparados aos da guttiferona C já relatada anteriormente por Gustafson *et al.*, 1992. Por meio das informações obtidas, foi possível não só confirmar a presença dos deslocamentos dos carbonos e hidrogênios do anel aromático, mas também encontrar outros presentes na substância.

Os deslocamentos de alguns dos principais carbonos prenilados (C-18, C-25, C-32 e C-40) foram encontrados nas correlações de HSQC com seus respectivos hidrogênios (Espectro 55, Tabela 16). Porém, o carbono C-37 correspondente a dupla ligação de uma das partes preniladas não pode ser determinado.

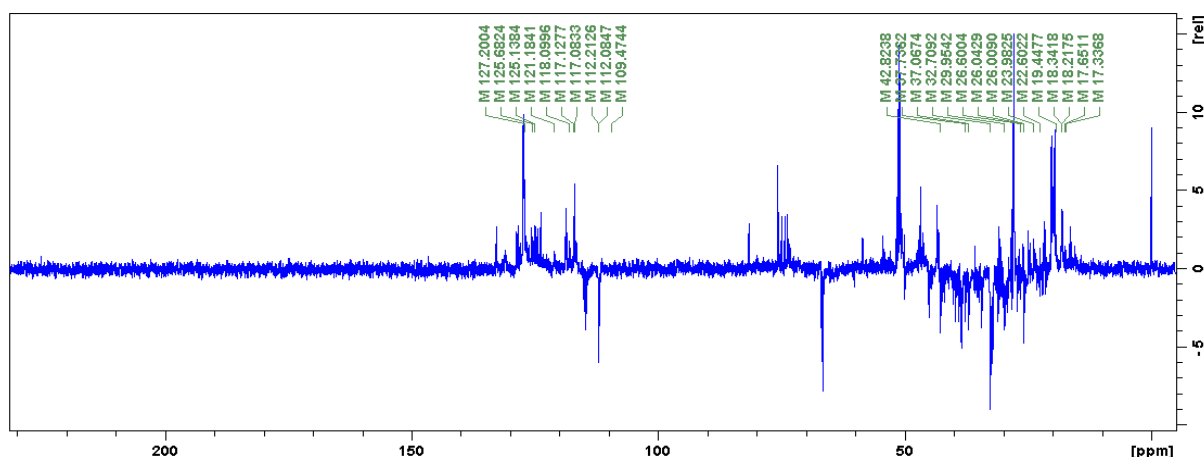


Espectro 55 - Ampliação da correlação (HSQC) δ 4,62 (H-32), δ 5,19 (H-25), δ 5,25 (H-18) e δ 5,08 (H-40) com os δ (C-32, 25, 18 e 40) da substância Guttiferone C em CD_3OD (500 MHz).

Os experimentos de C^{13} e Dept135 ainda possibilitaram a verificação da presença dos carbonos metínico (CH), metilênicos (CH_2) e metílicos (CH_3), além dos quaternários carbonílicos ($C=O$) e dos hidroxilados presentes na estrutura da Guttiferona C (Espectro 56 e 57, Tabela 18).



Espectro 56 – Espectro de C^{13} referente aos deslocamentos dos carbonos da substância guttiferona C do *bucketing* 50 e 52 em CD_3OD (125 MHz).



Espectro 57 – Espectro de Dept135 referente aos deslocamentos dos carbonos da substância guttiferona C do *bucketing* 50 e 52 em CD_3OD (500 MHz).

Tabela 14 – Deslocamentos químicos obtidos por RMN de H^1 para a Guttiferona C.

Atribuições $H^1 - H^1$ (Principais sinais obtidos)*				Guttiferona C Gustafson <i>et al.</i> (1992)**		
Nº	δ	M	J(Hz)	δ	M	J(Hz)
H-12	7,27	d	1,80	7,18	-	-
H-15	6,64	d	8,10	6,69	-	-
H-16	7,09	dd	8,10 e 1,80	6,98	-	-
H-18	5,25	t	5,58	5,02	-	-
H-25	5,19	m	-	4,89	-	-
H-32	4,62	m	-	4,50	-	-
H-40	5,08	m	-	5,08	-	-

*RMN de H^1 : guttiferona C em equipamento de 500 MHz com CD_3OD .

** RMN de H^1 : guttiferona C em equipamento de 125 MHz com CD_3OD com 0,1% de TFA.

Tabela 15 – Principais correlações H^1-H^1 obtidos por COSY para a Guttiferona C.

Atribuições $H^1 - H^1$	(Principais sinais obtidos)*
Nº	δ
H-16 – H-15	7,09 – 6,64
H-16 – H-12	7,09 – 7,27
H-15 – H-16	6,64 – 7,09
H-12 – H-16	7,27 – 7,09

*RMN de H^1 : guttiferona C em equipamento de 500 MHz com CD_3OD .

Tabela 16 - Principais correlações de H^1-C^{13} obtidas por HSQC para a Guttiferona C.

Atribuições $H^1 - C^{13}$	(Principais sinais obtidos)*	Guttiferona C Gustafson <i>et al.</i> (1992)**
Nº	δ	δ
C-15 – H-15	116,9 – 86,64	115,0 – 6,69
C-16 – H-16	127,20 – 7,09	125,1 – 6,98
C-12 – H-12	118,10 – 7,27	117,3 – 7,18
C-18 – H-18	121,05 – 5,25	121,26 – 5,02
C-25 – H-25	125,6 – 5,19	125,6 – 4,89
C-32 – H-32	112,21 – 4,62	113,4 – 4,50
C-40 – H-40	125,05 – 5,08	125,1 – 5,08

*RMN de H^1 : guttiferona C em equipamento de 500 MHz com CD_3OD .

** RMN de H^1 : guttiferona C em equipamento de 125 MHz com CD_3OD com 0,1% de TFA.

Tabela 17 - Correlações de H^1-C^{13} obtidas por HMBC para a Guttiferona C. “continua”

Atribuições $H^1-C^{13}-C^{13}$	Principais sinais Obtidos*	Guttiferona C Gustafson <i>et al.</i> (1992)**
H-12 – C-16	7,27 – 127,60	7,18 – 125,1
H-12 – C-13	7,27 – 147,98	-
H-12 – C-14	7,27 – 153,54	7,18 – 152,4
H-15 – C-14	6,64 – 153,54	6,69 – 152,4
H-15 – C-12	6,64 – 118,10	-
H-15 – C-11	-	6,69 – 117,3
H-15 – C-13	-	6,69 – 146,3
H-16 – C14	7,09 – 153,54	6,98 – 152,4
H-16 – C12	7,09 – 118,10	6,98 – 117,3
H-16 – C-10	-	6,98 - 195,6

*RMN de H^1 : guttiferona C em equipamento de 500 MHz com CD_3OD .

** RMN de H^1 : guttiferona C em equipamento de 125 MHz com CD_3OD com 0,1% de TFA.

Tabela 18 – Deslocamentos químicos de C¹³, H¹ e correlação HMBC da substância Guttiferona C.

Guttiferone C			Guttiferona C	
(Principais deslocamento obtidos)*			Gustafson <i>et al.</i> (1992)**	
Nº	δ C¹³	δ H¹ (m, J)	δ C¹³	δ H¹ (m, J)
C-1	196,09	-	196,0	-
C-2	117,07	-	117,9	-
C-3	194,3	-	195,9	-
C-4	-	-	70,5	-
C-5	53,01	-	53,0	-
C-6	-	-	41,2	1,80
C-7	42,82	-	43,6	1,90
C-8	60,0	-	60,02	-
C-9	209,38	-	210,21	-
C-10	-	-	195,6	-
C-11	133,72	-	129,4	-
C-12	118,1	7,27 (d, 1,80)	117,3	7,18
C-13	147,96	-	146,2	-
C-14	153,54	-	152,4	-
C-15	116,98	6,64 (d, 8,10)	115,0	6,69
C-16	127,2	7,09 (dd, 8,10 e 1,80)	125,1	6,98
C-17	26,1	-	26,6	2,62
C-18	121,18	5,25 (t, 5,58)	121,26	5,02
C-19	135,82	-	135,8	-
C-20	26,04	-	26,44	1,71
C-21	18,34	-	18,4	1,56
C-22	19,44	-	19,4	1,16
C-23	35,95	-	36,42	1,22
C-24	29,95	-	29,98	2,02
C-25	125,6	5,19 (m)	125,6	4,89
C-26	133,62	-	133,6	-
C-27	26,01	-	26,0	1,65
C-28	18,2	-	18,2	1,48
C-29	37,73	-	37,7	1,90
C-30	-	-	44,7	2,55
C-31	148,33	-	148,9	-
C-32	112,21	4,62 (m)	113,4	4,50
C-33	17,65	-	17,8	1,60
C-34	32,7	-	32,8	1,40
C-35	37,07	-	36,8	1,81
C-36	-	-	146,9	-
C-37	112,8	-	110,4	4,62
C-38	22,6	-	22,8	1,67
C-39	23,98	5,08 (m)	24,01	1,84
C-40	125,13	-	125,1	5,08
C-41	132,24	-	132,8	-
C-42	-	-	25,9	1,64
C-43	17,33	-	17,7	1,57

*RMN de H¹: guttiferona C em equipamento de 500 MHz com CD₃OD.

** RMN de H¹: guttiferona C em equipamento de 125 MHz com CD₃OD com 0,1% de TFA.

5.5. Análise Quimiométrica a partir dos dados de Espectrometria de Massas

O cuidado inicial com os ajustes dos parâmetros de análise para a obtenção e processamento dos dados por EM dos extratos de ambas as espécies de abelhas, possibilitou a aquisição de uma matriz completa com os dados de intensidade dos íons no modo negativo das amostras, sendo melhor investigada pela quimiometria. As matrizes padronizadas foram pré-processadas pelo método (SNV – Transformação Normal de Padrão de Variação) junto ao software Chemoface® e obtidos os gráficos de PCAs (*scores*, *loadings*) tridimensionais e HCA, conforme evidenciado na sequência:

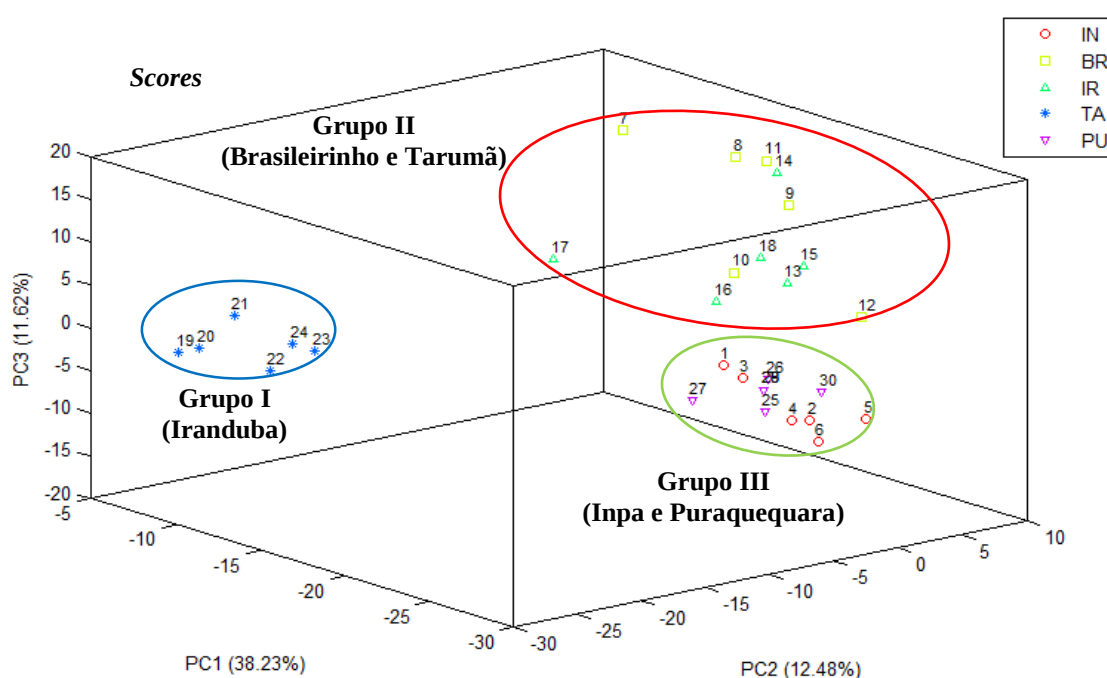


Figura 28 – Gráfico de *scores* tridimensional (PC1 x PC2 x PC3) das abundâncias relativas (%) referidas aos íons de maior intensidade revelados [M-H]⁻, das amostras da espécie *M. seminigra* dos cinco pontos de coleta.

O gráfico de PCA (*scores*) das amostras de *M. seminigra* mostrou a formação de três grupos e uma somatória de variância explicada de 62,32%, assim mais da metade do modelo pode ser explicado utilizando apenas três componentes. A análise da figura 28 também mostrou diferentes agrupamentos em relação aos pontos de coleta. O grupo I mais isolado representa as amostras (19-24) do ponto de coleta do Irاندوبا, sugerindo que a geoprópolis desta localidade apresenta uma formação química singular em relação as outras áreas de coleta.

Já as amostras (7-18) do grupo II, onde estão inseridas as regiões do Brasileirinho (7-12) e Tarumã (13-18), indicaram ser um grupo com uma maior separação entre os indivíduos, o que provavelmente indica ser relativo à presença e intensidade de um conjunto de íons específicos que provocou a separação das mesmas.

Em relação ao grupo III formado por amostras do Inpa (1-6) e do Puraquequara (25-30), o gráfico revelou uma distribuição mais próxima entre as amostras, podendo ser indicativo de uma composição química mais semelhante para a geoprópolis destas regiões.

Os íons responsáveis pela maneira como as amostras se distribuíram em grupos foram representados no gráfico de PCA (*loadings*) através de uma variância explicada de 63,43%, conforme ilustrado na figura (29):

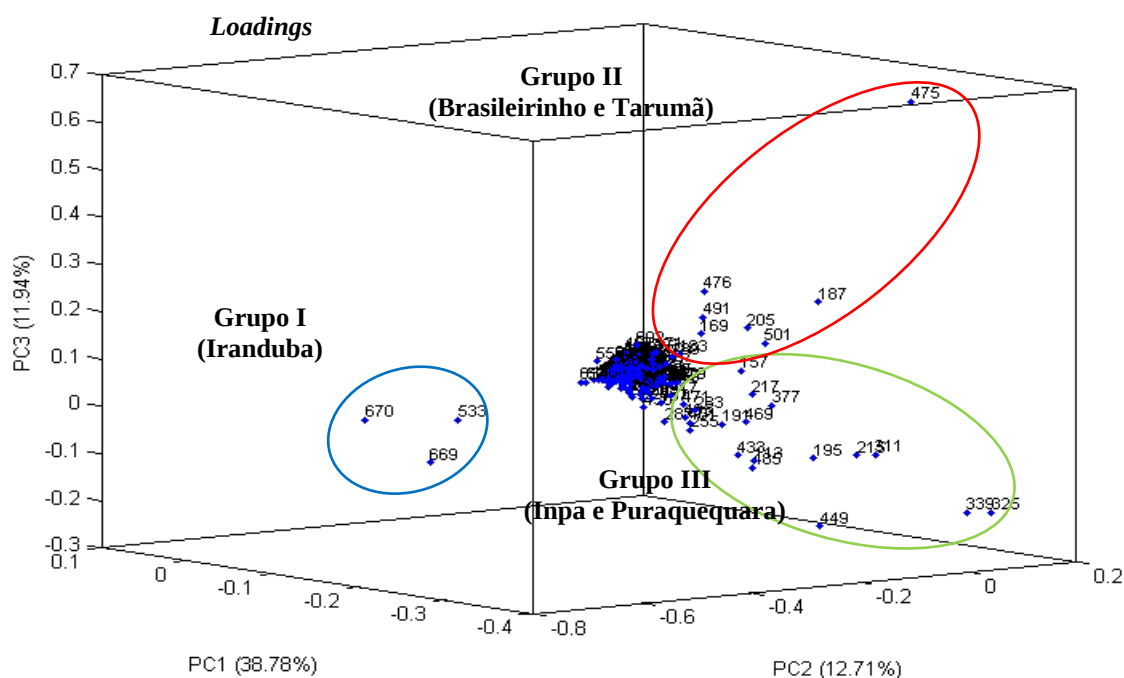


Figura 29 - Gráfico de *loadings* (PC1 x PC2 x PC3) das abundâncias relativas (%) dos íons de maior intensidade revelados [M-H]⁺ das amostras da espécie *M. seminigra* dos pontos de coleta, pré-processamento SNV.

Os íons pertencentes ao grupo I (Irاندوبا) mais isolado revelaram valores de *m/z*: 533, 669 e 670 característicos de substâncias já identificadas na literatura como benzofenonas preniladas (DE SOUZA *et al.*, 2018;) sendo quase que exclusivas das amostras desta localidade.

A presença destes íons pode estar associada a visitas mais frequentes a flores e plantas das famílias Hypericaceae (Clusiaceae), visto que esses íons podem ser considerados quimiomarcadores do gênero *Vismia* por sua constante presença nos extratos, como relata SeO e colaboradores (2000) em seu estudo com extrato de raízes de *Vismia guianenses* (planta constantemente visitada pela *M. seminigra*) do qual foram isoladas e identificadas por RMN e HR-EIMS cinco tipos de benzofenonas. Além do gênero *Clusia* com período de floração estendido ao longo de todo o ano auxilia na servindo de fonte polínica para abelhas da espécie *M. seminigra* e possui vasta presenças da guttiferonas A, B e C entre outras (ABSY; KERR,

1977, 1980; BAGGETT; MAZZOLA; KENNELLY, 2005; SEO *et al.*, 2000; OLIVEIRA; ABSY; MIRANDA, 2009; DA SILVA, 2010).

O grupo III (Inpa e Puraquequara) apresentou a separação pelos íons 191, 195, 215, 217, 255, 287, 311, 325, 339, 377, 433, 449, 469, 485, sugestivos de substâncias relatadas como possíveis ácidos fenólicos e derivados além de flavonoides glicosilados (DA SILVA *et al.*, 2013; BANKOVA *et al.*, 2016;).

A literatura indica que algumas famílias como Fabaceae, Myrtaceae, Melastomataceae e Sapindaceae possuem uma constituição química rica na classe dos flavonoides e também de ácidos fenólicos. Estudos recentes indicam que as plantas destas famílias foram as mais visitadas num período de 8 meses pela espécie *M. seminigra* (OLIVEIRA; ABSY; MIRANDA, 2009 FERREIRA; ABSY, 2017;). A possível constância na visita dessas plantas pode ter favorecido a presença de mais íons precursores das substâncias fenólicas.

Já o grupo II (Brasileirinho e Tarumã) apresentou os íons m/z : 169, 183, 187 que segundo seus perfis de fragmentações (**item 5.3.2**) sugeriram ser de ácidos fenólicos e o m/z : 501 de benzofenona, além dos íons m/z : 475, 476. A presença do íon m/z : 501 no grupo II, sugere que nestas localidades, mais precisamente no Brasileirinho possam existir plantas da família Hypericaceae (Clusiaceae) porém como apenas um íon característico de benzofenona foi detectado, pode ser plausível inferir que a visita a plantas dessa família seja menor, se comparada a outras como Fabaceae e Myrtaceae ricas em constituintes fenólicos.

A análise dos *fingerprints* das amostras do Brasileirinho (8 e 9) e do Tarumã (14 e 15) (Figura 30), mostrou que o grupo II possui uma uniformidade quanto a presença dos íons m/z : 183, 187, 475 e 501 responsáveis pela sua forma de separação. Além disso, mostra através da presença do íon m/z : 501 nas amostras (8 e 9) que a região do Brasileirinho também possui plantas que tem a benzofenona como constituinte químico.

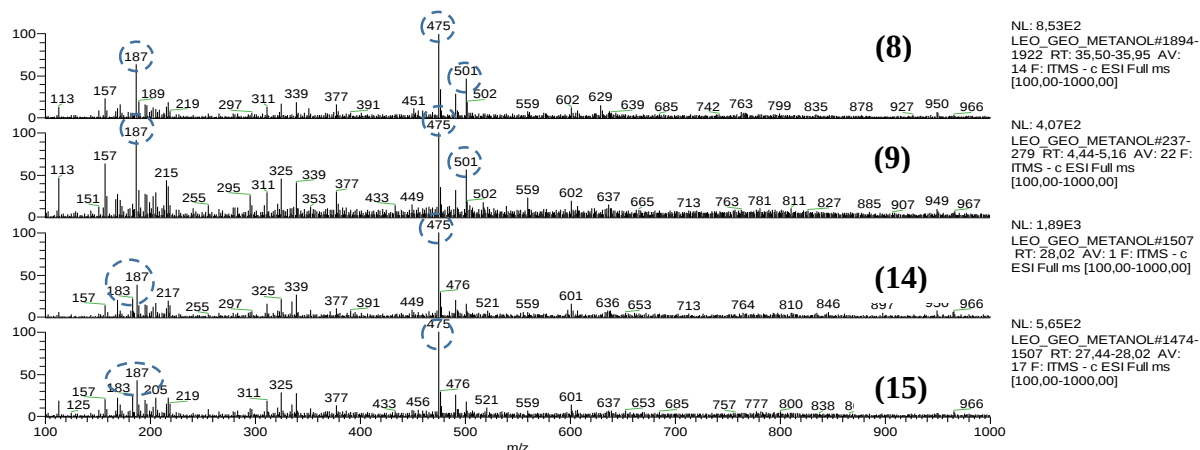


Figura 30 – Espectros de massas das amostras de *M. seminigra* revelando a presença e ausência dos íons 187, 475 e 501 do Grupo II indicado no PCAs (*loadings*).

As figuras 28 e 29 referentes aos PCAs (*scores* e *loadings*) da espécie *M. seminigra* mostraram uma composição química diferenciada da geoprópolis para cada grupo formado. A evidência pode ser explicada pela característica mais generalista desta abelha ao compor o produto. As abelhas do grupo I (mais distinto) provavelmente visitaram com mais frequência plantas ricas em substâncias químicas como as benzofenonas, enquanto que a composição do material do grupo II apresentou maior distinção química (visitando espécies variadas), já o grupo III apresentou apenas substâncias com mais características fenólicas. A organização das amostras nesses grupos foi confirmada nos HCAs na figura (31) abaixo:

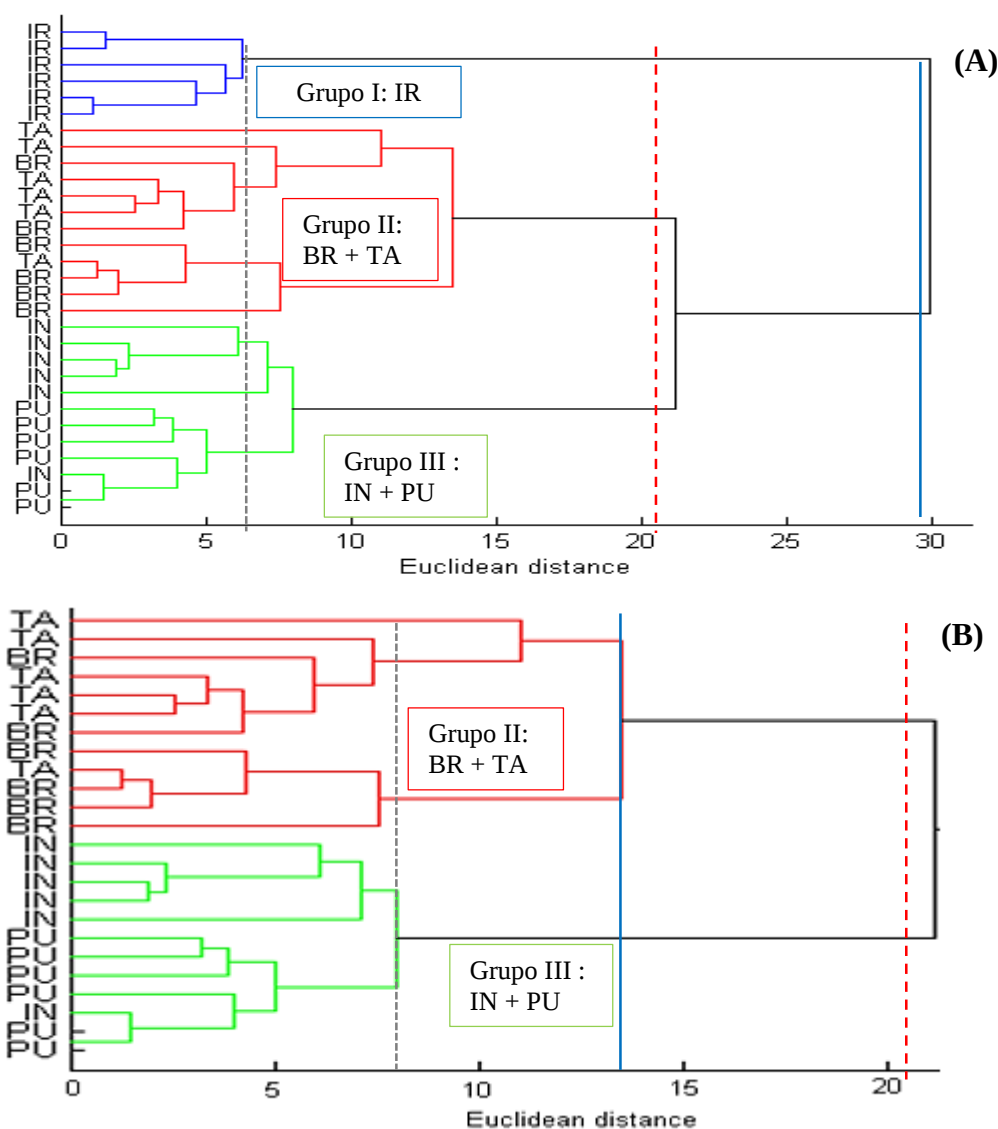


Figura 31 – Dendrograma (HCA) distância euclidiana. **(A)** Formação de três grupos; **(B)** Formação de dois grupos; IR: Iranduba; BR: Brasileirinho; TA: Tarumã; IN: Inpa; PU: Puraquequara

A análise do dendrograma **(A)** mostrou o grau de similaridade (linha vermelha) em torno de 22 elencando três grupos de geoprópolis. O grupo I (Iranduba) apresentou uma maior distinção química cerca de 28 (linha azul) em relação aos grupos II e III, tal característica é

comprovada no gráfico de *loadings* com a presença de substâncias da classe das benzofenonas. Observando apenas os indivíduos presentes no grupo I, foi possível perceber que houve uma menor variabilidade química em torno de 7 (linha cinza) que os grupos II e III, visto que a provável constância na visita de um mesmo recurso polínico gerou maior presença de íons de benzofenonas.

No agrupamento **(B)** foi possível notar que os grupos (II e III) possuem constituição química mais próxima entre si (linha vermelha), muito por visitarem famílias de plantas ricas em substâncias fenólicas. Porém a análise apenas das amostras do grupo II revelou que sua a variabilidade química foi maior (linha azul) entre os seus indivíduos quando comparada a todas as outras amostras do grupo I, onde quase que exclusivamente as benzofenonas se fizeram presentes.

Já o grupo III apresentou uma menor variabilidade química (linha cinza) entre todas os indivíduos quando comparados aos representantes do grupo II e. A explicação pode estar na proximidade das amostras do Inpa e às do Puraquequara quanto a presença de mais íons característicos de substâncias fenólicas oriundos provavelmente da visita de plantas de várias das famílias Caesalpiniaceae, Myrtaceae, Fabaceae entre outras.

As amostras da espécie *M. interrupta* também passaram pelo mesmo processamento e foi possível obter o gráfico de PCA (*scores*) conforme figura (32):

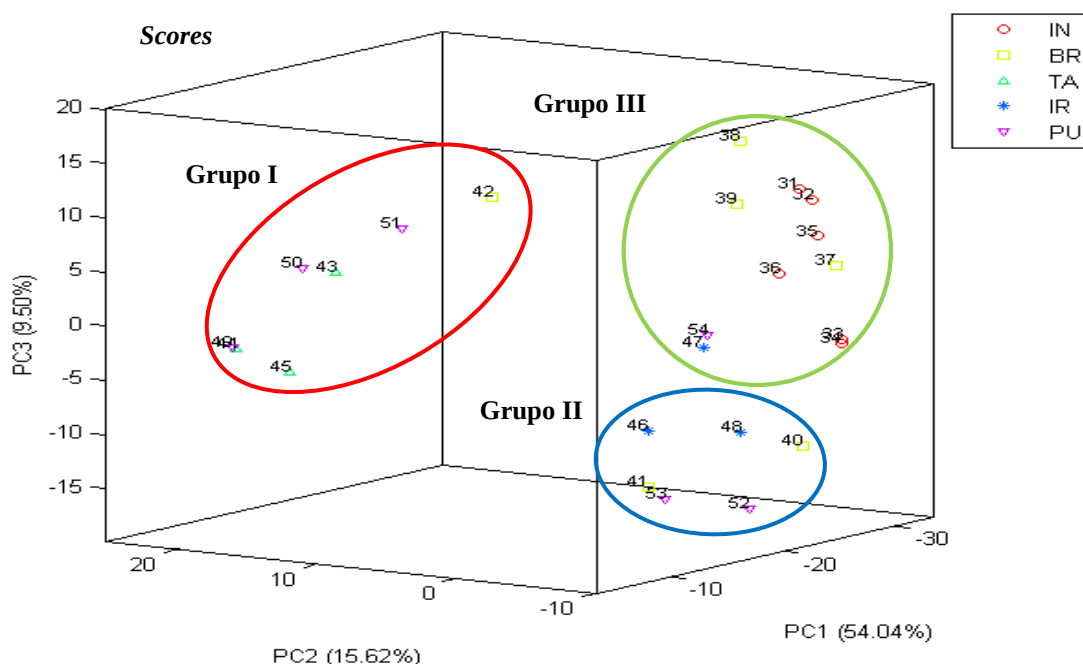


Figura 32 - Gráfico de *scores* (PC1 x PC2 x PC3) das abundâncias relativas (%) dos íons de maior intensidade revelados $[M-H]^+$ das amostras da espécie *M. interrupta* dos cinco pontos de coleta, pré-processamento SNV.

A análise do gráfico de PCA (*scores*) das amostras de *M. interrupta* mostrou a separação dos indivíduos em três grupos e o modelo apresentou uma variância explicada de 79,16% utilizando as componentes PC1 x PC2 x PC3.

O grupo I apresentou uma amostra do Brasileirinho (42), todas do Tarumã (43-45) e três do Puraquequara (49-51), ou seja, menos populoso, porém com a presença expressiva de amostras de uma mesma região, a do Tarumã. Já o grupo II isolou membros dos pontos de coleta Brasileirinho (40-41), duas do Iranduba (46-48) e duas do Puraquequara (52-53), apresentado composição mais distribuída (equilibrado), porém sem apresentar exemplares da localidade do Inpa.

O grupo III isolou todos os membros da região do Inpa (31-36) antes não identificada nos grupos I e II, três amostras do Brasileirinho (37-39), uma do Iranduba (47) e uma do Puraquequara (54), este mostrou ser um agrupamento mais diferenciado e populoso em relação aos outros formados. A tentativa de diferenciação química entre as amostras pôde ser explicada pela presença dos íons no gráfico de PCA (*loadings*) (Figura 33).

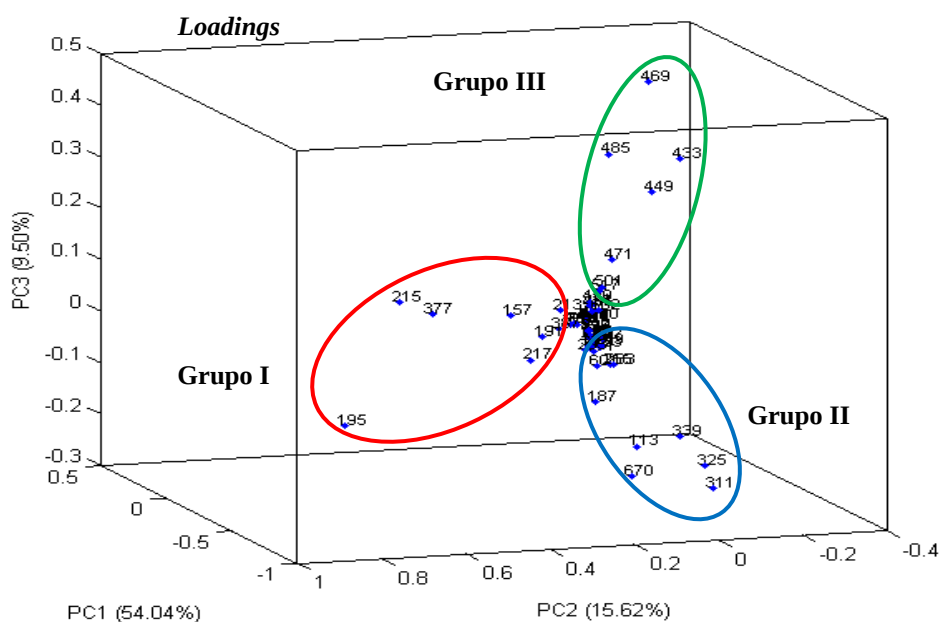


Figura 33 - Gráfico de *loadings* tridimensional (PC1 x PC2 x PC3) das abundâncias relativas (%) dos íons de maior intensidade revelados [M-H]⁺ das amostras da espécie *M. interrupta* dos cinco pontos de coleta.

O gráfico de *loadings* revelou que 79,15% do modelo pôde ser explicado pelas três componentes. No grupo I (menos populoso) apresentou os íons *m/z*: 157, 191, 195, que segundo suas fragmentações (**item 5.3.2.**) sugeriram ser de ácidos fenólicos, além da presença dos íons 215, 217 e 377, que já haviam sido relatados em estudo com própolis de três espécies de abelhas sem ferrão do gênero *Scaptotrigona* porém sem identificação de estrutura química (SAWAYA,

2009). A ausência de amostras da região do Iranduba e Brasileirinho refletiu diretamente na ausência de íons previamente definidos como sendo de benzofenonas oriundas da visita de plantas das famílias Hypericaceae e Clusiaceae.

Já o grupo II (equilibrado) apresentou os íons m/z : 187, 311, 325, 339, 601, 670, que foram propostos como sendo ácidos fenólicos e derivados e benzofenonas preniladas. A variabilidade do grupo II indicou que as abelhas da espécie *M. interrupta* visitaram plantas de origem variada como comprovado em estudos realizados com pólenes de ninhos desta espécie, que revelaram a visita de flores das famílias Melastomataceae (74%), Fabaceae (13,42%), Euphorbiaceae (3,72%) e Solanaceae (0,94%) ricas em vários constituintes fenólicos como ácidos fenólicos e principalmente flavonoides, além da Hypericaceae (6,3%) (*Vismia type*) ricas em benzofenonas (BAGGETT; MAZZOLA; KENNELLY, 2005; FERREIRA; ABSY, 2013, 2017).

Para o grupo III (mais populoso) com amostras das regiões Inpa (31-36), Brasileirinho (37-39), Iranduba (47) e Puraquequara (54), o gráfico de *loadings* revelou os íons m/z : 433, 449 e 501, que foram comparados junto a relatos da literatura e classificados como sendo flavonoides glicosilados e benzofenonas (DA SILVA *et al.*, 2013; LOPES, 2014).

Os grupos I, II e III apresentaram misturas entre as amostras dos cinco pontos de coleta o que já era esperado, visto que a espécie *M. interrupta* possui uma característica mais restritiva. Analisando os *loadings* foi possível identificar que os grupos II e III possuem em comum a presença de íons característicos de benzofenonas, o que sugeriu que a presença de amostras de uma região (Iranduba) poderia estar interferindo a proximidade. O dado pode ser observado no agrupamento no gráfico de HCA abaixo:

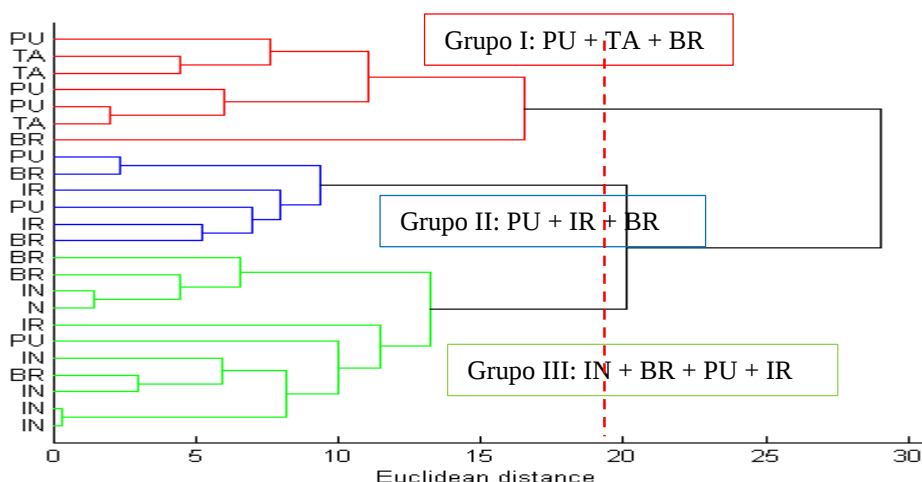


Figura 34 - Dendrograma (HCA) distância euclidiana, amostras da espécie de *M. interrupta* com representação dos três grupos formados.

IR: Iranduba; BR: Brasileirinho; TA: Tarumã; IN: Inpa; PU: Puraquequara

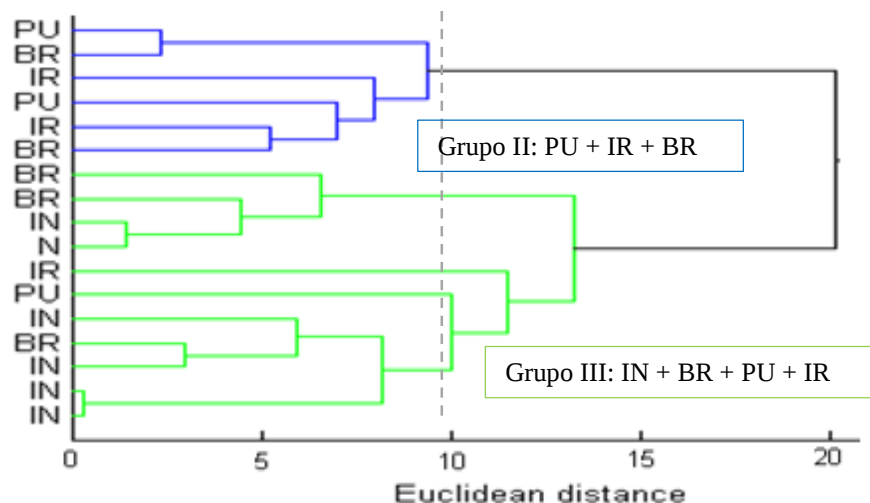


Figura 34.1 - Dendrograma (HCA), distância euclidiana, das amostras da espécie de *M. interrupta* com representação dois grupos formados.

IR: Iranduba; BR: Brasileirinho; TA: Tarumã; IN: Inpa; PU: Puraquequara

A representação do dendrograma (HCA) gerou três agrupamentos com índice de similaridade química próximo de 19 (linha vermelha) na figura (34). O grupo I demonstrou ser o mais distinto de todos podendo ser explicado por dois fatores, o comparecimento exclusivo de amostras do Tarumã o que fez com que reduzisse a presença de substâncias distintas e aumentasse a permeância de substâncias mais comuns como os ácidos fenólicos.

Já a subdivisão para os grupos II e III (Figura 34.1) revelou um índice de similaridade química maior entre os grupos, provavelmente pela presença das amostras do Iranduba e Brasileirinho (37, 38 e 41), pois estas apresentaram relação direta com o aparecimento dos íons de benzofenonas prenilhadas previamente observados no gráfico de PCA (*loadings*) e como evidenciado nos espectros de massas da área do Brasileirinho.

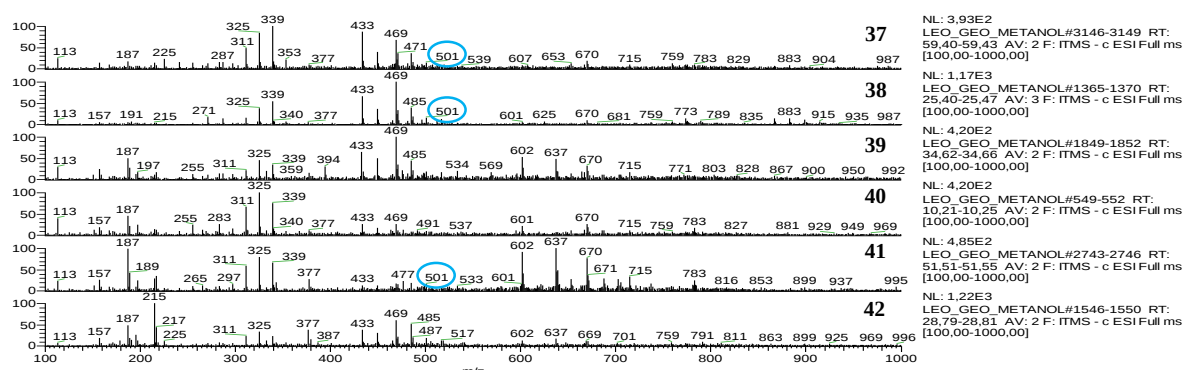


Figura 35 – Espectros das amostras do Brasileirinho confirmando a presença de benzofenonas.

Os indivíduos do grupo II apresentaram índice de similaridade química de 9 (linha cinza), sendo o mais baixo de todos os grupos já que possui uma distribuição equilibrada de indivíduos de regiões diferentes que contribuem quimicamente com uma maior presença de ácidos fenólicos e derivados e benzofenonas. Já o grupo III apresentou entre seus exemplares

nível de similaridade química de 13,5 o que corroborou com os dados apresentados no gráfico da distribuição química dos íons no PCA característicos de substâncias flavonoídicas (maior) devido a presença da região do Inpa, como já comprovado pela análise por RMN.

A análise quimiométrica mostrou que as regiões onde as abelhas *M. seminigra* e *M. interrupta* estão inseridas influenciam diretamente na composição química da geoprópolis. Para ambas as espécies a região do **Inpa** mostrou ser rica em flavonoides glicosilados e ácidos fenólicos, o **Irاندوبا** e algumas representantes do **Brasileirinho** em benzofenonas preniladas e **Tarumã** e **Puraquequara** com uma composição menos intensa de derivados de ácidos fenólicos.

Tabela 19 – Principais íons identificados nos grupos formados pela análise quimiométrica da *M. seminigra*.

GRUPOS	ÍONS [M-H] ⁻	AMOSTRAS	REGIÃO	POSSÍVEL ORIGEM BOTÂNICA	CLASSE QUÍMICA
Grupo I	669, 533	19-24	Irاندوبا	Hypericaceae Clusiaceae	Benzofenona*
Grupo II	169, 183, 187, 501	7-12	Brasileirinho Tarumã	Fabaceae	Ácidos fenólicos
		13-18		Myrtaceae Hypericaceae	Benzofenona*
Grupo III	191, 195,	1-6 25-30	Inpa Puraquequara	Fabaceae	Ácidos fenólicos Flavonoides**
	255, 311,			Caesalpiniaceae	
	325, 339,			Myrtaceae	
	433, 449			Sapindaceae	

* Classe química exclusiva da região do Brasileirinho e Irاندوبا.

** Classe química exclusiva da região do Inpa.

Tabela 20 – Principais íons identificados nos grupos formados pela análise quimiométrica da *M. interrupta*.

GRUPOS	ÍONS [M-H] ⁻	AMOSTRAS	REGIÃO	POSSÍVEL ORIGEM BOTÂNICA	CLASSE QUÍMICA
Grupo I	191, 195	42, 43-45 49-51	Brasileirinho Tarumã Puraquequara	Fabaceae Myrtaceae Hypericaceae	Ácidos fenólicos
Grupo II	187,311, 325,339, 601	40-41	Brasileirinho Irاندوبا Puraquequara	Melastomataceae	Ácidos fenólicos Benzofenona*
		46 e 48 52-53		Fabaceae Euphorbiaceae Hypericaceae	
Grupo III	433,	31-36	Inpa	Fabaceae	Flavonoides** Benzofenona*
	449,	37-39	Brasileirinho Irاندوبا	Euphorbiaceae	
	501	47 e 54	Puraquequara	Hypericaceae	

* Classe química exclusiva da região do Brasileirinho e Irاندوبا.

** Classe química exclusiva da região do Inpa.

Quimicamente quanto aos íons das substâncias não houve distinção entre a geoprópolis da espécie mais generalista (*M. seminigra*) e a mais restritiva (*M. interrupta*), apenas houve distinção entre a composição química do produto nas regiões de coleta.

5.5.1 Identificação das principais substâncias químicas a partir da análise Quimiométrica

As análises quimiométricas (PCA – *loadings*) dos dados de EM das espécies de abelhas *M. seminigra* e *M. interrupta* mostraram que a tipificação por região ocorreu devido a presença de diferentes íons. Os primeiros íons m/z : 169, 187, 191, 195, 215, 217, 311, 325, 339 identificados juntos aos gráficos bidimensionais de PCAs *loadings* foram explorados por EM/EM. Para a certificação da massa de algumas substâncias, foi necessária a consulta da massa de alta resolução por LC-ESI-MS/MS e os perfis de fragmentação comparados a literatura.

Os primeiros íons m/z : 169, 187, 191 e 195 classificados como ácidos fenólicos estavam presentes nas amostras de ambas as espécies e os perfis de fragmentação obtidos por ESI-MS/MS são revelados na sequência:

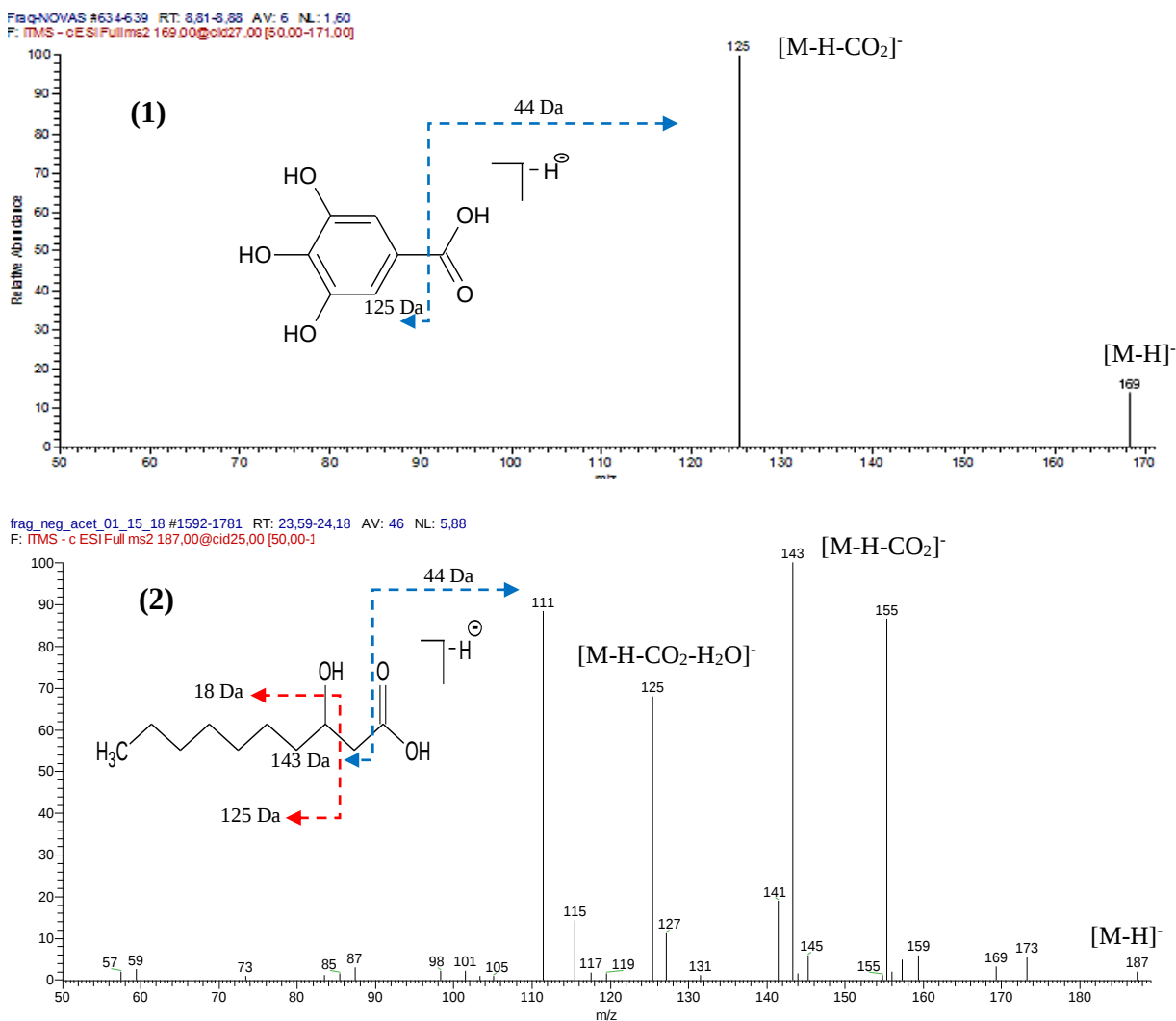


Figura 36 – Perfil de fragmentação ms^2 modo negativo dos íons *quasi* moleculares (1) m/z : 169 do ácido gálico e (2) m/z : 187 do ácido 3-hidroxidecanóico utilizando 27 eV e 25 eV de energia de colisão.

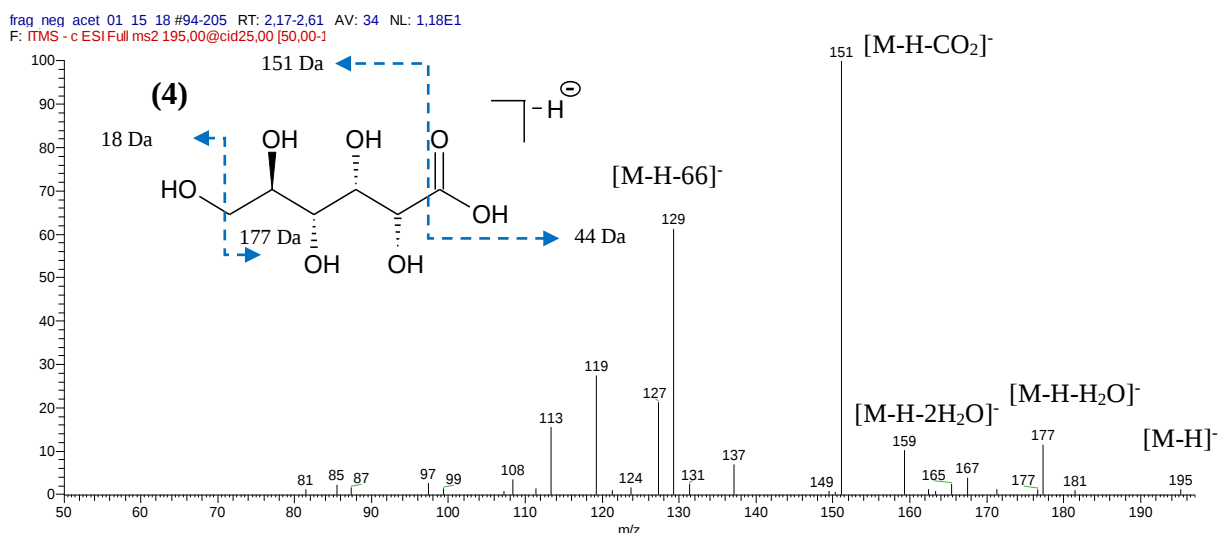
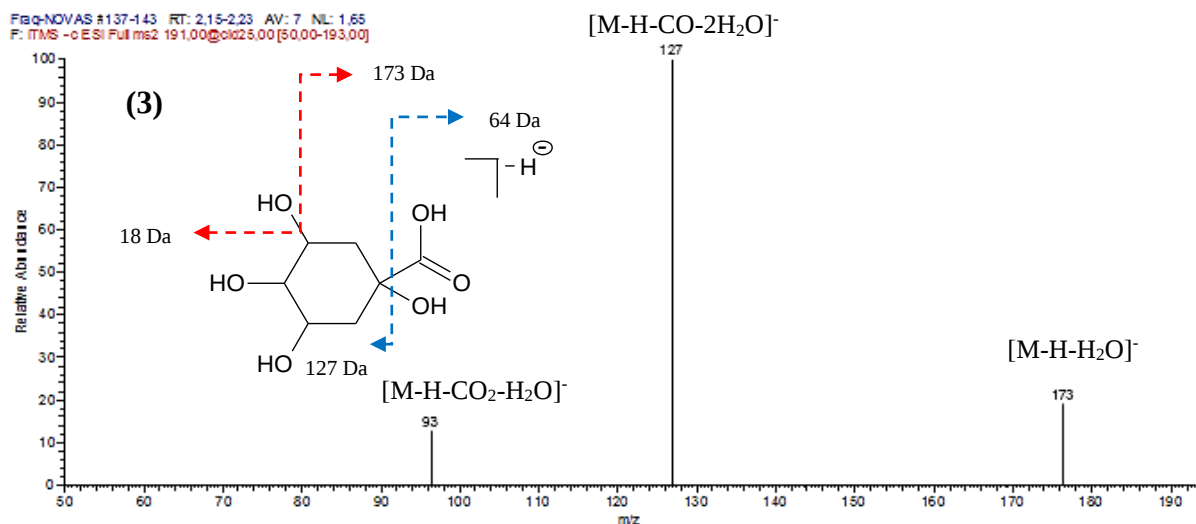


Figura 37 - Perfil de fragmentação ms^2 $[M-H]^-$ dos íons *quasi* moleculares (3) m/z : 191 do ácido quínico e (4) m/z : 195 do ácido glucônico, todos com aplicação de energia de colisão de 25 eV.

A análise dos perfis de fragmentação dos íons precursores m/z : 169, 187, 191 e 195 permitiu caracterizar junto a estudos anteriores, que os mesmos faziam referência aos ácidos gálico, 3-hidroxicanônico, quínico e ao ácido glucônico sem a presença de um átomo de hidrogênio. A energia de 27 eV aplicada ao íon m/z : 169 da substância (1), foi suficiente para que a sua fragmentação motivasse o surgimento do íon m/z : 125 $[M-44-H]^-$ que referente a uma perda da molécula de dióxido de carbono ($-CO_2$). O perfil de fragmentação corroborou com o revelado na figura do dado com o encontrado em estudos anteriores realizados com extratos etanólicos de geoprópolis das espécies *M. mondury* e *M. fasciculata* Smith.

Já a substância (2) apresentou o íon precursor m/z : 187 que foi caracterizado como proposta do ácido 3-hidroxicanônico. O seu perfil de fragmentação revelou o primeiro produto m/z : 143 $[M-44-H]^-$ como sendo uma perda equivalente a CO_2 , outra perda principal foi

referente à saída da molécula de H₂O gerando o íon m/z : 125 [M-44-18-H]⁻ (WEAVER *et al.*, 1986; TORRES *et al.*, 2008;).

A fragmentação do íon precursor m/z : 191 da substância **(3)**, gerou os íons m/z : 127 [M-64-H]⁻ equivalente a perda de duas moléculas de H₂O e uma CO, o íon: 173 [M-18-H]⁻ foi gerado a partir da saída da molécula de água. A outra perda que pode ocorrer na estrutura, é a saída de três moléculas de água e uma de CO₂ gerando o íon: 93 [M-98-H]⁻ caracterizando a substância como ácido quínico (DAMETTO, 2014;).

O íon precursor da substância **(4)** m/z : 195 teve como fragmentação o surgimento dos íons m/z : 129 [M-66-H]⁻, além dos íons m/z : 151 [M-CO₂-H]⁻ e m/z : 177 [M-H₂O-H]⁻, caracterizando assim como sendo o ácido glucônico (ABREU, 2016). Os íons m/z : 169 e 195 foram identificados junto a técnica de LC-ESI-MS por ms².

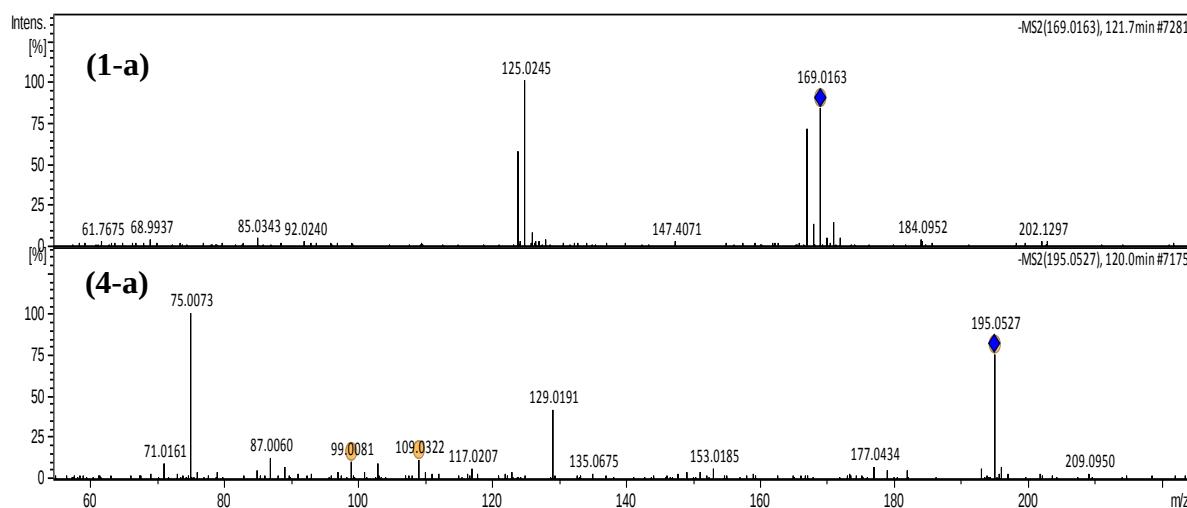


Figura 38 - Espectros dos íons *quasi* moleculares em [M-H]⁻ **(1-a)** m/z : 169 e **(4-a)** m/z : 195.

O íon m/z : 183 galato de metila foi também caracterizado por injeção direta no equipamento de massas de alta resolução, os íons fragmentos foram m/z : 168 [M-CH₃-H]⁻ perda da metila (CH₃), além dos m/z : 124 [M-CH₃-CO₂-H]⁻, m/z : 109 e m/z : 93 conforme figura (39):

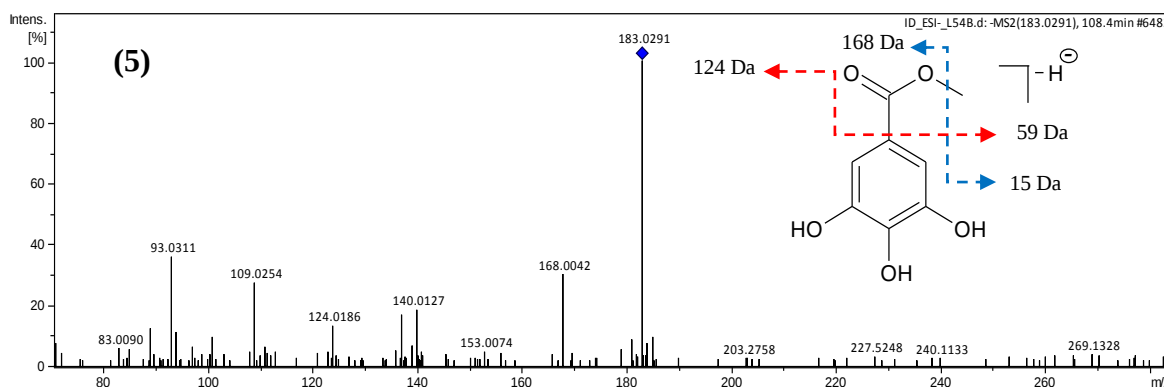


Figura 39 - Espectros dos íons *quasi* moleculares ms² [M-H]⁻ para os íons m/z : 183.

Os outros íons identificados pelos dados da quimiometria foram m/z : 311, 325, 339 e estes apresentaram perfis de fragmentação bem similares, variando apenas na m/z do íon precursor como mostra a figura (40) na sequência:

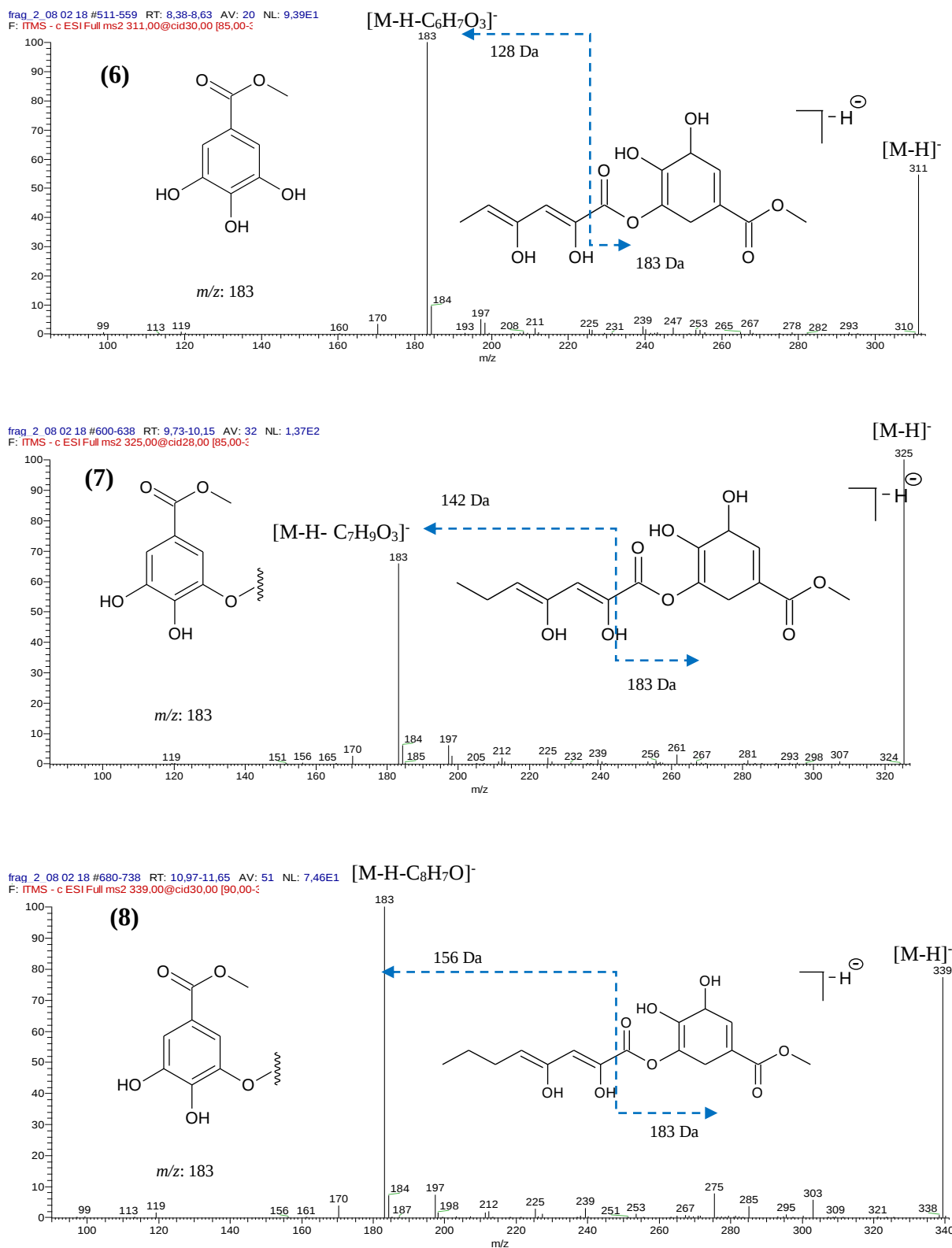


Figura 40 - Perfil de fragmentação ms^2 do $[M-H]^-$ dos íons *quasi* moleculares m/z : 311, m/z : 325 e m/z : 339 com aplicação de energia de colisão de 30, 28 e 30 eV respectivamente.

As substâncias **(6,7 e 8)** apresentaram respectivamente como primeiro fragmento o íon m/z : 183, característico da substância galato de metila desprotonada. Ainda observando os íons m/z : 311, 325 e 339 precursores de cada uma das substâncias, foi possível perceber que estes variam em 14 unidades de massa de diferença, equivalente a perda de grupos metilênicos (CH_2), ou seja, o íon m/z : 311 $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_3-\text{H}]^-$, 325 $[\text{M}-\text{C}_7\text{H}_9\text{O}_3-\text{H}]^-$, 339 $[\text{C}_8\text{H}_{11}\text{O}_3]^-$ provavelmente os compostos formados possuem variação na cadeia carbônica pertencente na estrutura proposta. (FINGER, 2009;).

A literatura indica a presença das substâncias, pois as mesmas já haviam sido relatadas em estudos anteriores com extratos de própolis do estado da Bahia, utilizando as técnicas de ESI-EM (SAWAYA *et al.*, 2004). Os íons m/z : 311, 325 e 339 também foram identificados nas amostras de geoprópolis por LC-ESI-MS/MS, afim de obter a massa exata das mesmas e confirmarem a presença das referidas substâncias conforme figura (41):

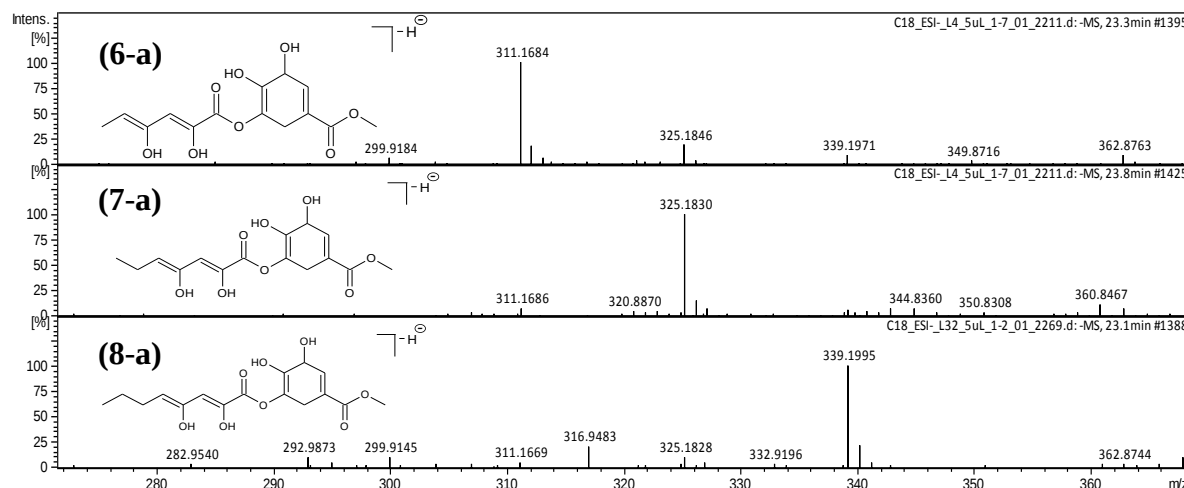


Figura 41 – Espectros obtidos por injeção direta no equipamento de massas de alta resolução utilizando em $[\text{M}-\text{H}]^-$ para obtenção dos íons *quase* moleculares m/z : 311, 325 e 339.

Os íons de m/z : 215, 217 e 377 não puderam ser identificados junto a literatura, porém foi possível obter o perfil de fragmentação do íon 215 conforme figura (42):

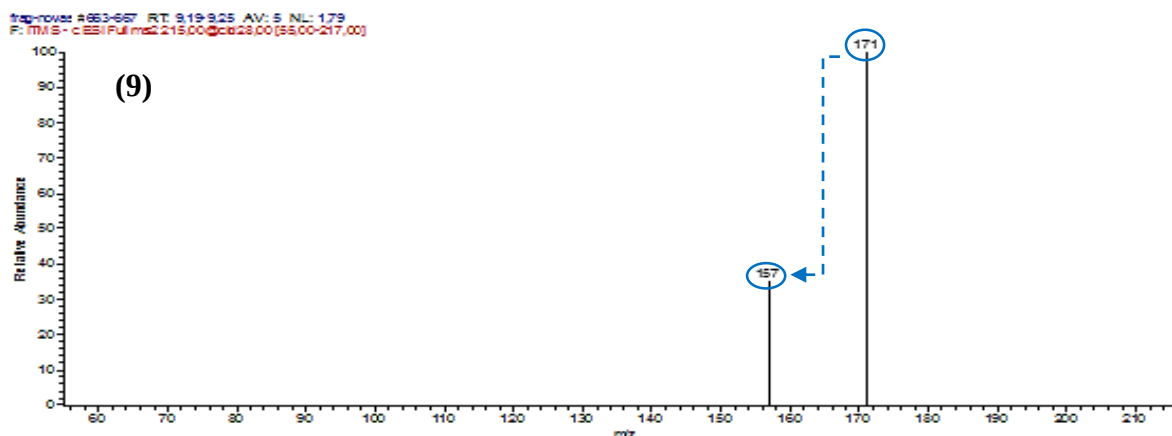


Figura 42 - Perfil de fragmentação ms^2 do íon *quase* molecular m/z : 215, energia de colisão de 28 eV.

Ao analisar o perfil de fragmentação do íon m/z : 215, foi proposta uma tentativa de caracterização baseado no espectro, onde a partir da energia aplicada no íon precursor foi possível obter o íon m/z : 171 $[M-44-H]^-$ com a possível perda de uma molécula de CO_2 . O segundo fragmento m/z : 157 $[M-58-H]^-$ pode ter ocorrido a partir da saída de uma perda de CO_2 e de um carbono metilênico CH_2 , uma vez que a diferença se deu por 14 unidades de massa, ou seja, provavelmente uma possível estrutura aromática com uma cadeia alifática (MOE *et al.*, 2005). A proposta de fragmentação anterior, sugeriu que o íon m/z : 217 fosse uma possível estrutura com uma insaturação a menos que o íon 215.

Os outros íons m/z : 433, 449, 469, 475, 485 presentes nos gráficos de *loadings* geraram perfis espectrais por ESI-EM que possibilitaram a identificação e caracterização de alguns desses íons (Figuras 43 e 44):

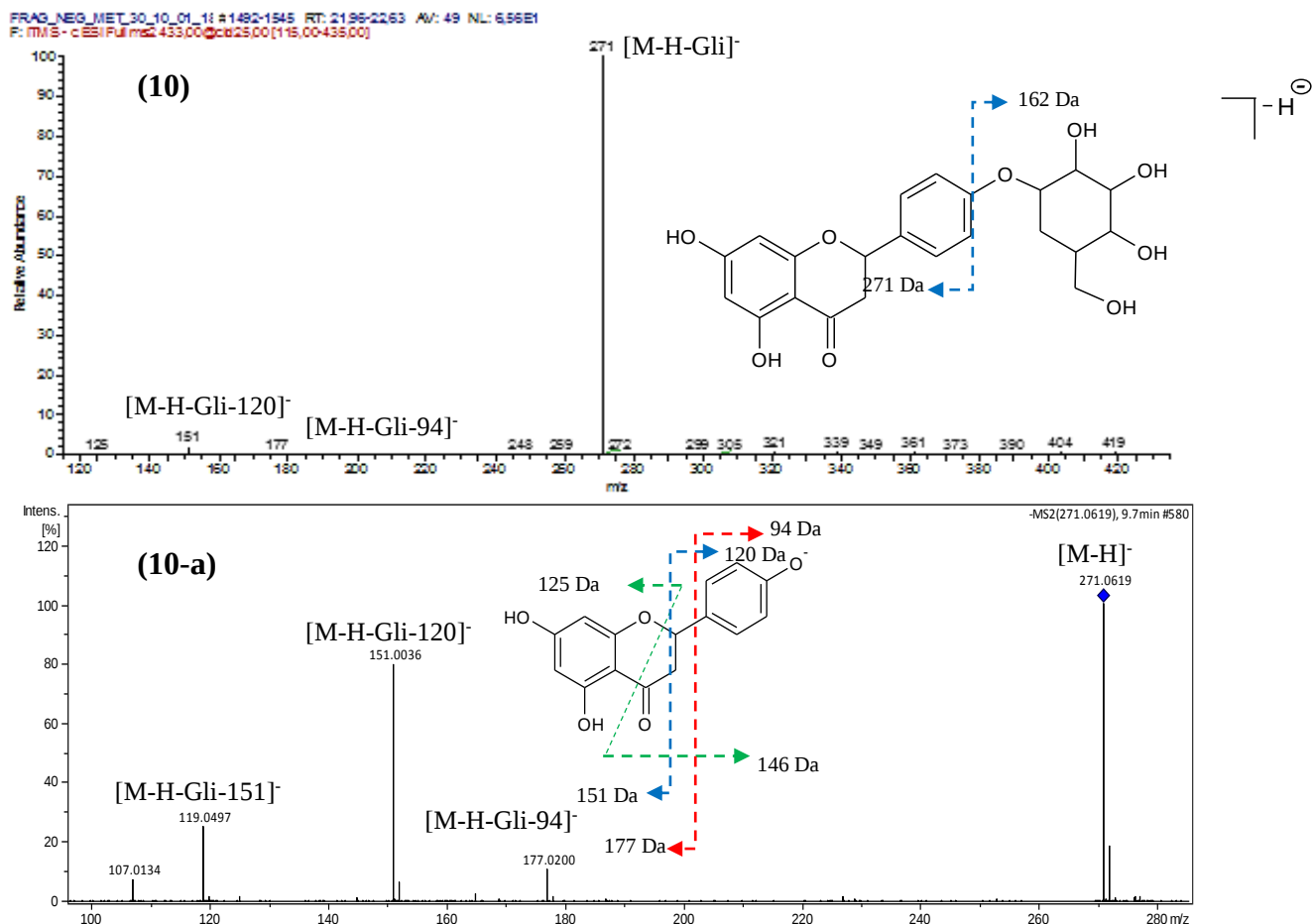


Figura 43 - Perfil de fragmentação ms^2 $[M-H]^-$ do íon m/z : 433: **(10)** ESI-EM utilizando energia de colisão de 25 eV; **(10-a)** Fragmento do íon m/z : 433 por LC-ESI-MS.

Os íons precursores m/z : 433 naringenina-4'-O- β -glicopiranosídeo e 449 aromadendrina-7-O-glicopiranosídeo ao serem ionizados apresentaram a perda de $[M-162-H]^-$ característico da perda de açúcar (glicopiranosídeo) gerando os íons m/z : 271 correspondentes

a naringenina e o íon m/z : 287 referente a aromadendrina. Os fragmentos sequências após a perda do açúcar geraram os íons m/z : 151 [M-Gli-120-H]⁻, m/z : 125 [M-Gli-146-H]⁻, 119 [M-Gli-151-H]⁻, m/z : 177 [M-Gli-94-H]⁻ referente a quebra do anel C da estrutura do flavonoide.

Já o íon precursor m/z : 449, aromadendrina-7-O-glicopiranosídeo após a saída do glicopiranosídeo m/z : 162 apresentou os fragmentos m/z : 259 [M-Gli-CO-H]⁻, m/z : 151 [M-Gli-CO-108-H]⁻, m/z : 135 [M-Gli-151]. O perfil foi evidenciado no ESI-EM e por análise de LC-MS/MS na figura (44):

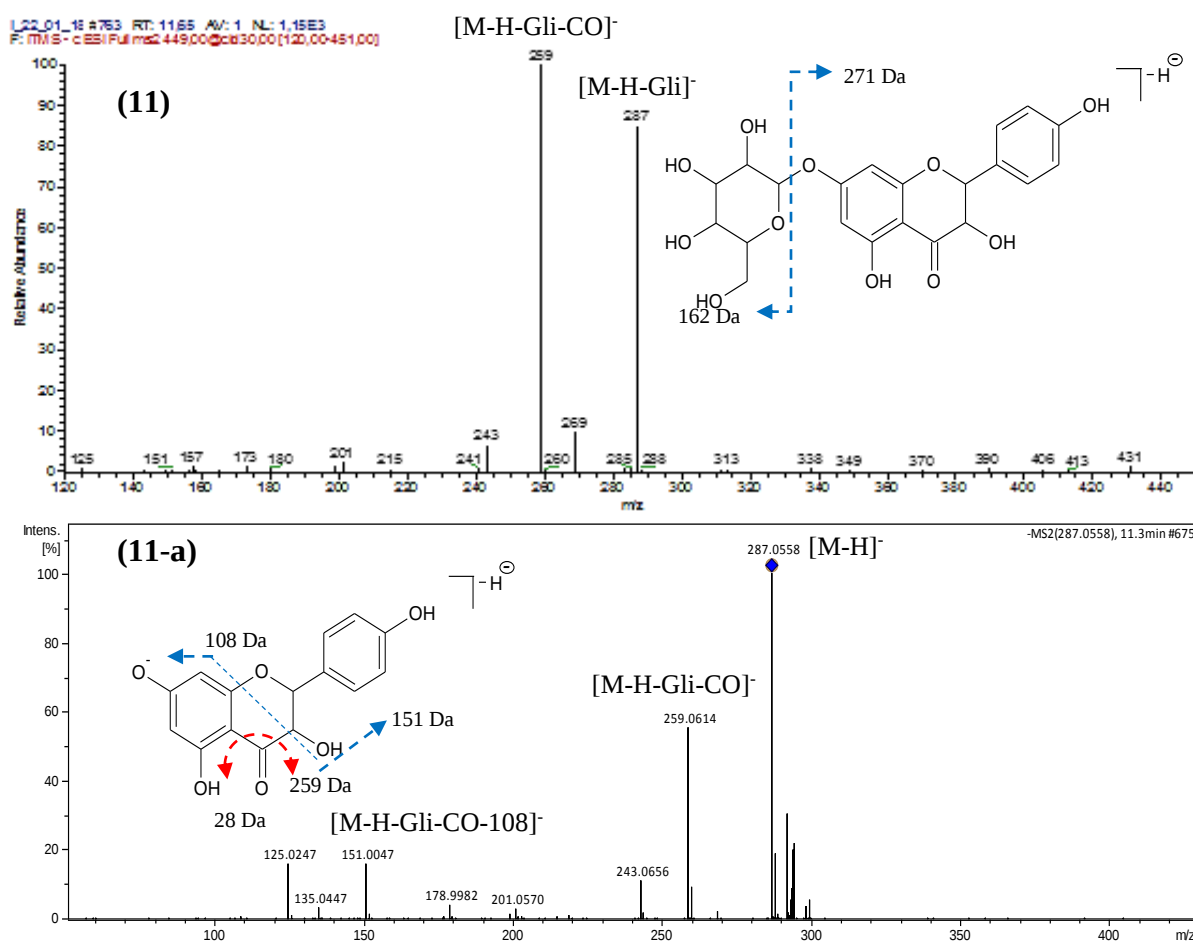


Figura 44 - Perfil de fragmentação ms^2 , [M-H]⁻ do íon m/z : 449: (11) ESI-EM utilizando energia de colisão de 30 eV; (11-a) Fragmento do íon m/z : 433 por LC-ESI-MS.

As substâncias naringenina e aromadendrina glicosilada foram relatadas em estudos anteriores com extrato de geoprópolis das espécies *M. seminigra* e *M. interrupta* da cidade de Manaus-AM, o que corroborou para a confirmação das informações descritas anteriormente (DA SILVA *et al.*, 2013).

Em outro estudo, os derivados 7-O-metil-naringenina, 7-O-metil-aromadendrina, 7,4'-di-O-metil-aromadendrina e 5-O-metil-aromadendrina das substâncias naringenina e aromadendrina, já haviam sido relatadas em estudo anteriores com extrato etanólico de

geoprópolis *M. subnitida* do município de Vierópolis-PA utilizando a técnica de LC-ESI-MS para a massa e a identificação das estruturas por RMN (DE SOUZA *et al.*, 2013).

A substância **(12)** foi identificada como *m/z*: 255 sendo a pinocembrina por apresentar os fragmentos *m/z*: 237 $[M-H_2O-H]^-$, *m/z*: 151 $[M-C_7H_3O_4]^-$, além do fragmento *m/z*: 211 e *m/z*: 187, sendo mais um flavonoide. O íon *m/z*: 255 já havia sido identificado em amostras de própolis vermelha por ESI-EM e UHPLC-ESI-MS (LÓPEZ *et al.*, 2014).

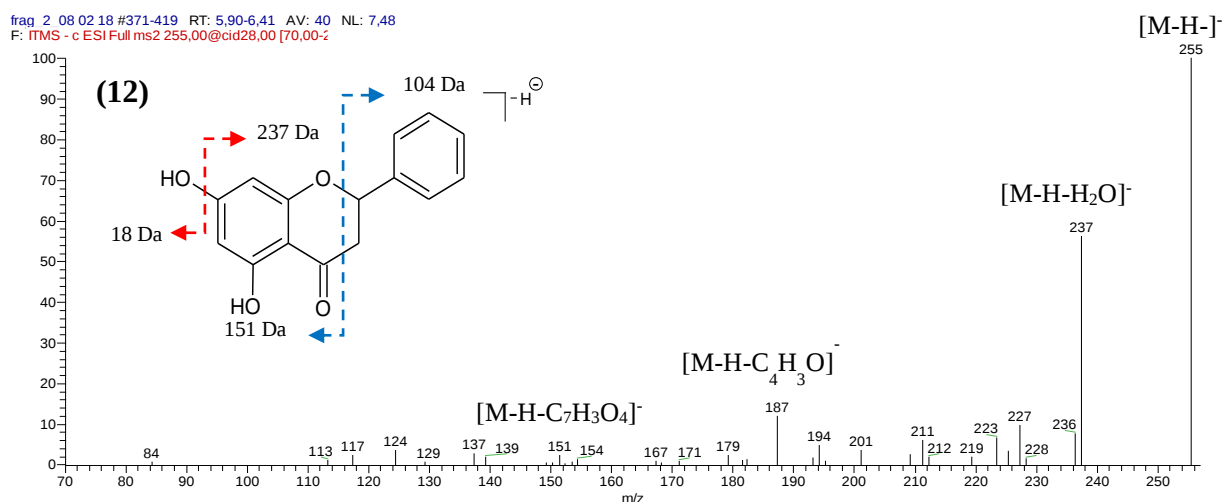


Figura 45 - Perfil de fragmentação ms^2 do íon *m/z*: 255, ESI-EM utilizando energia de colisão de 28 eV.

Os outros íons *m/z*: 469, 475 e 485, revelaram perfis espectrais de substâncias que não puderam ser identificadas. Porém, houve uma tentativa de explicação para os íons oriundos dos precursores conforme figura (46 e 47):

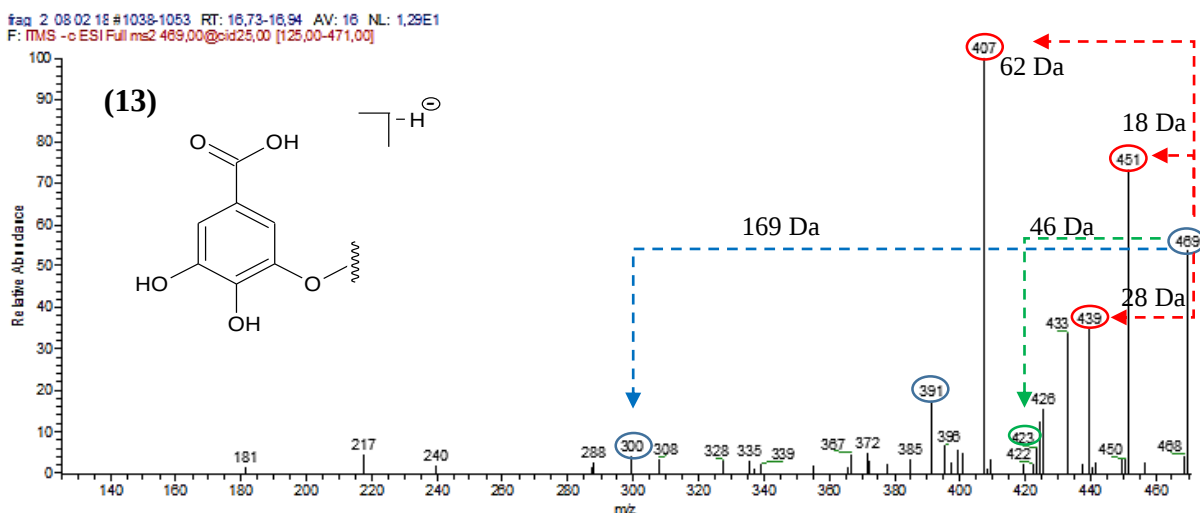


Figura 46 - Perfil de fragmentação ms^2 do íon *m/z*: 469, ESI-EM utilizando energia de colisão de 25 eV.

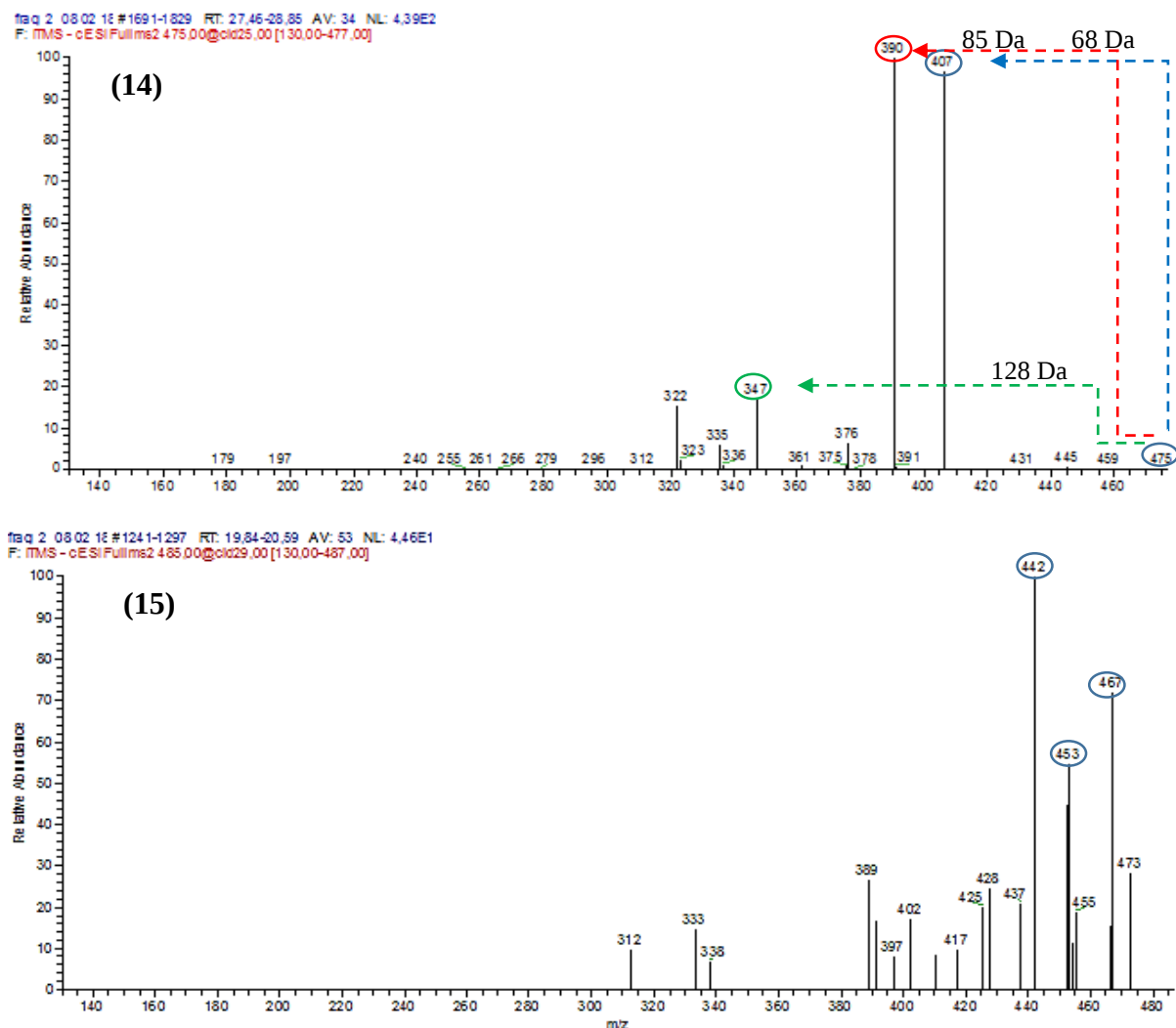


Figura 47 - Perfil de fragmentação ms^2 $[M-H]^-$ dos íons m/z : 475 e 485 com energia de colisão de 25 e 29 eV.

A proposta de uma parte da estrutura **(13)** referente ao íon precursor m/z : 469 foi baseada pelo seu perfil de fragmentação, o qual apresentou os íons m/z : 423 $[M-C_2H_5OH-H]^-$ indicando uma perda de 46 unidades que segundo a literatura, pode ser característica ácidos fenólicos, m/z : 407 $[M-CO_2-H_2O-H]^-$, m/z : 451 $[M-H_2O-H]^-$, m/z : 439 $[M-CO-H]^-$ e o íon m/z : 300 $[M-169-H]^-$ este último representou uma quebra na ligação entre o possível ácido gálico da parte desconhecida da estrutura. O íon 469 já foi relatado em frutos da planta (*Tapirira guianenses*), conhecida como aroeira da família Anacardiaceae e que faz parte da dieta polínica das abelhas *M. seminigra* e *M. interrupta*.

Há relatos na literatura com extrato etanólico 70% de própolis da espécie de abelha sem ferrão *Tetragonisca angustula* por ESI-MS/MS, referente a presença do íon precursor m/z : 469, e dos fragmentos m/z : 451, 439, 423, 407, 391, porém sem uma identificação estrutural. Assim tal informação corroborou com o observado no perfil spectral **(13)** (SAWAYA, 2006).

Já a substância **(14)** apresentou o íon precursor m/z : 475 com os fragmentos m/z : 390 $[M-85-H]^-$, m/z : 407 $[M-68-H]^-$, m/z : 347 $[M-128-H]^-$ e também não pode ser identificada. Porém, já existem relatos na literatura acerca das fragmentações desta substância, em estudo realizado com extrato etanólico de própolis de *M. mondury* utilizando a ESI-MS e UHPLC-ESI(-)-MS/MS foi possível identificar a presença do íon precursor m/z : 475, assim como as suas fragmentações entretanto não houve identificação da possível substância química que a massa faz referência (DOS SANTOS *et al.*, 2017).

O íon precursor m/z : 485 e nem seus principais fragmentos m/z : 442, 467, 453 não apresentaram relatos na literatura, também não houve a possibilidade de identificação parcial ou total da estrutura química, uma vez que, que eram íons desconhecidos.

Já os últimos grupos de íons m/z : 501, 534, 601, 669, 670 responsáveis pela tipificação das amostras de abelhas de *M. seminigra* e *M. interrupta* em grupos específicos caracterizados pelos seus respectivos perfis espectrais.

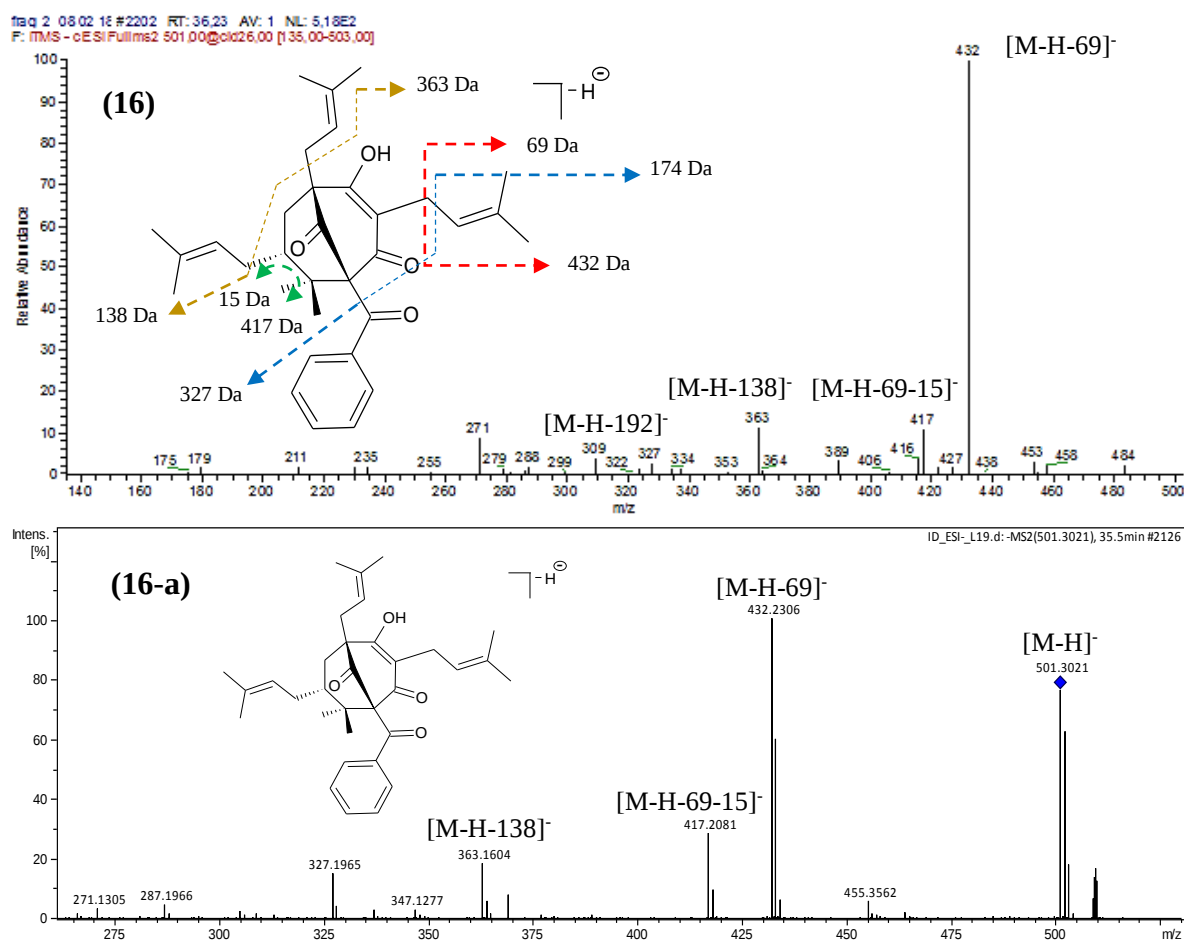


Figura 48 - Perfil de fragmentação ms^2 $[M-H]^-$ dos íons: **(15)** ESI-EM m/z : 501 (26 eV); **(15-a)** LC-MS m/z : 501.

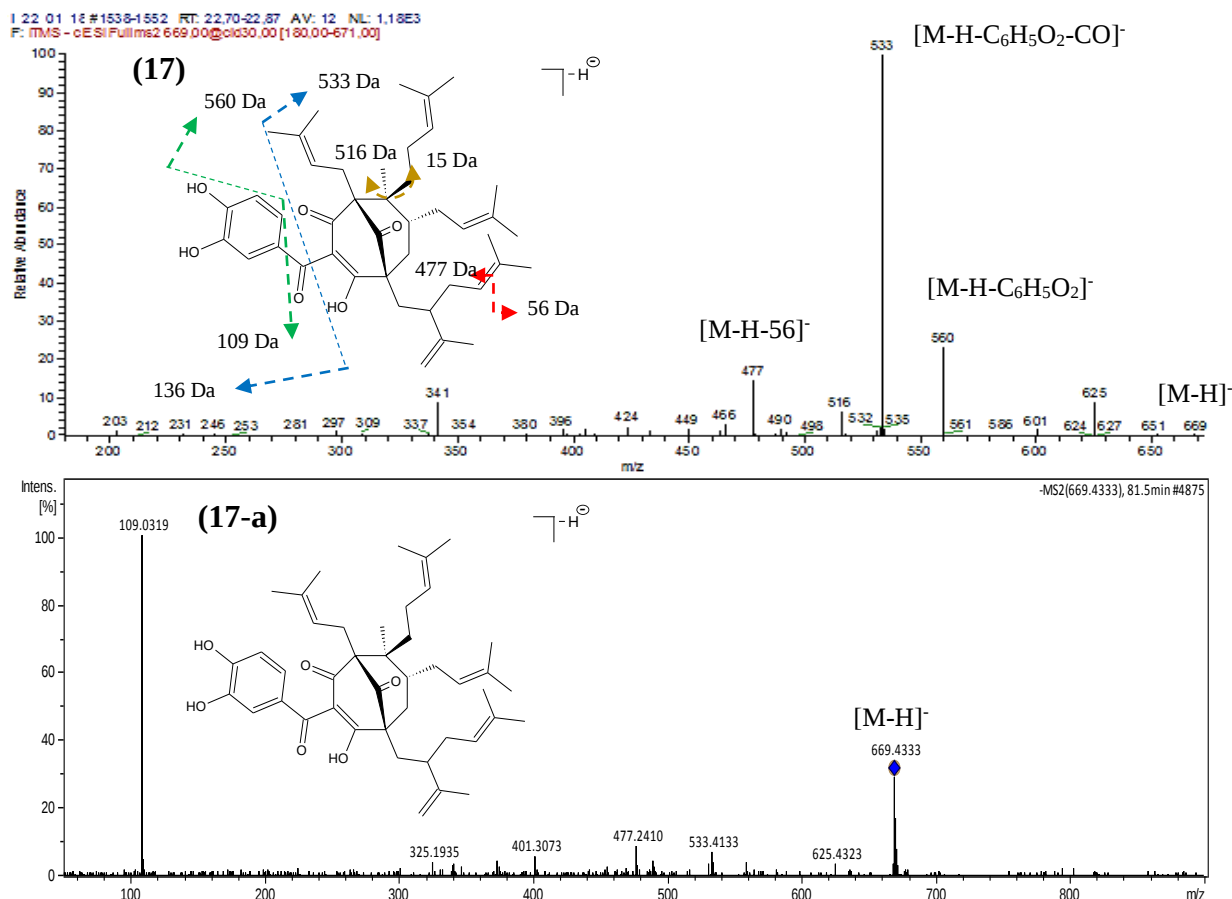


Figura 49 - Perfil de fragmentação ms^2 $[M-H]^-$ dos íons: **(17)** ESI-EM m/z : 669 (30 eV); **(17-a)** LC-ESI-MS m/z : 669.

O íon precursor m/z : 501 da substância **(16)** apresentou os fragmentos m/z : 432 $[M-69-H]^-$ referente a perda de um grupo isopreno (C_5H_9), m/z : 417 $[M-69-15-H]^-$ perda de um grupo (C_5H_9) e uma metila (CH_3), m/z : 363 $[M-138-H]^-$ perda de dois grupos de isoprenos, m/z : 327 $[M-69-105-H]^-$ perda de um C_5H_9 e do grupo C_7H_5O além do íon m/z : 309 $[M-192-H]^-$, caracterizando a presença de uma benzofenona prenilada 7-*epi*-nenomorosone.

As fragmentações sequenciais após a energia de colisão (30eV) ser aplicada no íon precursor m/z : 669 gerou os fragmentos, m/z : 560 $[M-C_6H_5O_2-H]^-$ referente a perda de 109 Da, m/z : 533 $[M-C_6H_5O_2-CO-H]^-$ equivalente a perda de 136 Da, m/z : 516 $[M-C_6H_5O_2-CO-CH_3-H]^-$ seguida perda de 15 Da e a última perda significativa m/z : 477 associada a saída de 56 Da (C_4H_8), o que caracterizou a substância **(17)** como sendo uma guttiferona C.

A substância m/z : 601, definida como xantochymol foi caracterizada junto a técnica de LC-ESI-MS/MS conforme figura (50) na sequência:

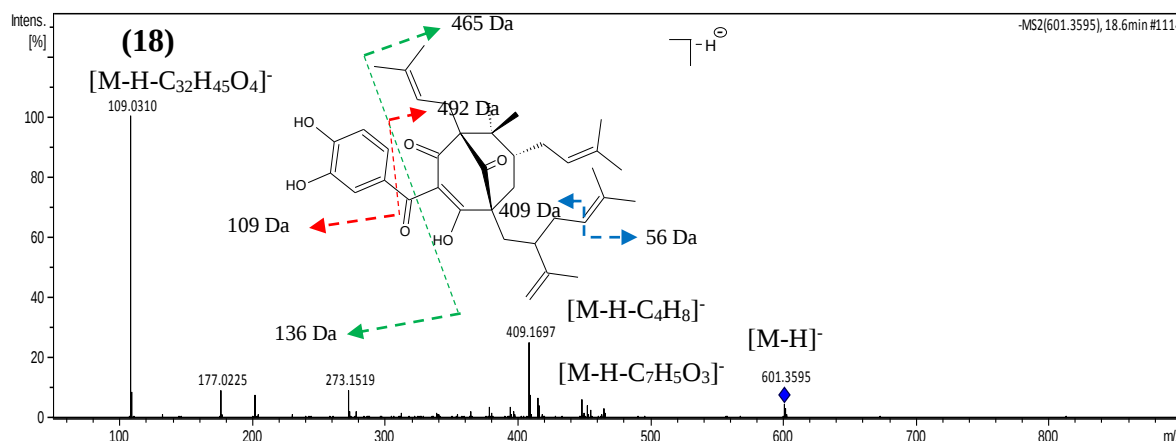


Figura 50 - Espectro obtido por análise de LC-ESI-MS em $[M-H]^-$ ms2 para o íon m/z : 601.

A fragmentação do íon precursor m/z : 601 gerou os fragmentos m/z : 465 (-136 Da) referente a perda de $(C_7H_5O_3)$, m/z : 409 (-56 Da) com perda de C_4H_8 , m/z : 109 (-492 Da), m/z : 177 (-232 Da), os fragmentos foram comparados junto a data base e literatura e os mesmos indicaram que a substância **(18)** era o Xantochymol.

Em estudo realizado com própolis de abelhas das espécies *Friesomelitta longipes* e *Apis mellifera* utilizando a técnica de LC-ESI-MS/MS, onde os íons precursores referentes as substâncias 7-*epi*-nemorosone (m/z : 501), guttiferone C ou D (m/z : 669) e xantochymol (m/z : 601) e os respectivos fragmentos haviam sido identificados junto a composição química do produto em questão (DE SOUZA *et al.*, 2018).

Outro estudo realizado com extrato etanólico 80% de própolis vermelha de *Apis mellifera* utilizando a técnica LC-Orbitrap-FTMS também constatou a presença de substâncias da classe das benzofenonas preniladas como as guttiferonas C, D, E e F e da xantochymol (DE MENDONÇA *et al.*, 2015).

As benzofenonas já haviam sido identificadas em própolis da Venezuela de flores *Clusia* da família Clusiaceae e em própolis das espécies de abelhas *Friesomelitta varia*, *Scaptotrigona depilis*, *Melipona favosa*, *Melipona compressipes*, e *Paratrigona anduzei* utilizando a técnica de HPLC (TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 1993).

A família florística Clusiaceae revelou presença no levantamento florístico realizado para as espécies *M. seminigra* e *M. interrupta*, ou seja, a presença de benzofenonas preniladas pode ser indicativo dessas plantas.

As substâncias químicas referentes aos íons precursores revelaram dados que possibilitaram a construção de uma tabela (15) com os íons identificados nas amostras de ambas as abelhas e seus respectivos fragmentos (ms^2 , ms^3 e ms^4) obtidos por ESI-MS/MS:

Tabela 21 – Principais propostas de substâncias para os íons precursores presentes nos grupos I, II e III do gráfico de PCA (*loadings*).

Nº	Íon precursor (M-H) ⁻	MS ⁿ fragmentos MS (<i>m/z</i>)	Proposta de substância	Classe
1	169	MS ² [169]: 125	Ácido gálico	Ácido carboxílico
2	187	MS ² [187]: 143, 125	Ácido 3-hidroxicarboxílico	Ácido carboxílico
3	191	MS ² [191]: 127, 173, 93	Ácido quínico	Ácido carboxílico
4	195	MS ² [195]: 129, 159, 177, 75	Ácido glucônico	Ácido carboxílico
5*	183	MS ² [183]: 168, 124, 109, 93	Metil galato	Éster metílico
6	311	MS ² [311]: 183	Derivado do metil galato	Éster metílico
7	325	MS ² [325]: 183	Derivado do metil galato	Éster metílico
8	339	MS ² [339]: 183	Derivado do metil galato	Éster metílico
9	215	MS ² [215]: 171, 157	Não identificado	Não identificado
10	433	MS ² [433]: 271, 151, 177 MS ³ [271]: 151, 177, 125 MS ⁴ [151]: 107	Nrigenina-4'-O-β-glicopiranosídeo	Flavonoide
11	449	MS ² [449]: 287, 259, 151 MS ³ [259]: 215, 125, 173 MS ⁴ [215]: 173	Aromadendrina-7-O-glicopiranosídeo	Flavonoide
12	255	MS ² [255]: 237, 151, 187, 211	Pinocembrina	Flavonoide
13	469	MS ² [469]: 407, 451, 439, 300 MS ³ [407]: 351, 380, 359	Não identificado	Não identificado
14	475	MS ² [475]: 390, 407, 347 MS ³ [390]: 347, 335 MS ⁴ [347]: 303, 279	Não identificado	Não identificado
15	485	MS ² [485]: 442, 467, 453	Não identificado	Não identificado
16	501	MS ² [501]: 432, 417, 363, 309, 327	7-epi-nenomorosone	Benzofenona
17	669	MS ² [669]: 533, 560, 516, 477	Guttiiferona C	Benzofenona
18*	601	MS ² [601]: 465, 409, 109, 177	Xantochymol	Benzofenona

* Íons *m/z*: 183 e 601 foram identificados utilizando apenas a técnica de LC-ESI-MS.

5.6. Proposta de identificação das substâncias químicas por análise LC-MS

A investigação química de alguns íons precursores encontrados na análise por LC-ESI-MS e por injeção direta, auxiliaram na confirmação das massas exatas das substâncias caracterizadas por RMN e por ESI-EM.

Os perfis cromatográficos da espécie *M. seminigra* revelaram serem distintos (Figura 51), distinção esta observada pela análise quimiométrica dos dados ESI-MS e RMN. Já os perfis da espécie *M. interrupta* exibiram informações químicas semelhantes, comprovando a característica restritiva da espécie quanto a coleta de material (Figura 52).

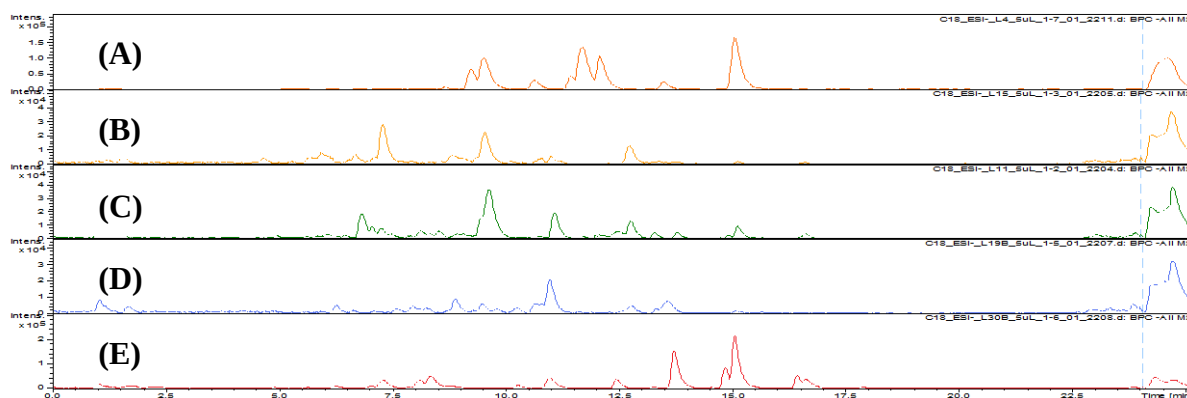


Figura 51 - Espectro de Massas (LC-MS) das amostras de *M. seminigra*. (A) Inpa (4); (B) Brasileirinho (15); (C) Tarumã (19); (D) Iranduba (11); (E) Puraquequara (30).

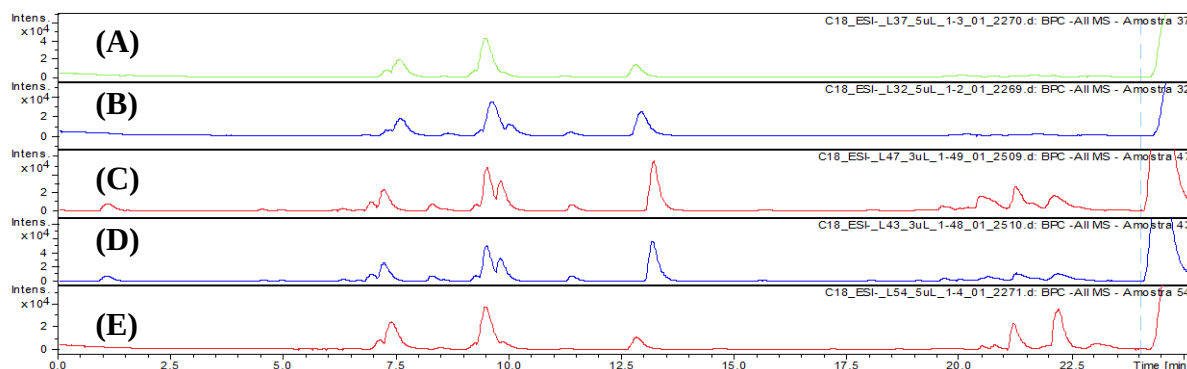


Figura 52 – Espectro de Massas (LC-MS) das amostras de *M. interrupta*. (A) Inpa (32); (B) Brasileirinho (37); (C) Tarumã (43); (D) Iranduba (48); (E) Puraquequara (54).

A análise química revelou substâncias de diversas classes metabólicas que possuem tendência a possuírem atividades biológicas como os: flavonoides, ácidos fenólicos que são excelentes antioxidantes, além das benzofenonas e terpenos (propícios a atividades antimicrobianas). A partir dos resultados foi possível a construção e organização dos resultados com as principais propostas de substâncias identificadas (Tabela 22) na sequência:

Tabela 22 – Principais propostas de identificação para as substâncias a partir dos seus íons precursores obtidos por Injeção direta.

Nº	[M-H] ⁻	MS ⁿ MS/MS	Fórmula Molecular	Erro [ppm]	mSigma	Proposta de substância identificada	Classe química
1 ^{IN}	271,0664	177.0224 151.0056 119.0525	C ₁₅ H ₁₂ O ₃	3,3	2,3	naringenina	Flavonoide
2 ^{IN}	433,1246	271,0657	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	3,6	3,8	naringenina-4'-β-glicopiranosídeo	Flavonoide
3 ^{IN}	287,0613	259.0669 243.0677 201.0516 177.0583 151.0051 125.0255	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	4,5	3,5	aromadendrina	Flavonoide
4 ^{IN}	433,1121	287,0548	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	4,6	4,8	aromadendrina-7-O-rhamnosideo	Flavonoide
5 ^{IN}	449,1184	287,0575	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	4,8	3,5	aromadendrina-7-O-glicopiranosídeo	Flavonoide
6 ^{IN}	465,1026	303.0506 297.7058 291.2916 285.0408 275.0531 125.0214	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₂	4,7	3,5	taxifolina - 3' - glucosideo	Flavonoide
7 ^{IN}	303,2629	285.0394 275.0580 259.0680 177.0140	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	0,4	2,2	taxifolina	Flavonoide
8 ^{IR}	601,3570	465,3360 409.1663 177,0234 109.0293	C ₃₈ H ₅₀ O ₆	2,6	4,3	xantochymol	Benzofenona
9 ^{IR}	501,3010	432,2311 417,2181 363,1704 347,1372 327,2060	C ₃₃ H ₄₂ O ₄	0,1	0,5	7- <i>epi</i> -nemorosone	Benzofenona
10 ^{IR}	699,4333	533,4133 477,2410 109,0319	C ₄₃ H ₅₈ O ₆	3,0	1,4	guttiferone C	Benzofenona
11	471,3466	427,3528 409,3518	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	2,8	7,4	ácido corosólico	Terpeno
12	395,1862	337,1056 279,2344	C ₂₄ H ₂₈ O ₅	0,4	2,2	não identificado	Não identificado
13	475,2881	337,1056 279,2344	C ₃₀ H ₃₆ O ₅	1,8	2,1	não identificada	Não identificado
14	455,3543	437,3475 373,2706	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	2,8	7,6	ácido magiferólico	Terpeno
15	465,3362	397,3477 371,2585 327,1947 273,1507	C ₃₁ H ₄₆ O ₃	2,7	4,0	metil 11-oxooleana-2,12-dien- 29-oate	Terpeno
16	371,1864	327,2694	C ₂₂ H ₂₈ O ₅	3,2	1,1	17- beta-estradiol hemisuccinato	Terpeno
17	373,2737	329,2849	C ₂₄ H ₃₈ O ₃	2,9	0,7	ácido (5β)-12-oxocho lan-24-oico	Terpeno

18	375,2890	331,3001	C ₂₄ H ₄₀ O ₃	0,7	13,7	ácido 3β-hidrooxi-5α-cholan-24-oico	Terpeno
19	401,3069	-	C ₂₆ H ₄₂ O ₃	4,4	3,4	19-nor-10-keto-25-hidroxivitamina D3	-
20	471,3450	453,3177 409,3328	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	6,3	2,3	ácido canérico	Terpeno
21	369,2426	-	C ₂₄ H ₃₄ O ₃	2,9	5,1	rimexolona	Terpeno
22	469,3302	-	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	4,5	4,9	ácido glicirrhético	Terpeno
23	375,2899	331,3086	C ₂₄ H ₄₀ O ₃	1,4	2,6	ácido isolitocólico	Terpeno
24 ^{PU}	347,2548	303,2770	C ₂₂ H ₃₆ O ₃	2,9	1,8	(15:0) ácido anacárdico	Ácido fenólico
25 ^{PU}	373,2741	347,2589	C ₂₄ H ₃₈ O ₃	1,0	4,5	(17:1) ácido anacárdico	Ácido fenólico
26 ^{PU}	371,2741	329,2826	C ₂₄ H ₃₈ O ₃	6,9	4,7	(17:2) ácido anacárdico	Ácido fenólico
27	169,0163	125,0245	C ₇ H ₆ O ₅	3,2	1,8	ácido gálico	Ácido fenólico
28	195,0534	129,0204 75,0074	C ₆ H ₁₂ O ₇	4,4	3,7	ácido glucônico	Ácido fenólico

*IN: Presente apenas no INPA; IR: Presente apenas no IRANDUBA; PU: Presente apenas no PURAQUEQUARA; Ausência de identificação indica que existe no mínimo uma substância diferente inserida nas outras regiões.

5.7. Caracterização química por Cromatografia Gasosa (CG-EM)

A cromatografia gasosa é uma técnica bastante utilizada para explorar a vasta composição química da geoprópolis das abelhas sem ferrão, assim como, a da própolis de outros gêneros, uma vez que, existe um extenso acesso a recursos florísticos da região que se encontram próximos a caixa dos meliponíneos (MARCUCCI, 1995; DE SOUZA *et al.*, 2013; DA SILVA *et al.*, 2013;).

As pesquisas utilizando a técnica de cromatografia gasosa (CG-EM) revelaram a presença das mais variadas classes químicas no extrato de própolis. No estudo realizado com própolis de *Apis Mellifera* foram identificados ácidos graxos, compostos aromáticos, terpenóides, flavonoides, além de um hidrocarboneto de cadeia média (CASTRO *et al.*, 2007).

Em outro estudo analisando os resultados obtidos utilizando a técnica de (CG-EM) junto a geoprópolis das espécies de abelha sem ferrão *Melipona* e *Trigona*, revelaram a presença de substâncias di e triterpênicas, aldeídos e cetonas com características aromáticas, açúcares, além de ácidos graxos, flavonoides, álcoois e fenóis (BANKOVA *et al.*, 1998). Os açúcares, triterpenos, fenólicos e ácidos também foram identificados no extrato de própolis de *Melipona*, além de esteroides (BATISTA *et al.*, 2016).

Outros relatos também identificaram a presença de monoterpenos, terpenos oxidados, ésteres em extratos de própolis (DA SILVA *et al.*, 2017), isoflavononas identificadas (FERNÁNDEZ *et al.*, 2008), sesquiterpenos caracterizados (OLIVEIRA *et al.*, 2013b), hidrocarbonetos olefínicos (CHENG *et al.*, 2013), benzophenonas e prenilados (DE CASTRO ISHIDA *et al.*, 2011) além de monoterpenos em *M. seminigra* (OLIVEIRA *et al.*, 2013b), triterpenos em *M. interrupta* (DA SILVA *et al.*, 2013), diterpenos e ésteres terpênicos na própolis do Mediterrâneo de Malta (POPOVA *et al.*, 2011) e sesquiterpenos em própolis de *M. beecheii* do Peru (PINO *et al.*, 2006).

Os estudos forneceram segurança para a utilização da técnica com o intuito de explorar a constituição química mais apolar da geoprópolis. Assim, as fases hexânicas de ambas as espécies de abelhas sem ferrão, *M. seminigra* e *M. interrupta*, foram analisadas utilizando o equipamento de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e os dados obtidos foram comparados com a literatura, com bibliotecas do equipamento e plataformas de acesso livre (NIST, MAINLIB, WILEY, ADAMS, HMBD, ChemSpider, Pubchem, ChEBI e ChEMBL) através dos índices de retenção (TR) e perfis de fragmentação.

As corridas revelaram picos cromatográficos que foram ordenados de forma crescente dos seus tempos de eluição e assim, doze substâncias químicas foram propostas conforme seus perfis de fragmentação listados na tabela (23) abaixo:

Tabela 23 – Principais propostas de substâncias identificadas por CG-EM da geoprópolis;

Picos	Nº de amostras		Tempo de Retenção (min)	Substância Proposta	Intensidade dos íons <i>m/z</i> (%)
	<i>M.seminigra</i> (1-30)*	<i>M.interrupta</i> (31-54)*			
1	1-6, 27	31-54	15,25	palmitato de metila	270(M ⁺), 74(100), 87(67), 75(19)
2	1-6, 27	31-54	16,88	linoleato de metila	294(M ⁺), 67(100), 81(92), 95(63)
3	1-6, 27	31-54	16, 93 16,94	oleato de metila	296(M ⁺), 55(100), 69(65), 74(53)
4	1-6	31-54	17,15 17,16	esterato de metila	298(M ⁺), 74(100) 87(68), 75(22)
5	1-6, 25-30	-	20,16	Não identificada	350(M ⁺), 97(100), 83(89), 69(75)
6	19-24	46-48	26,03 26,04 26,05	lanosta-8-24-dien-3-ona	424(M ⁺), 69(100), 409(69), 109(61), 95(51), 55(58)
7	18-24	43-45 46-47	26,25 26,26	lanosterol	426(M ⁺), 69(100), 95(82), 109 (78), 81(58), 411(53)
8	1-30	31-54	26,93 26,94	β-amirona	424(M ⁺), 218(100), 203(64), 95(27), 189(23), 81(21),
9	1-30	34, 36-54	27,20 27,21	β-amirina	426(M ⁺), 218(100), 203(57), 95(23), 189(21), 81(17),
10	1-30	31-54	27,41-27,46	α-amirona	424(M ⁺), 218(100), 95(52), 203(43), 107(41), 189(32),
11	1-6, 25-30	34, 36-38 41-45 48-54	27,58-27,62	Não identificada	426(M ⁺), 69(100), 95(82), 81(59), 107(59), 93(57)
12	1-30	36-46 48-54	27,72-27,73 27,75	α-amirina	426(M ⁺), 218(100), 95(48), 203(30)
13	1-6, 25-30	37-41 45-54	28,13 28,14 28,15	24-metileno cicloartano-3-ona	438(M ⁺), 95(100), 93(71), 91(64), 107(61), 81(59)
14	1-6, 25-30	34, 36-38 43,45, 49-54	28,31 28,33 28,35	9,19-ciclo lanostano24-metileno- 2-β-ol	440(M ⁺), 95(100), 135(76), 107(76), 81(73), 93 (70)

*IN (1-6/31-36); BR (7-12/37-42); TA (13-18/43-45); IR (19-24/46-48); PU (25-30/49-54).

Números de 1-30 referente a espécie *M. seminigra*.

Números de 31-54 referente a espécie *M. interrupta*.

As corridas cromatográficas de cada amostra duraram em média 38 minutos, sendo observada a presença de 14 picos nos cromatogramas. Assim, das quatorze substâncias identificadas, cinco tiveram seus tempos de retenção (TR) abaixo dos 21 minutos, conforme figura (53) abaixo:

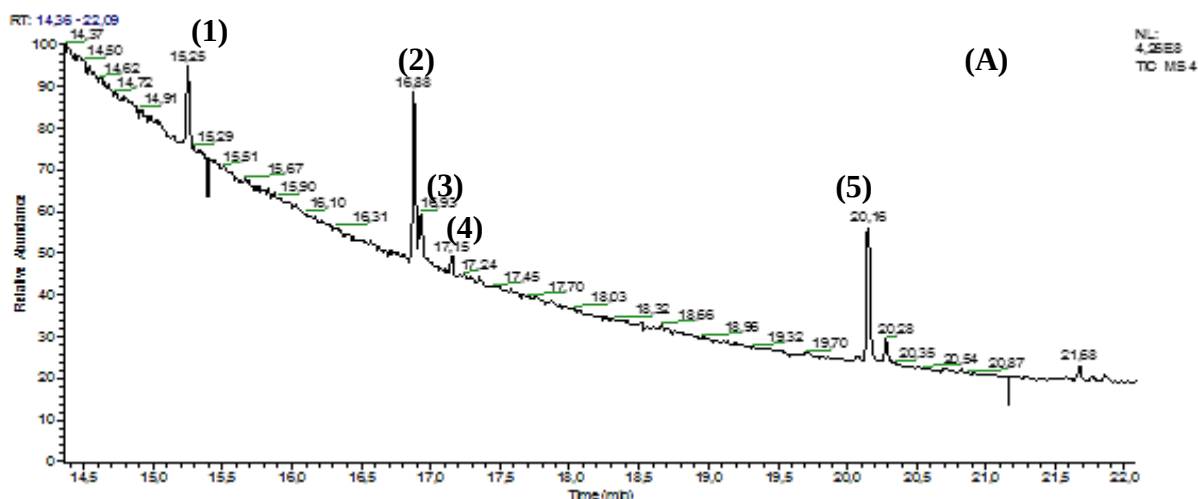


Figura 53 – (A) Corrida cromatográfica dos primeiros 22 min, substâncias identificadas: **(1)** palmitato de metila; **(2)** linoleato de metila; **(3)** oleato de metila; **(4)** esterato de metila; **(5)** não identificada;

A análise química dos cromatogramas utilizando a base de dados do equipamento permitiu identificar os primeiros cinco picos definidos como sendo ésteres metílicos, e estes estavam presentes em todas as amostras de geoprópolis das espécies *M. seminigra* e *M. interrupta* da região do Inpa. Porém para a espécie mais generalista, a substância **(1)** palmitato de metila (TR = 15, 25 min) estava presente (setas escuras) apenas nas amostras do Inpa (1-6) e uma do Puraquequara (27) e ausente nas outras três regiões (setas vermelhas) conforme figura (54) abaixo:

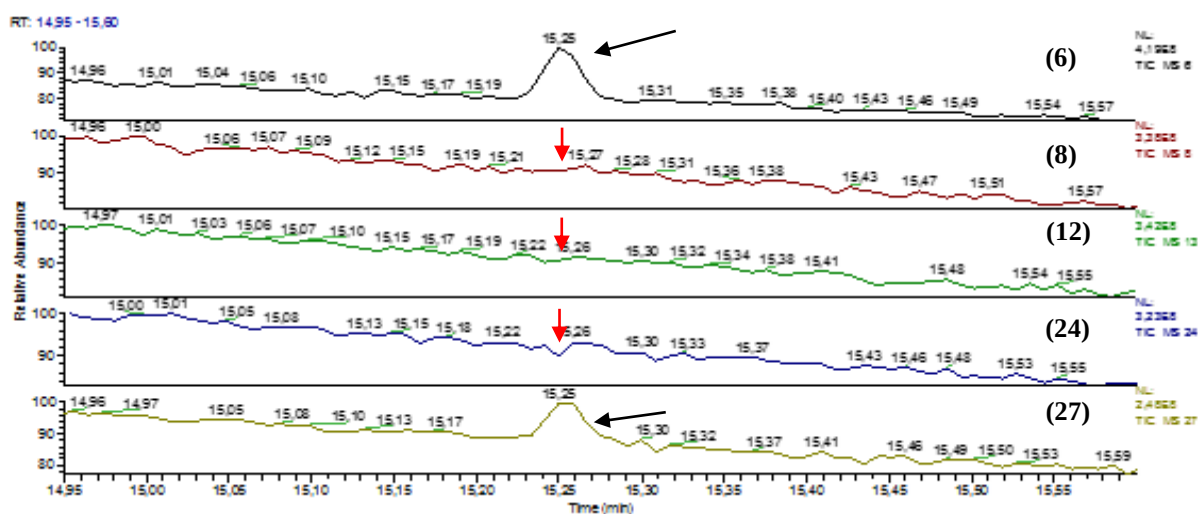


Figura 54 – Corridas cromatográficas das amostras de *M. seminigra* das cinco regiões: presença e ausência de sinal da substância **(1)** palmitato de metila.

A análise das corridas cromatográficas permitiu observar que as substâncias (2) linoleato de metila (TR = 16,88 min), (3) oleato de metila (TR = 16,93 min) foram exclusivas do ponto de coleta do Inpa (1-6) e de uma amostra (27) da região do Puraquequara (setas escuras). A substância (4) esterato de metila foi restrita a área do Inpa e ausentes (setas vermelhas) nos cromatogramas das outras regiões Brasileirinho (13), Tarumã (24) e Iranduba (27) como evidenciado na figura (55) abaixo:

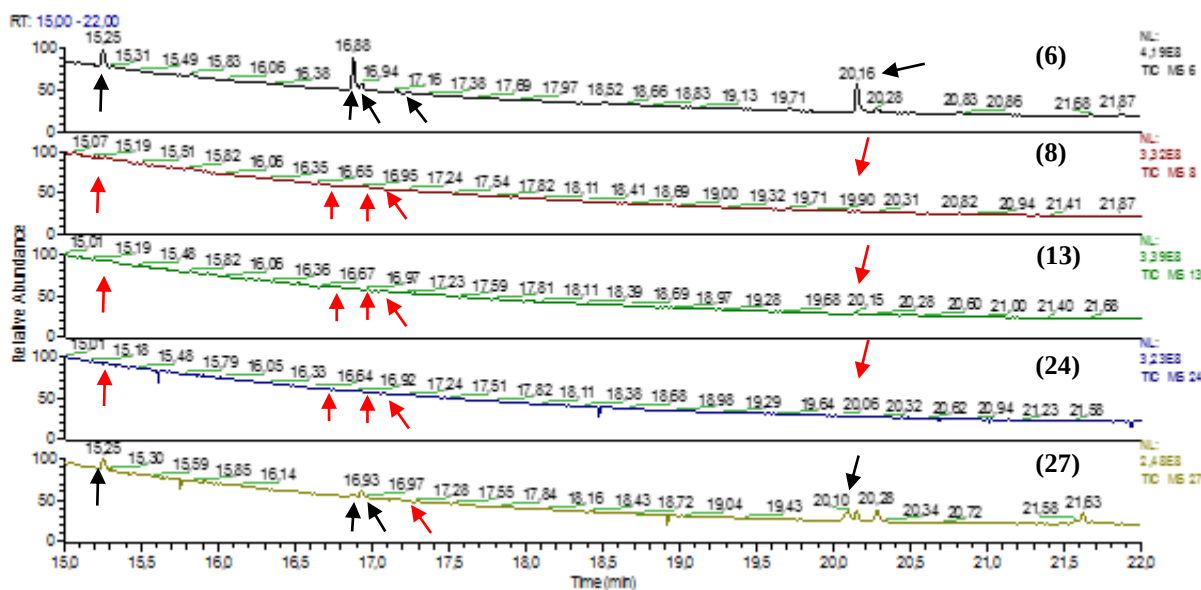


Figura 55 – Corridas cromatográficas das amostras de *M. seminigra* das cinco regiões indicando presença e ausência de sinais das substâncias (2) linoleato de metila, (3) oleato de metila, (4) esterato de metila.

A ausência das cinco primeiras substâncias nas regiões Brasileirinho, Tarumã e Iranduba da espécie de *M. seminigra*, em relação ao Inpa revelaram que o fator fitogeográfico tem influência na composição química apolar da geoprópolis (MARCUCCI, 1995; BANKOVA *et al.*, 1998; BANKOVA, 2005). As abelhas das áreas ausentes de sinais provavelmente devem visitar plantas que possuam outros constituintes, o que corrobora com a característica generalista da espécie (DA SILVA *et al.*, 2013; FERREIRA; ABSY, 2017).

Porém, não significa dizer que não haverá exceções quanto a visita de espécies vegetais. O fato de a abelha ser generalista não restringe sua visita as plantas que produzam somente uma ou todas as substâncias encontradas, como foi possível perceber na amostra (27) do Puraquequara que possui quatro dos cinco tempos de retenção (TR) em relação as amostras do Inpa, sugerindo que por mais que as abelhas sejam generalistas podem visitar a mesma espécie de planta.

Em contrapartida, ao analisar o fator presença e ausência de picos apenas no grupo de amostras da região do Puraquequara foi possível perceber que somente a amostra (27) das seis

caixas presentes possuía os ésteres metílicos (setas escuras): **(1)** palmitato de metila, **(2)** linoleato de metila, **(3)** oleato de metila, como revela a figura (56) abaixo:

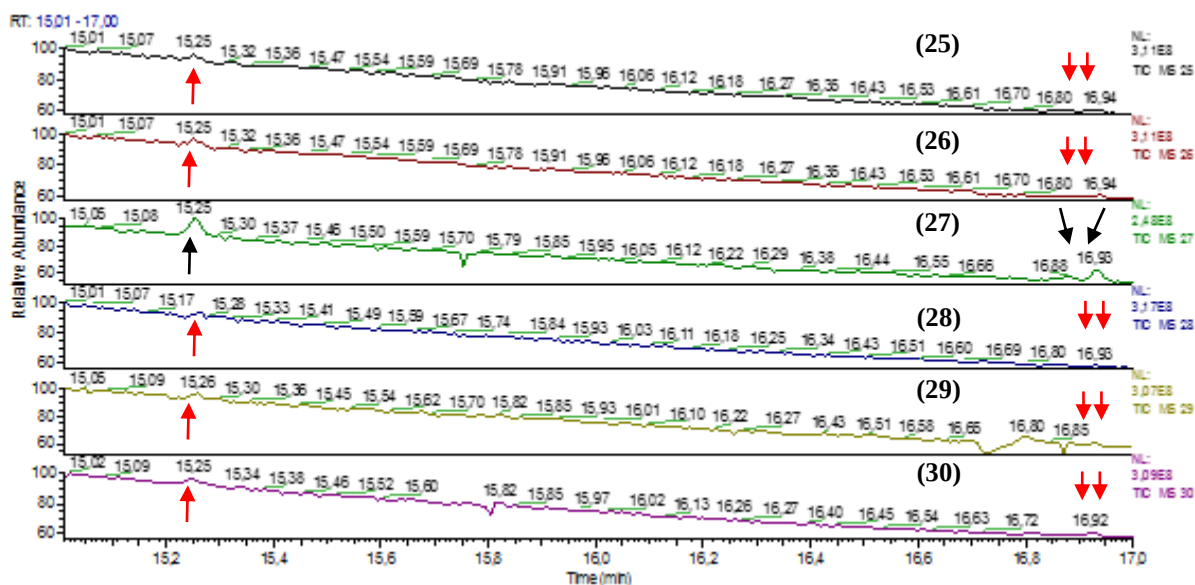


Figura 56 – Perfis cromatográficos das amostras da região do Puraquequara indicando a presença e ausência dos ésteres metílicos **(1)** palmitato de metila, **(2)** linoleato de metila, **(3)** oleato de metila;

Assim, ficou claro que mesmo realizando a coleta e os procedimentos químicos sob condições igualitárias, as abelhas sem ferrão de uma mesma localidade possuem comportamentos de visita florísticas diferenciados, o que pode ser explicado por sua característica generalista (FERREIRA; ABSY, 2017), não necessariamente as plantas visitadas (ricas em ésteres) por uma colônia serão frequentadas por outras (BARTH; FREITAS, 2015; HRNCIR; JARAU; BARTH, 2016).

Já as corridas cromatográficas das fases hexânicas das amostras da espécie *M. interrupta* referente as cinco localidades Inpa, Brasileirinho, Tarumã, Iranduba e Puraquequara, apresentaram as quatro primeiras substâncias com os tempos de retenção (TR) idênticos aos identificados nos perfis cromatográficos da *M. seminigra*, porém a substância **(5)** não identificada com TR = 20, 16 min (setas vermelhas) não foi encontrada em nenhuma das amostras representadas na figura (57) a seguir:

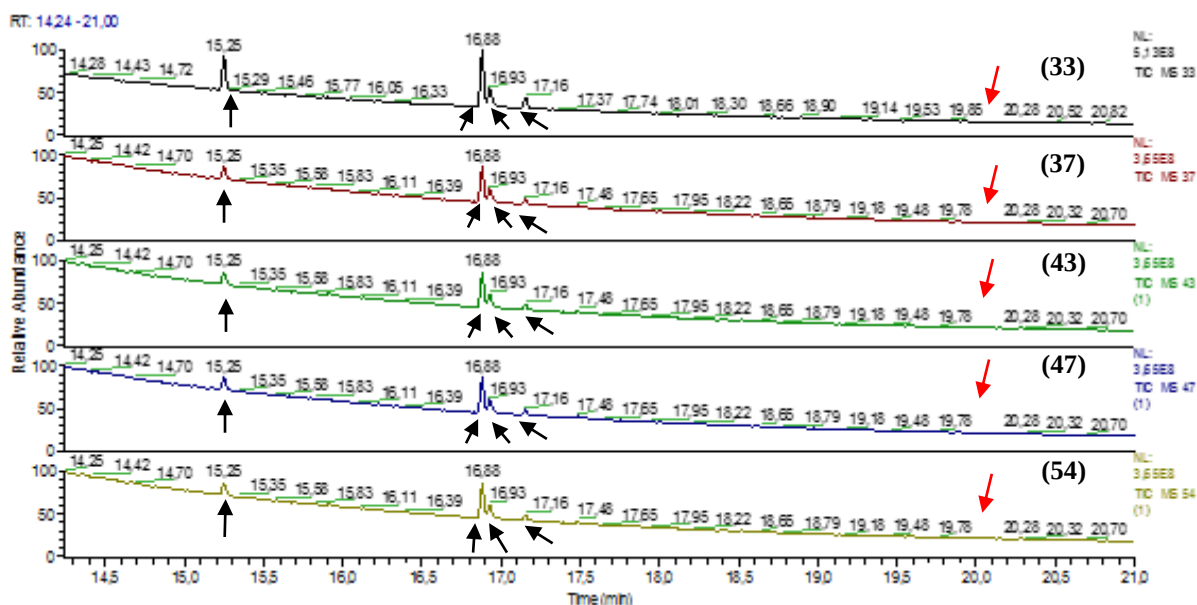


Figura 57 – Corridas cromatográficas das amostras de *M. interrupta* das cinco regiões, presença de sinais das substâncias (1-4) e ausência da (5) TR = 20,16 min.

A presença das substâncias químicas ésteres metílicos: (1) palmitato de metila, (2) linoleato de metila, (3) oleato de metila e (4) esterato de metila em todas as amostras, mostra que o fator seletividade das plantas para a espécie *M. interrupta* reflete diretamente na composição química da geoprópolis. A abelha visita o conjunto de espécies florísticas menor que a *M. seminigra* apresentando pouca ou nenhuma variabilidade nas substâncias químicas presentes diferentemente da espécie mais generalista (BANKOVA *et al.*, 1998; VELIKOVA *et al.*, 2000b; DA SILVA, 2012; FERREIRA; ABSY, 2013; ARAUJO *et al.*, 2015).

As substâncias foram definidas pelos tempos de retenção (TR) na base de dados do equipamento e foram comparadas junto pelos perfis de fragmentação (Figura 58 e 59).

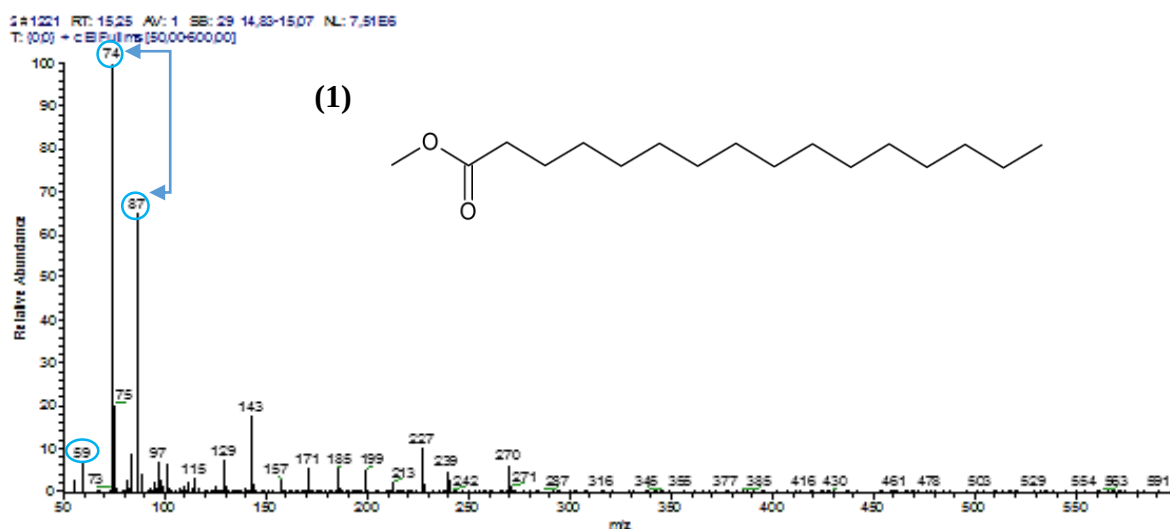
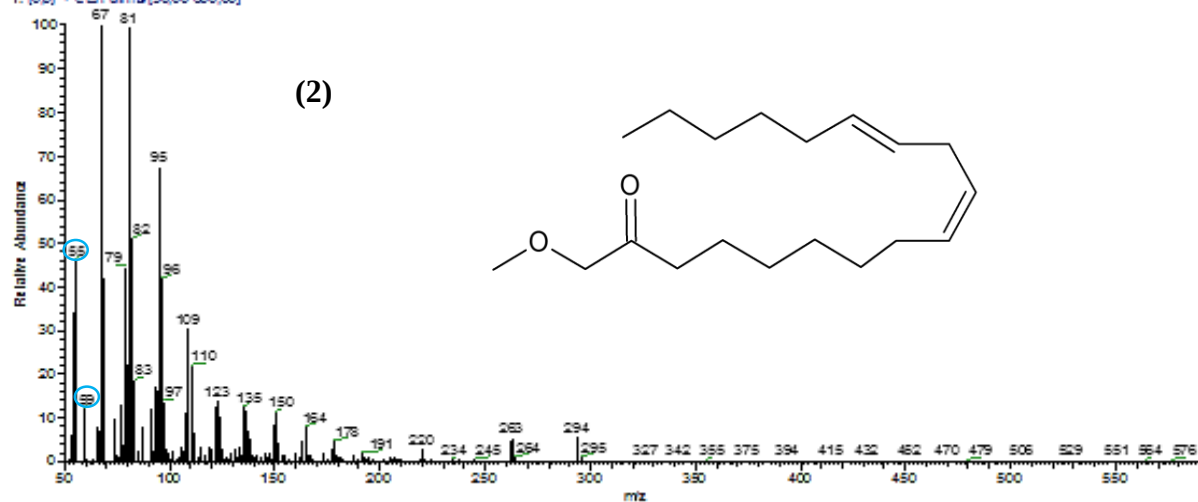
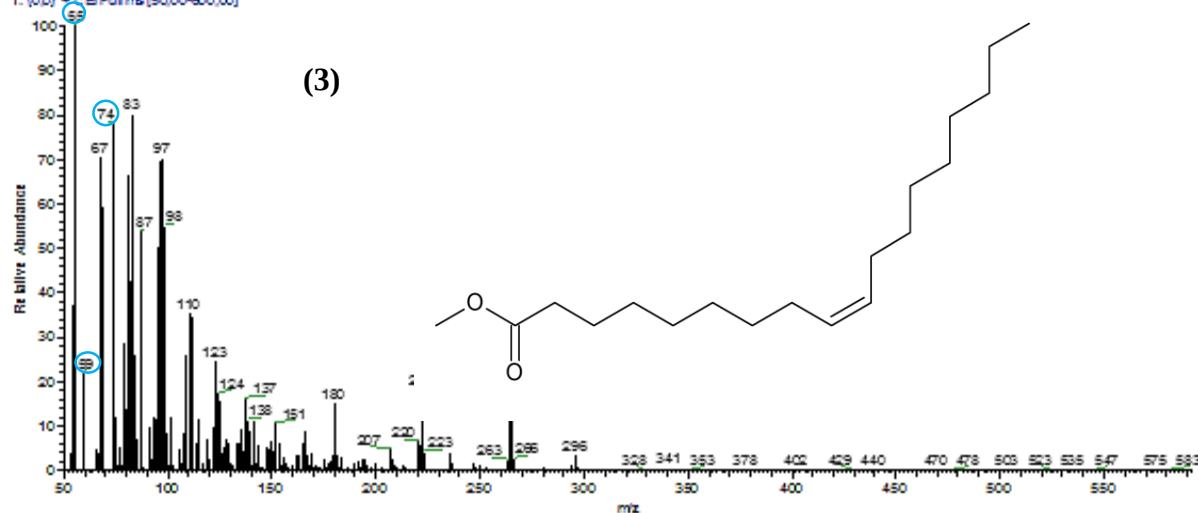


Figura 58 – Espectro de massa da substância: (1) hexadecanoato de metila - palmitato de metila (94,04%-NIST);

1: 1415 RT: 16.88 AV: 1 SB: 33 15,49-16,76 NL: 5,35E5
T: (0.0) - cBFull.ms (50,00-600,00)



4: 1421 RT: 16.93 AV: 1 SB: 17 16,50-16,64 NL: 1,95E5
T: (0.0) - cBFull.ms (50,00-600,00)



3: 1448 RT: 17.16 AV: 1 SB: 52 14,70-15,12 NL: 4,64E7
T: (0.0) - cBFull.ms (50,00-600,00)

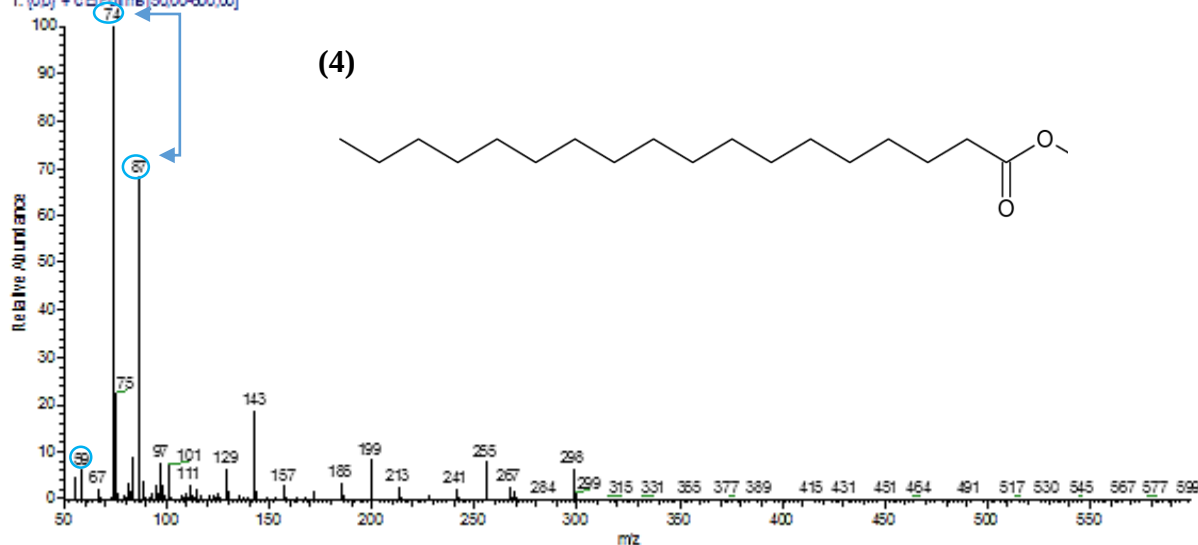


Figura 59 – Espectros de massas das substâncias: (2) (Z,Z)- 9,12-octadecadienoato de metila - linoleato de metila; (3) metil-cis-9-octadecenoato - oleato de metila (95,28%-NIST); (4) octadecenoato de metila - esterato de metila (92,48%-NIST);

A definição das substâncias **(1)** e **(4)** foi devida ao seu perfil de fragmentação característicos de ésteres metílicos sem insaturações entre os carbonos nas cadeias acíclicas. As substâncias revelaram a presença do pico base m/z : 74 e de um segundo pico m/z : 87 também presente nestas estruturas químicas, além de um terceiro pico m/z : 59 com representação muito fraca mas que pode ser um indicativo da função orgânica na substância definida (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; PAVIA *et al.*, 2010;).

As substâncias **(2)** e **(3)** não apresentaram nos seus perfis o íon m/z : 87 já mencionado acima o que indicaria a presença do grupo funcional dos ésteres de forma direta. Porém, o íon m/z : 74 aparece na amostra **(3)** e terceiro íon m/z : 59 também característico da fragmentação de ésteres aparece de forma minoritária em ambos os espectros. Outro íon presente nos dois perfis foi o íon m/z : 55 característico de cadeias carbônicas com duplas ligações, o que permitiu caracterizar as estruturas químicas como sendo ésteres insaturados (MCLAFFERTY, 1959; NIBBERING, 2004; AYDOS, 2014;).

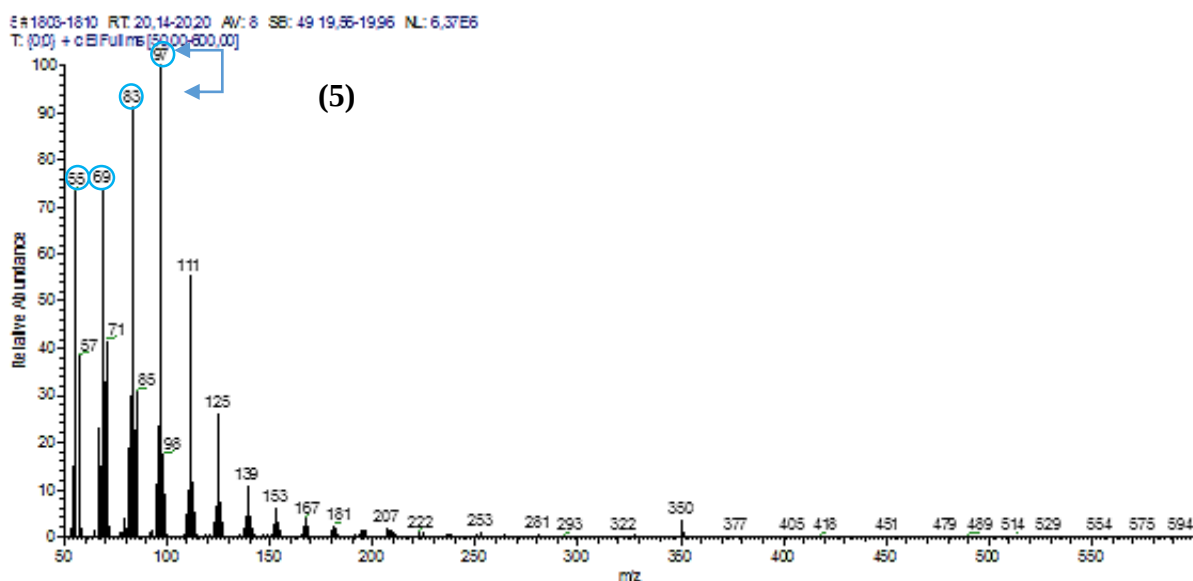


Figura 60 – Espectros de massas das substâncias: **(5)** não identificada;

A substância química **(5)** encontrada no quinto tempo de retenção ($TR = 20,18$ min) de m/z : 350 não pode ser identificada junto a literatura mas, acredita-se que possa ser alguma estrutura com uma cadeia carbônica extensa, visto que a fragmentação inicial de m/z 97 para m/z 83, diferenciando-se em 14 unidades o que sugeriu que fosse a perda de carbono metilênico (CH_2) e a outra perda sequencial das mesmas 14 unidades formando assim o m/z 69,

corroborando para que a hipótese de um hidrocarboneto fosse definida (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; BIANCO; SANTOS, 2003; MAGALHÃES, 2014).

A presença do íon m/z : 55 também permitiu inferir que existe no mínimo uma dupla ligação na estrutura porém sem uma localização precisa da mesma (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; AYDOS, 2014).

Os dados apresentados em relação as primeiras substâncias químicas favoreceram sua caracterização e identificação. As estruturas foram confirmadas através seus perfis de fragmentação característicos de substâncias já identificadas na literatura como sendo estruturas de cadeias carbônicas longas com e sem a presença de insaturações e com função característica dos ésteres (-COOR), sendo assim definidos como ésteres metílicos (SUAREZ; MENEGHETTI, 2007; VISENTAINER, 2012).

Dados da literatura confirmaram a presença de dois ésteres de ácido cinâmico por HPLC e RMN em extrato etanólico de geoprópolis da espécie de abelha sem ferrão *M. scutellaris* da cidade de Entre Rios – BA (DA CUNHA *et al.*, 2016b).

Outros estudos relataram a presença de derivados do éster *p*-cumárico ésteres em exsudado de abelhas do gênero *Apis Mellifera* por análise em HPLC de extrato hidroalcólico (FALCÃO *et al.*, 2010). A pesquisa com própolis de abelhas do estado de São Paulo que identificou substâncias derivadas como benzoato de fenila, dibutil éster do ácido carbônico e cinamato de benzila da classe dos ésteres que se encontravam presentes nas espécies botânicas visitadas pelas polinizadoras (BEZZAN; NASCIMENTO, 2001).

Os estudos indicaram que a incidência de ésteres podem estar associados ao odor das espécies florísticas visitadas, uma vez que as abelhas identificam com mais rapidez os odores e a retenção de cor das flores enxergando por UV (HARBONE, 1993; LEONARD; DORNHAUS; PPAJ, 2011).

Já os últimos 38 minutos das corridas cromatográficas revelaram picos para tempos de retenção (TR) acima de 25 minutos. Estes por sua vez, apresentaram perfis de fragmentação característicos de substâncias que foram comparados junto a base de dados do equipamento, plataformas de acesso livre e relatos da literatura.

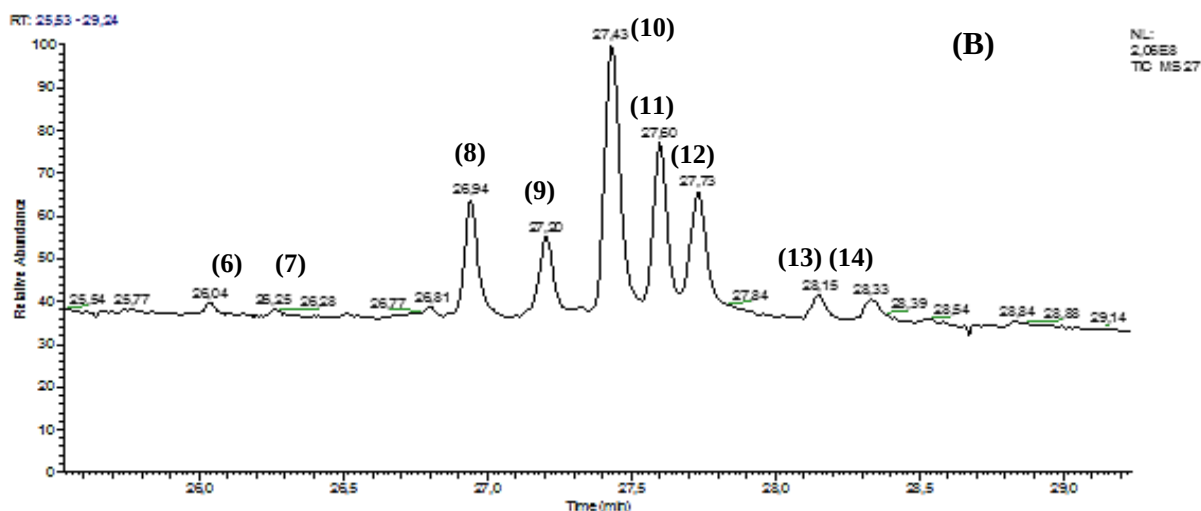


Figura 61 – Corrida cromatográfica dos últimos 38 min, sete substâncias identificadas: **(6)** lanosta-8-24-dien-3-ona; **(7)** lanosterol; **(8)** β -amirona; **(9)** β -amirina; **(10)** α -amirona; **(11)** não identificada; **(12)** α -amirina; **(13)** 24-metileno cicloartano-3-ona; **(14)** 9,19-ciclo lanostano-24-en-3- β -ol.

Os picos definidos com tempos de retenção entre 25 e 29 minutos sugeriram a presença de substâncias da classe triterpênica em comparação com estudos anteriores que utilizaram metodologia de cromatografia gasosa (CG-EM) semelhante para amostras de própolis, revelaram que tempos de retenção altos podem ser indicativos da presença de terpenos (MÁRQUEZ HERNÁNDEZ *et al.*, 2010; ARAUJO *et al.*, 2015;).

Nos cromatogramas da espécie *M. seminigra* foi possível observar a presença das substâncias **(6)** lanosta-8-24-dien-3-ona (TR = 26,03 min) apenas na região do Iranduba (19) e a **(7)** lanosterol (TR = 26,25 min) no Iranduba (19) e em uma única amostra (16) da região do Tarumã, estando ausente no outros pontos de coleta do Inpa, Brasileirinho, Puraquequara e nas amostras (13-17) do Tarumã conforme a figura (62) abaixo:

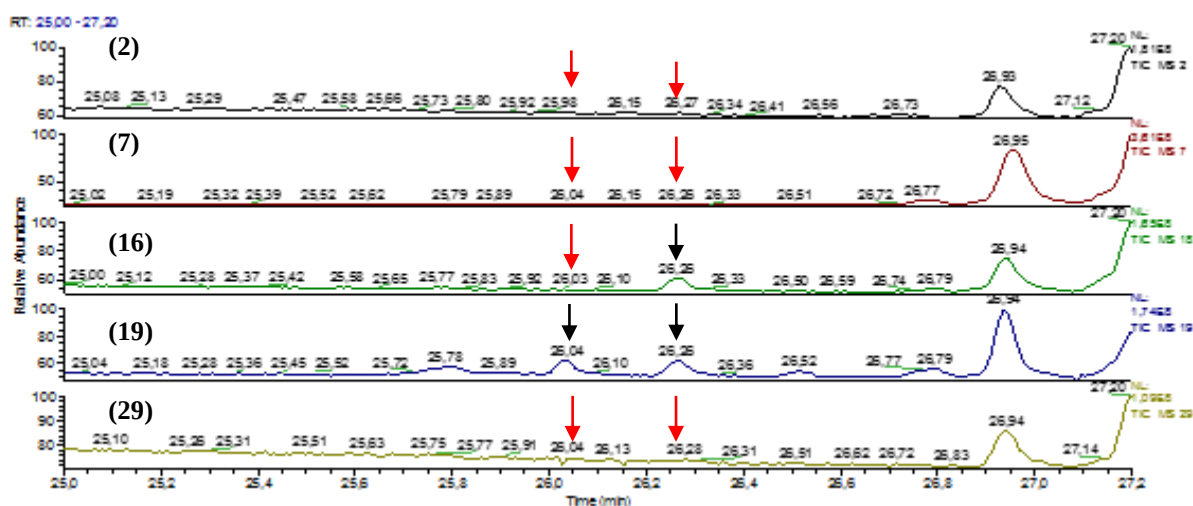


Figura 62 – Perfis cromatográficos das amostras da espécie *M. seminigra* das cinco regiões a presença e ausência das substâncias: **(6)** lanosta-8-24-dien-3-ona e **(7)** lanosterol;

Os cromatogramas revelaram que as substâncias **(6)** lanosta-8-24-dien-3-ona e **(7)** lanosterol foram exclusivas das amostras do Tarumã (16) e Iranduba (19) podendo ser indicativo de que nesse ponto de coleta e para essa espécie, os tipos de plantas escolhidas para coletar o material sejam mais propensas a ter as duas substâncias em quantidades maiores que nas outras regiões. Já os cromatogramas da espécie *M. interrupta* para as substâncias **(6)** e **(7)** confirmaram sua presença nas mesmas regiões (Tarumã e Iranduba) em relação aos outros três pontos de coleta, conforme evidenciado na figura (63) abaixo:

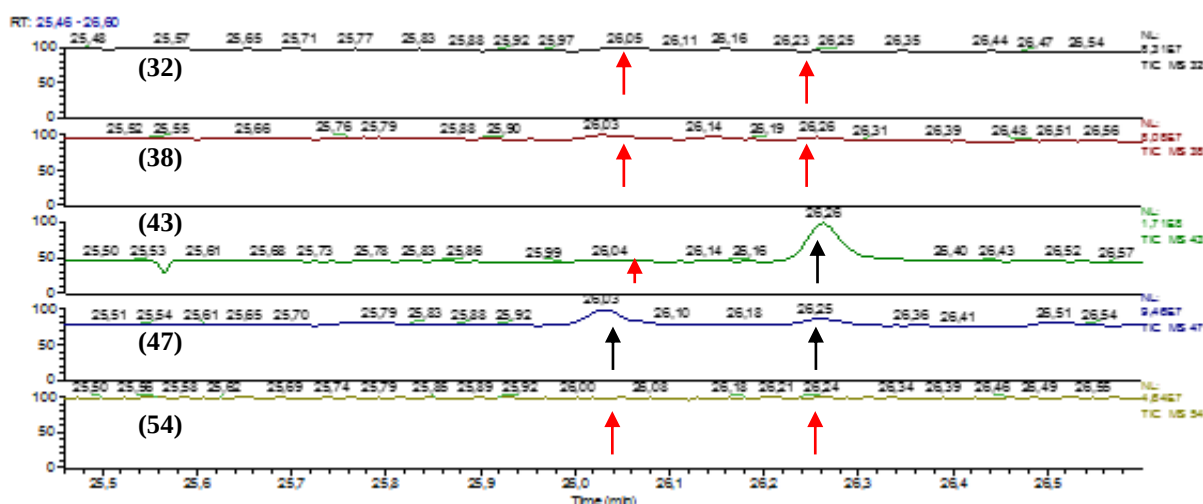


Figura 63 – Perfis cromatográficos das amostras da espécie *M. interrupta* das cinco regiões a presença e ausência das substâncias: **(6)** lanosta-8-24-dien-3-ona e **(7)** lanosterol;

A corrida cromatográfica da região do Iranduba apresentou picos com tempos de retenção próximos para as substâncias **(6)** e **(7)** em todas as amostras (46, 47 e 48). Já as amostras 43 e 45 do ponto de coleta do Tarumã apresentaram picos apenas para substância **(7)** não revelando presença na amostra 44.

Os tempos subsequentes das corridas cromatográficas para a espécie *M. seminigra*, revelaram sinais para os compostos **(8)** β -amirona (TR = 26,93 min), **(9)** β -amirina (TR = 27,20), **(10)** α -amirona (TR = 27,41 min) e **(12)** α -amirina (TR = 27,72 min) e estes estavam presentes em todas as amostras dos cinco pontos de coleta.

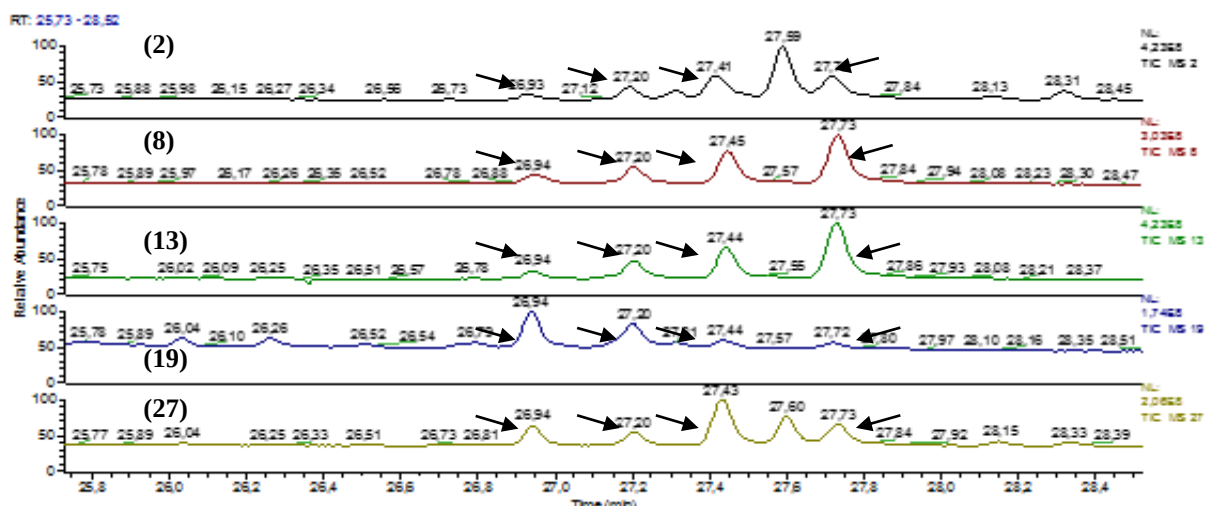


Figura 64 – Perfis cromatográficos das amostras de *M. seminigra* das cinco regiões confirmando a presença das substâncias: (8) β -amirone, (9) β -amirina, (10) α -amirone e (12) α -amirina;

A análise das corridas da espécie *M. interrupta* mostraram que as substâncias (8) β -amirone e (10) α -amirone estiveram presentes em todas as 24 amostras (31-54) de todos os pontos de coleta. Já as substâncias (9) β -amirina, e (12) α -amirina estiveram presentes pelo menos em uma ou mais amostras de cada localidades.

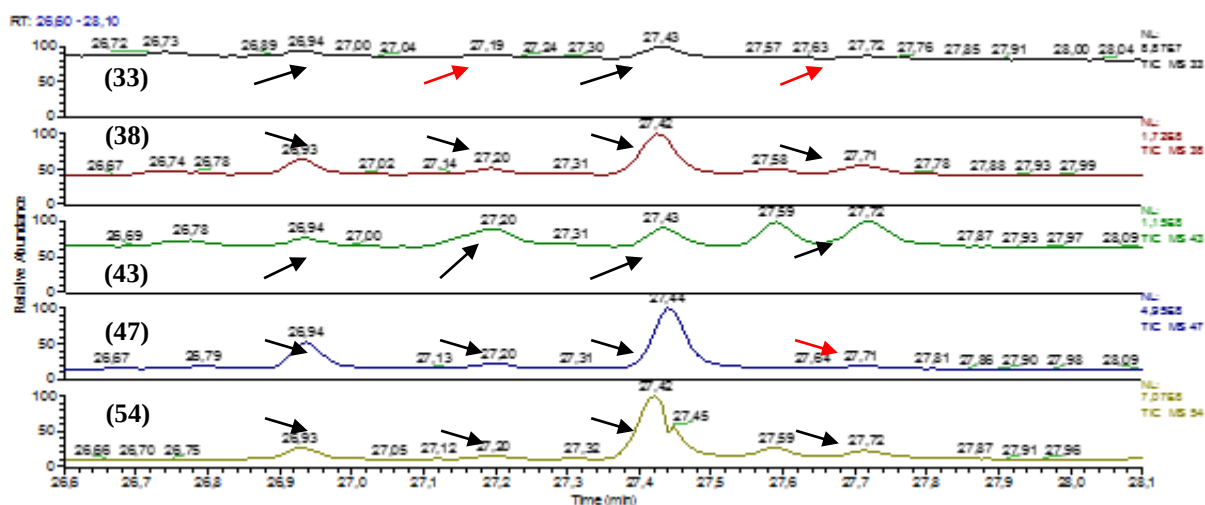


Figura 65 – Perfis cromatográficos das amostras de *M. interrupta* das cinco regiões confirmando a presença e ausência das substâncias: (8) β -amirone, (9) β -amirina, (10) α -amirone e (12) α -amirina;

As informações permitiram comprovar que todas as plantas visitadas por estas abelhas são ricas em substâncias triterpênicas. A hipótese pode ser confirmada pois grande parte da vegetação dessas localidades é rica em um extenso número de famílias florísticas visitadas como, a Burseraceae, Anacardiaceae entre outras e que geram resinas ricas em triterpenóides pentacíclicos como β -amirone, β -amirina, α -amirone e α -amirina (BANDEIRA *et al.*, 2002; CABRAL *et al.*, 2016; PÉREZ; BEST; LLANES, 2009).

O último grupo de picos observados através dos seus tempos de retenção para a espécie *M. seminigra* foram as de número **(11)** não identificada (TR = 27,58 min), **(13)** 24-metileno cicloartano-3-ona (TR = 28,14 min) e a **(14)** 9,19-ciclo lanostano24-metileno- 2-β-ol (TR = 28,32 min) que estavam presentes nas regiões do Inpa e do Puraquequara respectivamente e ausente nas demais localidades conforme indica a figura (66) a seguir:

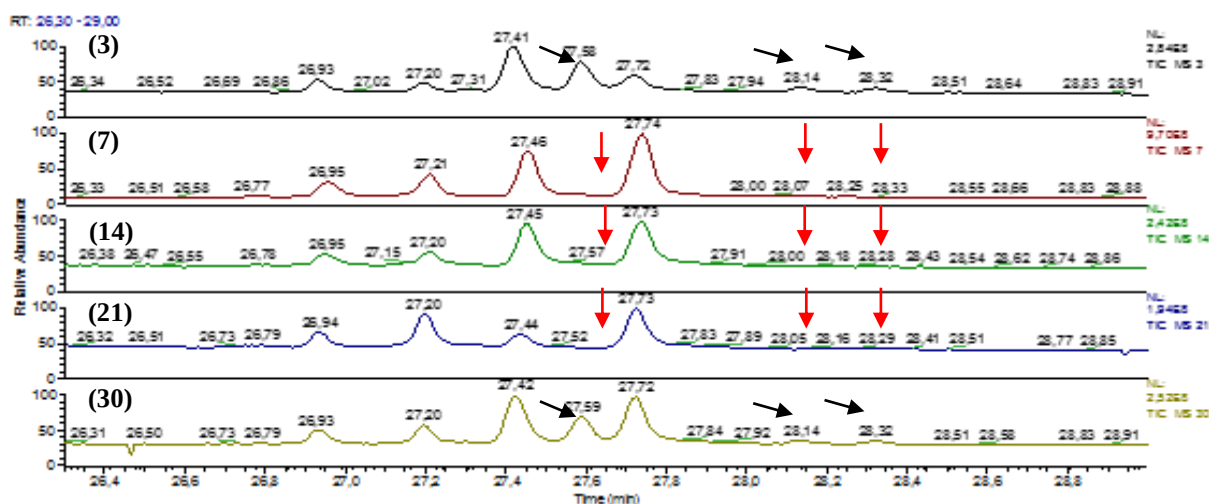


Figura 66 – Perfis cromatográficos das amostras de *M. interrupta* das cinco regiões confirmando a presença e ausência das substâncias: **(11)** não identificada, **(13)** 24-metileno cicloartano-3-ona e a **(14)** 9,19-ciclo lanostano24-metileno- 2-β-ol;

Já observando as corridas das amostras da espécie *M. interrupta* foi possível constatar que os picos das substâncias **(11)**, **(13)** e **(14)** estavam presentes em pelo duas ou mais amostras das regiões alvo de estudo, porém não houve presença da substância **(11)** na região do Inpa.

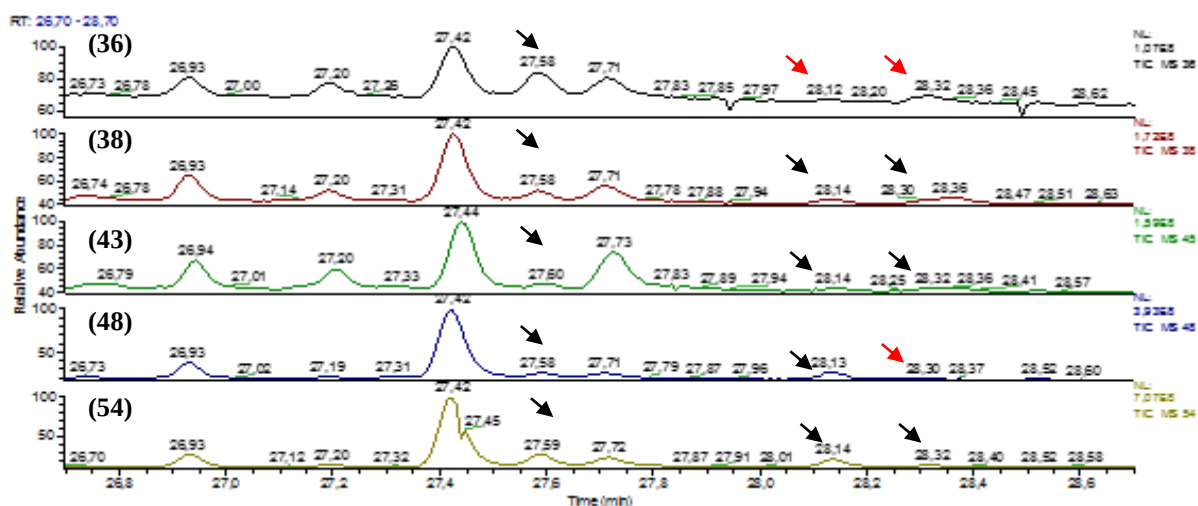


Figura 67 – Perfis cromatográficos das amostras de *M. interrupta* das cinco regiões confirmando a presença e ausência das substâncias: **(11)** não identificada, **(13)** 24-metileno cicloartano-3-ona e a **(14)** 9,19-ciclo lanostano24-metileno- 2-β-ol;

Os picos com tempos de retenção (TR) entre 26,03 e 28,35 min apresentaram perfis de fragmentação que foram comparadas junto aos dados da literatura e classificados como substâncias da classe dos triterpenos.

Recentes pesquisas com própolis de abelha sem ferrão indicam que a classe terpênica está muito presente na química do produto. Em estudo realizado na região de Palmeirândia do estado do Maranhão, utilizando a técnica (CG-EM) com extrato etanólico de geoprópolis de *M. fascicularis* Smith, relatou-se a presença de 15,9 % de triterpenos na composição da geoprópolis desta localidade (ARAÚJO *et al.*, 2015).

Outro estudo realizado com o extrato etanólico de geoprópolis das espécies *M. interrupta*, *M. quadrifasciata anthidioides* e *Tetragona clavipes* utilizando a técnica de (CG-EM), revelou a presença de diterpenos e triterpenos na composição do produto (BANKOVA *et al.*, 1998).

A presença de terpenos também foi relatada em estudo realizado com extrato etanólico de ninho de *Trigona spinipes* (abelha sem ferrão) obtido no estado de Fortaleza-CE, no qual a identificação foi feita utilizando a técnica espectrométrica de RMN (FREITAS *et al.*, 2008).

Os primeiros triterpenos identificados nas corridas cromatográficas foram caracterizados como tetracíclicos sendo eles: **(6)** lanosta-8-24-dien-3-ona (TR = 26,03 min), **(7)** lanosterol (TR = 26,25 min).

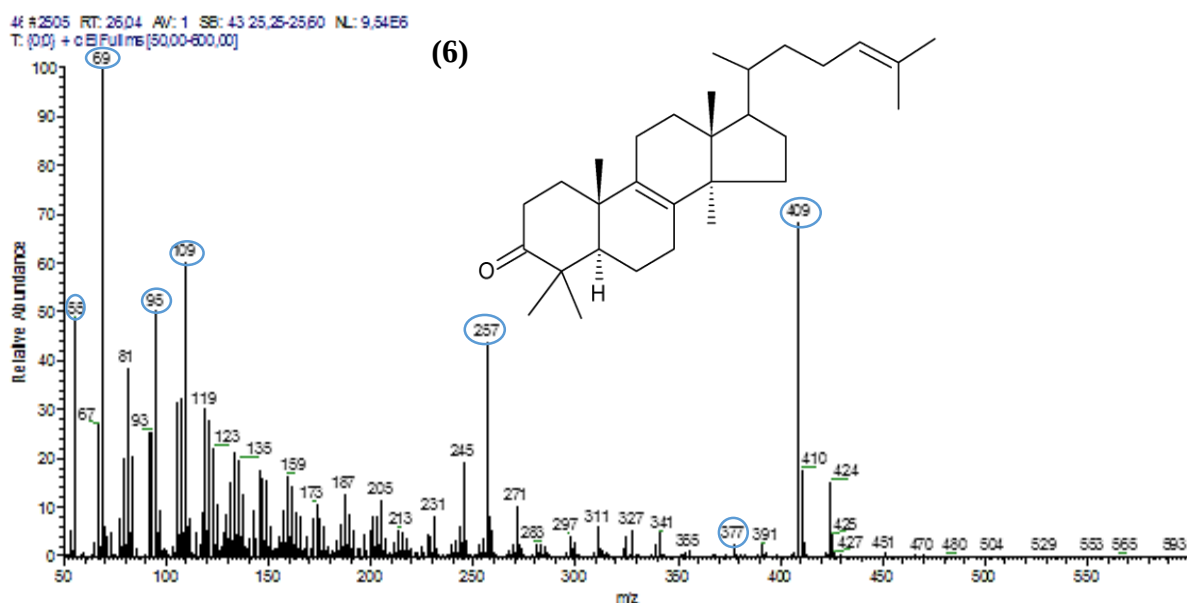


Figura 68 – Espectros de massas das substâncias: **(6)** lanosta-8-24-dien-3-ona;

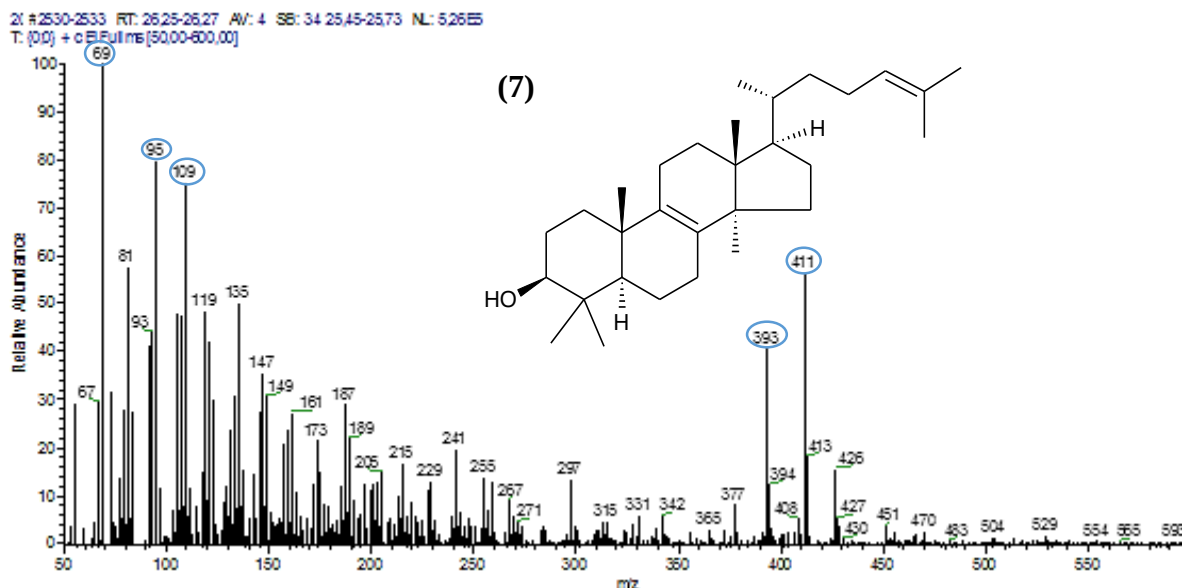


Figura 69 – Espectros de massas das substâncias: (7) lanosterol;

As substâncias (6) lanosta-8-24-dien-3-ona e (7) lanosterol foram definidas como sendo triterpenos tetracíclicos devido ao perfil de fragmentação referentes aos íons m/z : 69 (pico base = $-C_5H_9$), m/z : 95 ($-CH_2$), m/z : 109 ($-C_8H_{13}$) e m/z : 55, presentes nas duas estruturas, porém a substância (6) apresentou outras duas fragmentações que são específicas para caracterização da molécula que são m/z : 391 e m/z : 409.

A comparação para se chegar a substância (6) foi realizada utilizando a data base (NIST), e a substância mais próxima indicada foi a lanosta-8-24-dien-3-ol (m/z : 426) assim, analisando a diferença de massa do íon molecular encontrado m/z : 424 e as duas fragmentações próximas m/z : 257 e m/z : 391, chegou-se à conclusão de que na posição referente ao carbono (3), existe a função cetona ($C = O$) em detrimento da hidroxila ($-OH$) da substância indicada pela base de dados, o que explica dois números a menos de m/z : 424, referindo-se a dois (H_2) a menos da dupla ligação da função.

Já a substância (7), além de apresentar os íons já citados anteriormente m/z : 69, m/z : 95, m/z : 109, também revelou a presença dos íons m/z : 411 (característico da perda de $-CH_3$) e m/z : 393 (perda de H_2O do m/z : 411) peculiares da molécula lanosterol (m/z : 426). A confirmação se deu por comparação as datas base (NIST, HMDB entre outras) além da literatura, pois a substância já havia sido relatada em estudo realizado extrato metanólico de própolis do Brasil da espécie *Tetragona fiebrigi* por CG/EM (VELIKOVA *et al.*, 2000b)

Em estudo realizado com fase diclorometano referente ao batume (geoprópolis) de *M. scutellaris*, comprovou a existência da substância química lanosterol presente dentro do produto retirado da colônia desta espécie de abelha sem ferrão (PIANARO, 2007).

Outro estudo realizado extrato hidroalcoólico de geoprópolis de *M. fasciculata* Smith, de dois municípios do estado do Maranhão - MA, Palmeirândia e Fernando Falcão, permitiu estabelecer um comparativo da composição química do produto retirado de colônias e ficou comprovada a presença da substância triterpênica lanosterol apenas em uma das duas localidades de coleta, provando mais uma vez, as fontes florísticas visitadas tem influência direta na formação da geoprópolis das abelhas sem ferrão (BATISTA *et al.*, 2016).

As outras quatro substâncias foram identificadas como sendo triterpenos pentacíclicos: **(8)** β -amirona (TR = 26,93 min), **(9)** β -amirina (TR = 27,20 min), **(10)** α -amirona (TR = 27,41 min), **(12)** α -amirina (TR = 27,72 min) como mostra as figuras (70 e 71) a seguir:

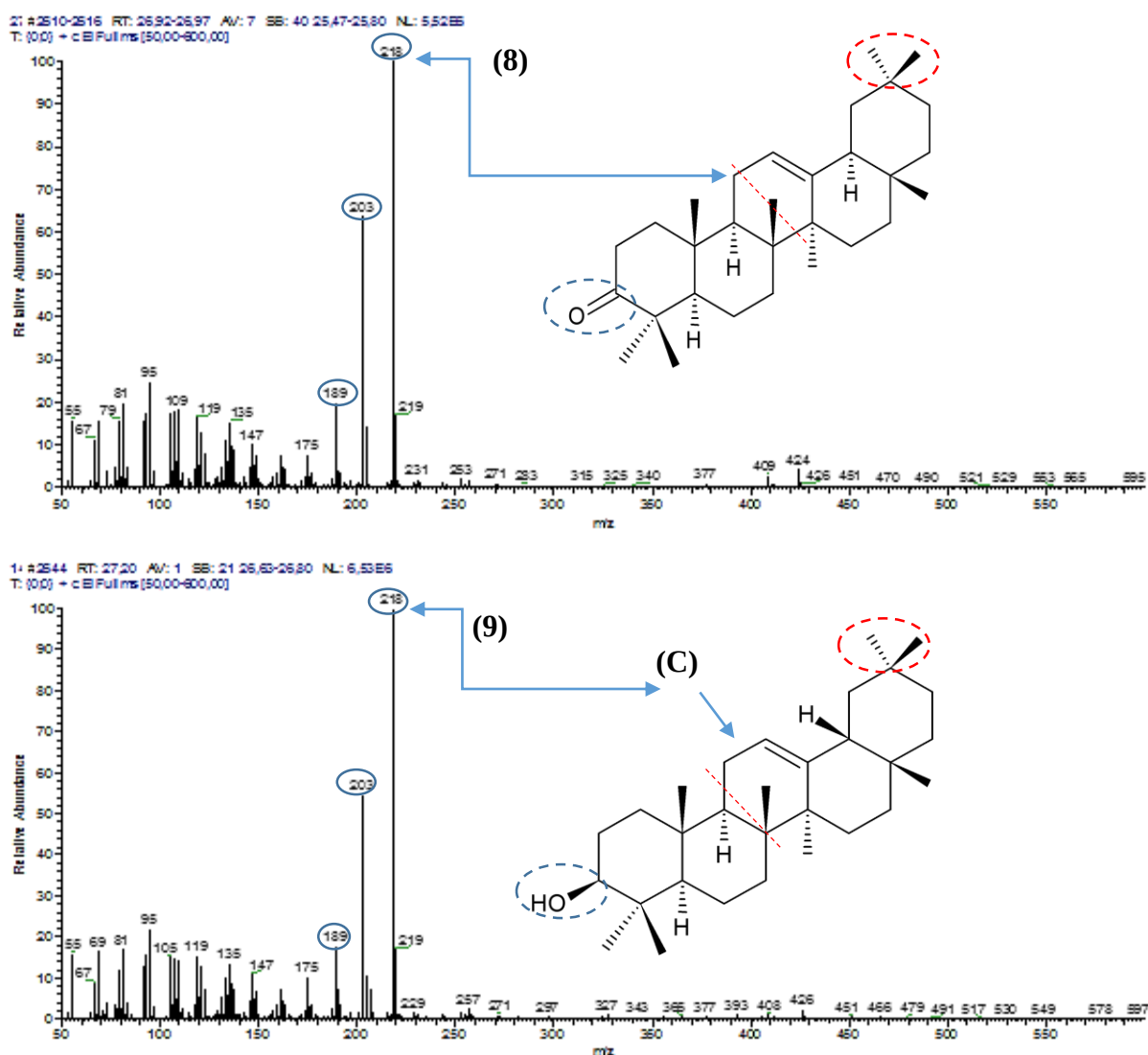


Figura 70 – Espectros de massas das substâncias: **(8)** β -amirona, **(9)** β -amirina;

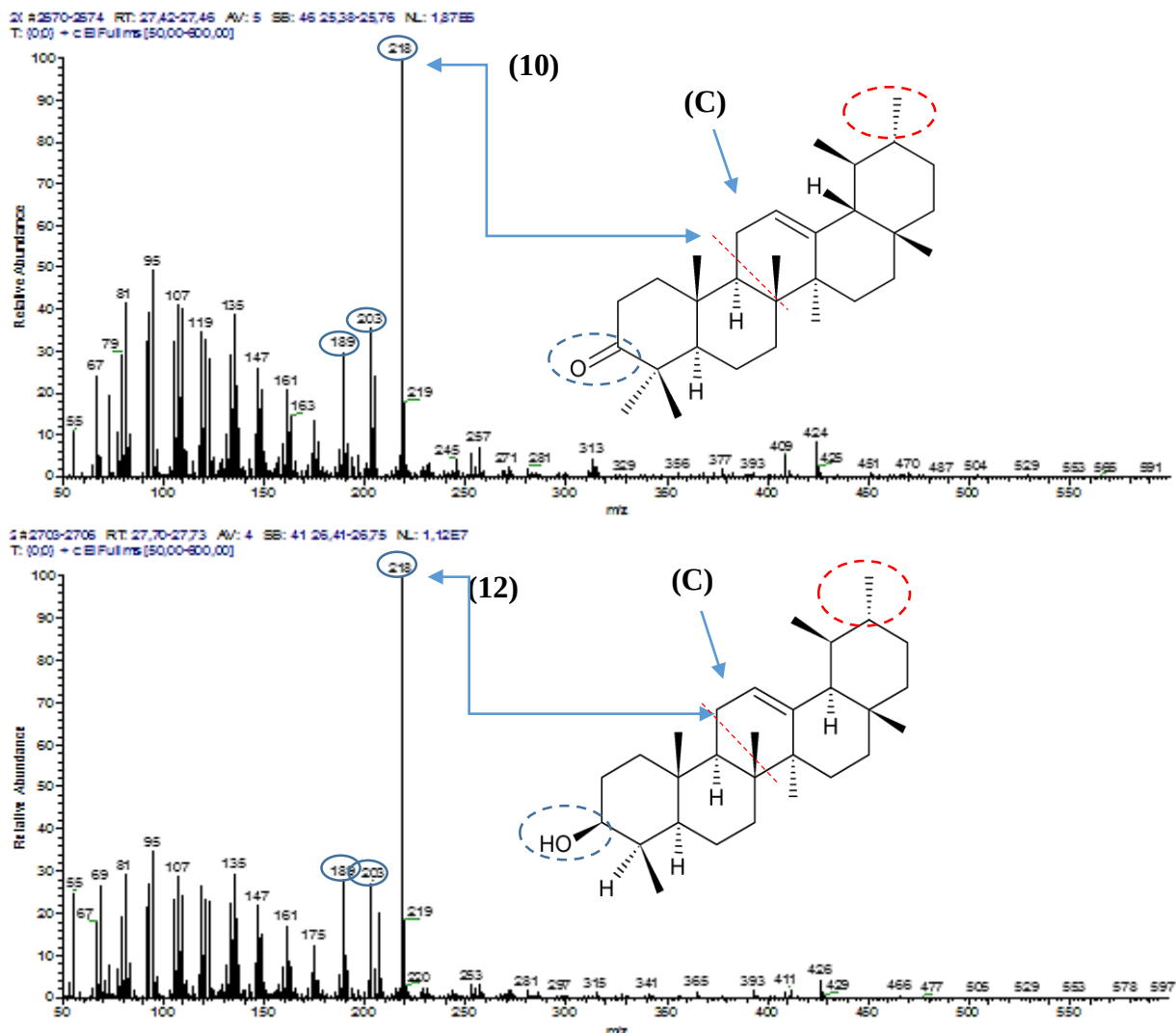


Figura 71 - Espectro de massa da substância: (10) α -amirone e (12) α -amirina.

As fragmentações subsequentes indicadas nos picos (8), (9), (10) e (12) revelaram ser triterpenos pentacíclicos. Os fragmentos m/z : 218 (pico base) referentes a quebra que ocorre no anel C das estruturas triterpênicas, o m/z : 203 que foi a retirada do radical $-\text{CH}_3$ e o m/z : 189. Assim, a presença das substâncias (9) β -amirina e (12) α -amirina as quais possuem o mesmo íon molecular m/z : 426, diferiram-se nas intensidades das fragmentações dos íons m/z : 203 e 189, iguais para α -amirina e α -amirone e distintos na β -amirina e β -amirone (Figuras 70 e 71) (BUDZIKIEWICZ; WILSON; DJERASSI, 1963; DJERASSI *et al.*, 1962; LEITE, 2016).

Outro fator que serviu para diferenciar as substâncias α -amirina e β -amirina foi a presença do grupo metila ($-\text{CH}_3$) no carbono (20) circulado de vermelho nas figuras (70 e 71) acima, pois a substância α -amirina possui duas metilas na posição e a β -amirina apenas uma. Já as outras duas substâncias (8) β -amirone e (10) α -amirone (m/z : 424) se diferenciam da β -amirina e α -amirina (m/z : 426) por possuírem na estrutura a função cetona ($\text{C} = \text{O}$) no carbono

(3) em detrimento da hidroxila presente nas estruturas **(9)** e **(10)** (BUDZIKIEWICZ; WILSON; DJERASSI, 1962; DJERASSI *et al.*, 1962;).

As substâncias β -amirina e α -amirina são os triterpenos mais presentes na própolis de abelha sem ferrão. Estudos realizados com extrato hidroalcólico de geoprópolis de *M. fasciculata* Smith da região da cidade de Palmeirinha – MA constatou a presença por CG-EM das quatro substâncias químicas, além de verificar a atividade antimicrobiana contra o fungo *Candida albicans* (ARAÚJO *et al.*, 2015).

No estudo realizado com extrato de própolis amarela de Cuba por CG-EM foram identificadas as substâncias β -amirina e α -amirina. Porém, foi possível identificar pela primeira vez na fase hexânica de extrato de geoprópolis de *M. interrupta* e *M. seminigra*.

Outro estudo realizado com extrato etanólico de geoprópolis das espécies *M. compressipes*, *M. quadrifasciata anthidioides* e *Tetragona clavipes* com CG-EM, identificou a presença das substâncias β -amirina e α -amirina (BANKOVA *et al.*, 1995).

A análise química do extrato de própolis de *Apis Mellifera* do Brasil relatou a presença das substâncias β -amirina e α -amirina e o material extraído apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias gram-negativas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella* spp. e as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* (SILVA *et al.*, 2008).

Em estudo realizado com extratos geoprópolis das espécies *M. interrupta* e *M. seminigra* da cidade de Manaus-AM, também relatou as substâncias β -amirina e α -amirina (DA SILVA, 2012). Já as últimas substâncias foram caracterizadas como sendo triterpenos derivados dos ciclo-artanos: **(13)** 24-metileno cicloartano-3-ona (TR = 28,13 min), **(14)** 9,19-ciclo lanostano-24-en- 2- β -ol (TR = 28,31 min) conforme a figura (72 e 73) a seguir:

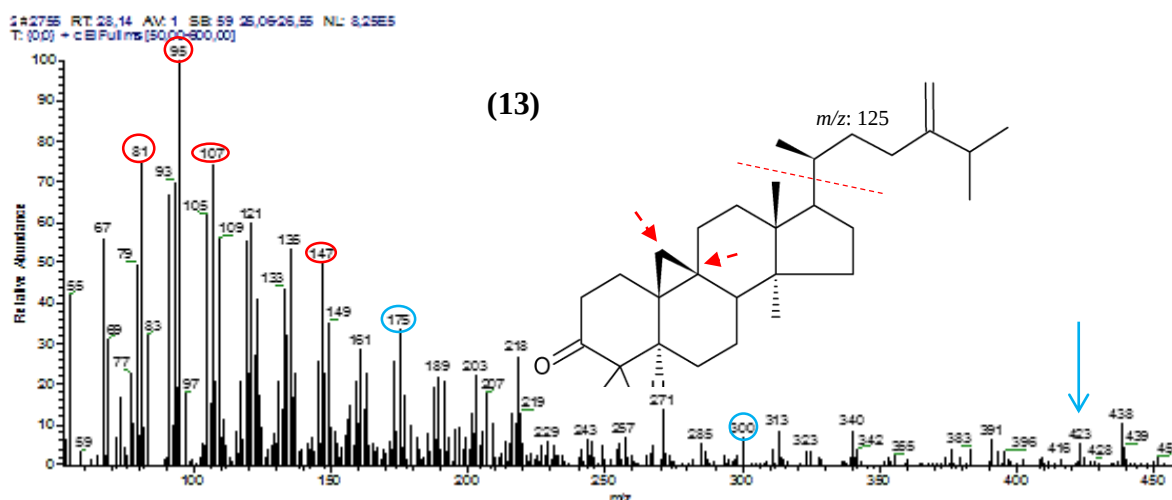


Figura 72 - Espectro de massas da substância: **(13)** 24-metileno cicloartano-3-ona.

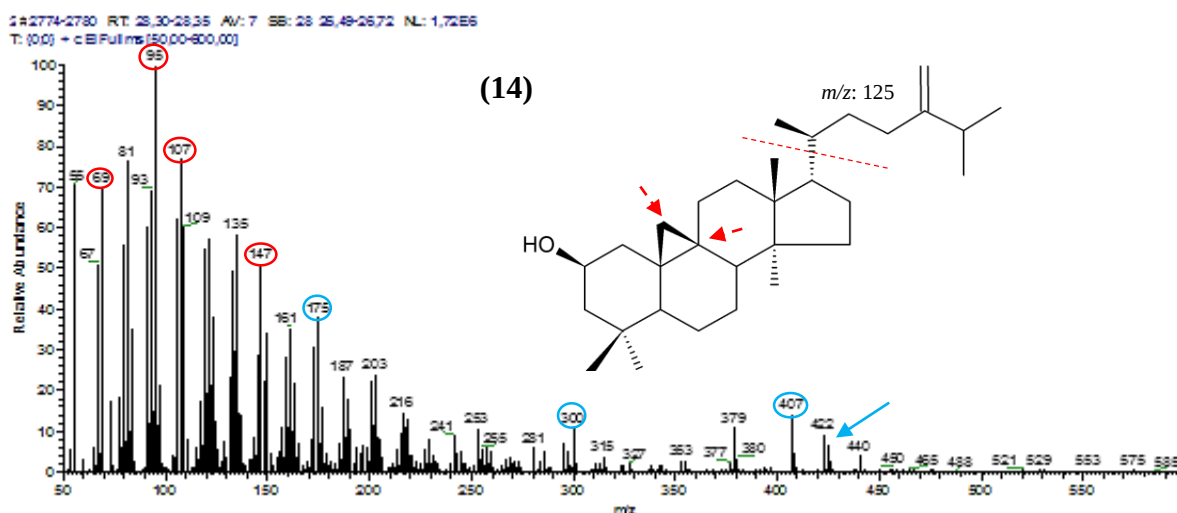


Figura 73 - Espectro de massas da substância: (14) 9,19-ciclo lanostano-24-en- 2-β-ol.

Os perfis de fragmentação das substâncias (13) m/z : 438 e (14) m/z : 440 acima são bem similares. Estes revelaram a presença dos íons fragmentados (círculo azul) m/z : 425 (seta azul) referente a perda de um radical metil ($-\text{CH}_3$), m/z : 407 característico da perda da molécula de água, m/z : 300 resultante da quebra na ligação dos carbonos 9:19 (setas vermelhas tracejadas), além do íon m/z : 175 ($300-\text{C}_9\text{H}_{17}^+$) referente a perda da cadeia lateral (linha tracejada) de m/z : 125 (AYATOLLAHI *et al.*, 2011; SOARES, 2015).

Além dos íons já apresentados, a presença dos íons (círculo vermelho) m/z : 95 (pico base), m/z : 69, m/z : 107, m/z : 147 em ambos os espectros, também auxiliaram na comparação com dados de estudos anteriores, comprovando assim, a existência das substâncias 24-metileno cicloartano-3-ona e 9,19-ciclo lanostano-24-en-2-β-ol (DA SILVA, 2012).

Os relatos da literatura revelam que as substâncias 24-metileno cicloartano-3-ona e 9,19-ciclo lanostano-24-en-2-β-ol já haviam sido identificadas em extrato de geoprópolis de *M. seminigra* e *M. interrupta* utilizando a técnica de cromatografia gasosa (DA SILVA, 2012)

A análise química realizada com extrato etanólico do ninho da espécie *Trigona spinipes*, coletada em Fortaleza – CE, foi possível comprovar existência de triterpenos do tipo cicloartano como o ácido 3β-hidroxi-24-metilenocicloartano-26-óico, por isolamento utilizando a técnica de RMN (FREITAS *et al.*, 2008).

Outro estudo realizado com própolis de abelha do estado de Teresina – PI, durante diferentes estações do ano, foi possível identificar a presença de diferentes tipos de triterpenóides cicloartano como o ácido mangferólico, 24-metilenocicloartano-3β,26-diol, ácido isomagiferólico, e o ácido ambólico revelando que a composição do produto pode possuir as mais diversas representações de substâncias químicas, neste caso triterpenos (DA SILVA *et al.*, 2005)

Já a substância **(11)** não apresentou identificação definida junto a biblioteca do equipamento, nem as datas bases livres e nem junto aos dados presentes na literatura. Porém, houve uma tentativa de definir a classe química e explicar o perfil de fragmentação encontrado.

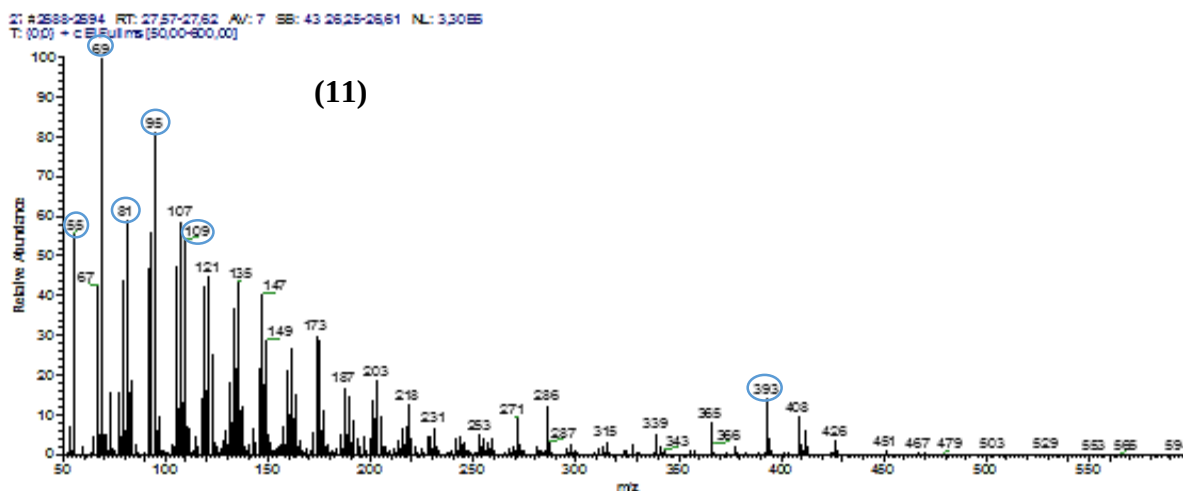


Figura 74 - Espectro de massas da substância **(11)** não identificada presente em amostras de ambas as espécies de *Melipona*;

O perfil de fragmentação da substância **(11)** sugeriu que a mesma poderia ser definida como um triterpeno composto de quatro anéis (tetracíclico), visto que seu perfil de fragmentação apresentou ligeira semelhança ao apresentado na substância **(7)**, gerando os íons, m/z : 69 (pico base = $-C_5H_9$), m/z : 95 ($-CH_2$), m/z : 109 ($-C_8H_{13}$), m/z : 81 que sugerem perdas sequências de carbonos metilênicos ($-CH_2$), além de possuir os íons m/z : 426 (íon molecular), m/z : 408 (referente a perda de $-CH_2$) e o m/z : 393 indicativo da perda da metila ($-CH_3$) (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

Os perfis cromatográficos das fases hexânicas das 54 amostras de ambas as espécies de abelha sem ferrão, *M. seminigra* e *M. interrupta*, revelaram que a composição apolar da geoprópolis é riquíssima e que os constituintes químicos vão desde ésteres metílicos a triterpenos das mais variadas estruturas com destaque para os tetra e pentacíclicos, além dos derivados dos cicloartano. Estas classes auxiliam as plantas na composição das mais variadas funções seja como defesa contra microorganismos, fungos, até na sua polinização, sendo atrativas as abelhas sem ferrão pelo aspecto odorífero das plantas (HARBONE, 1993; LEONARD; DORNHAUS; PAPAJ, 2011). A variação se dar provavelmente não só pela característica de visita de ambas as espécies de abelhas mas também pela biodiversidade fitogeográfica na qual elas estavam inseridas (BANKOVA *et al.*, 1998; HUANG *et al.*, 2014).

5.8. Ensaios das atividades Químicas e Biológicas

5.8.1. Detecção de Atividade Antioxidante e Fenóis Totais.

Os resultados quantitativos referentes ao potencial antioxidante nos extratos metanólicos das principais amostras das espécies *M. seminigra* e *M. interrupta*, dentro do grupo dos 54 indivíduos, foram organizados nas tabelas (42 e 43) e os valores de respostas representadas no Gráfico (1) na sequência:

Tabela 24 – Valores de Média $\pm$ DP de CI50 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e FT ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) das principais amostras de *M. seminigra*.

Regiões	Amostras <i>M. seminigra</i>	CI50 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Fenóis Totais ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Inpa	2	57,01 $\pm$ 0,17	367,01 $\pm$ 1,39
	3	251,20 $\pm$ 3,46	113,79 $\pm$ 0,91
	4	67,55 $\pm$ 0,51	366,66 $\pm$ 1,39
	5	142,10 $\pm$ 1,53	248,85 $\pm$ 0,71
	6	74,65 $\pm$ 8,16	342,87 $\pm$ 1,21
Brasileirinho	7	212,78 $\pm$ 1,07	129,31 $\pm$ 0,34
	9	156,89 $\pm$ 1,52	40,00 $\pm$ 0,91
	10	486,38 $\pm$ 3,80	36,55 $\pm$ 0,69
Tarumã	17	539,24 $\pm$ 8,65	14,59 $\pm$ 0,71
	18	293,23 $\pm$ 3,20	39,19 $\pm$ 1,10
Iranduba	19	305,96 $\pm$ 1,08	19,19 $\pm$ 1,10
	20	108,33 $\pm$ 1,02	57,70 $\pm$ 1,05
	21	193,09 $\pm$ 1,89	25,40 $\pm$ 1,43
	22	235,10 $\pm$ 3,42	24,71 $\pm$ 0,79
	23	261,64 $\pm$ 4,20	35,40 $\pm$ 1,39
	24	154,18 $\pm$ 2,64	49,42 $\pm$ 1,73
Puraquequara	27	212,78 $\pm$ 1,07	60,34 $\pm$ 0,91
Quercetina	-	7,76 $\pm$ 0,05	-
Ácido gálico	-	-	1000 $\pm$ 0,01

* Melhores respostas de CI50 e Fenóis Totais destacados na cor azul.

* Baixas respostas de CI50 e Fenóis Totais destacados na cor vermelha.

Os resultados mostraram que as amostras da espécie mais generalista (*M. seminigra*) revelaram bons valores para atividade antioxidante. A geoprópolis das caixas (2, 4, 5 e 6) da região do Inpa demonstrou resultados mais significativos nas concentrações de 57,01; 67,55; 142,10 e 74,65 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente quanto ao sequestro de 50% dos radicais de livres presentes no ensaio de DPPH.

Já os fenóis totais apresentaram altas concentrações 367,01; 366,66; 248,85 e 342,87 $\mu\text{g/mL}$ indicando a forte presença de substâncias hidroxiladas (OH) o que corroborou com os resultados apresentados pela quimiometria junto as técnicas de ESI-MS e RMN e acrescida dos dados de LC-MS, já que foram detectadas as presenças de substâncias flavonoídicas como

naringenina, aromadendrina, taxifolina, além dos ácidos fenólicos como glucônico, quínico e derivados do metil galato.

As outras regiões apresentaram valores de CI50 acima de 150,0 µg/mL e de FT abaixo de 65,0 µg/mL indicando uma menor quantidade de compostos de natureza fenólica, com destaque para as geoprópolis das regiões do Brasileirinho e Tarumã que apresentaram os valores de CI50 de 486,38 e 539,24 µg/mL; além de 14,59 e 36,55 µg/mL para fenóis totais. Tais dados foram associados as informações químicas obtidas através das técnicas empregas, justificando a presença de alguns poucos ácidos fenólicos e maior comparecimento de benzofenonas e substâncias terpênicas.

Tabela 25 - Valores de Média ± DP de CI50 (µg.mL⁻¹) e FT (µg.mL⁻¹) das principais amostras de *M. interrupta*.

Regiões	Amostras <i>M. interrupta</i>	CI50 (µg.mL ⁻¹)	Fenóis Totais (µg.mL ⁻¹)
Inpa	31	271,88 ± 2,15	8,16 ± 1,21
	33	52,71 ± 0,29	117,35 ± 0,52
	34	84,40 ± 0,56	104,71 ± 1,39
	35	51,73 ± 0,47	125,51 ± 0,91
	36	42,97 ± 0,48	103,79 ± 0,91
Brasileirinho	38	386,25 ± 1,07	70,46 ± 0,86
	39	128,97 ± 0,95	42,18 ± 1,05
	41	412,16 ± 1,19	25,40 ± 1,30
	42	225,11 ± 0,97	31,49 ± 0,97
Tarumã	43	115,18 ± 1,81	45,63 ± 1,21
	44	129,12 ± 2,48	77,70 ± 1,96
	45	136,75 ± 0,08	52,29 ± 1,30
Iranduba	47	455,47 ± 1,02	24,36 ± 0,71
	48	54,14 ± 0,46	151,37 ± 0,69
Puraquequara	49	63,20 ± 0,21	134,82 ± 0,91
	50	115,65 ± 1,49	41,26 ± 0,71
	51	61,13 ± 0,73	124,59 ± 2,24
Quercetina	-	7,76 ± 0,05	
Ácido gálico	-	-	1000 ± 0,01

* Melhores respostas de CI50 e Fenóis Totais destacados na cor azul.

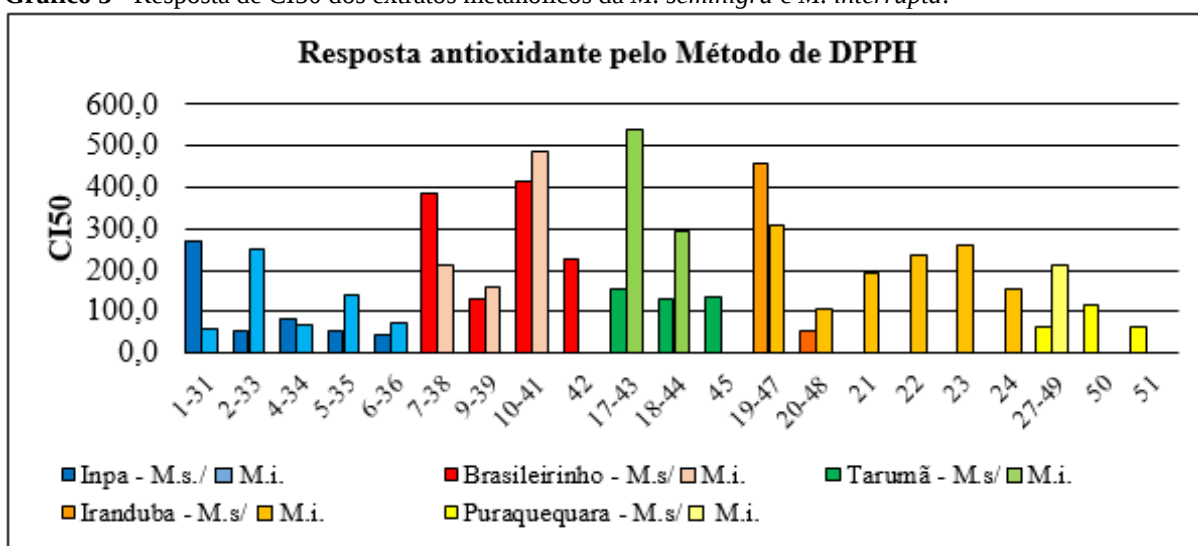
* Baixas respostas de CI50 e Fenóis Totais destacados na cor vermelha.

Já a espécie mais restritiva (*M. interrupta*) apresentou mais valores médios de concentração para CI50 abaixo de 70,0 µg/mL e de fenóis totais acima de 100,0 µg/mL sendo um forte indicativo de uma distribuição mais homogênea das substâncias fenólicas na geoprópolis da espécie dentre as regiões de coleta do material, o que pode ser confirmado pelos resultados obtidos pela quimiometria dos dados de ESI-MS, além dos perfis espectrais (RMN) e cromatográficos (LC-MS).

A região do Inpa mais uma vez se destacou apresentando valores de concentração inibitória para as amostras (33, 34, 35 e 36) de 52,71; 84,40; 51,73 e 42,97 $\mu\text{g/mL}$ e de fenóis totais 117,35; 104,71; 125,51 e 103,79 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. E com poucos representantes apresentando concentrações acima de CI50 acima de 150,0 $\mu\text{g/mL}$ e de fenóis totais abaixo de 65,0 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 2).

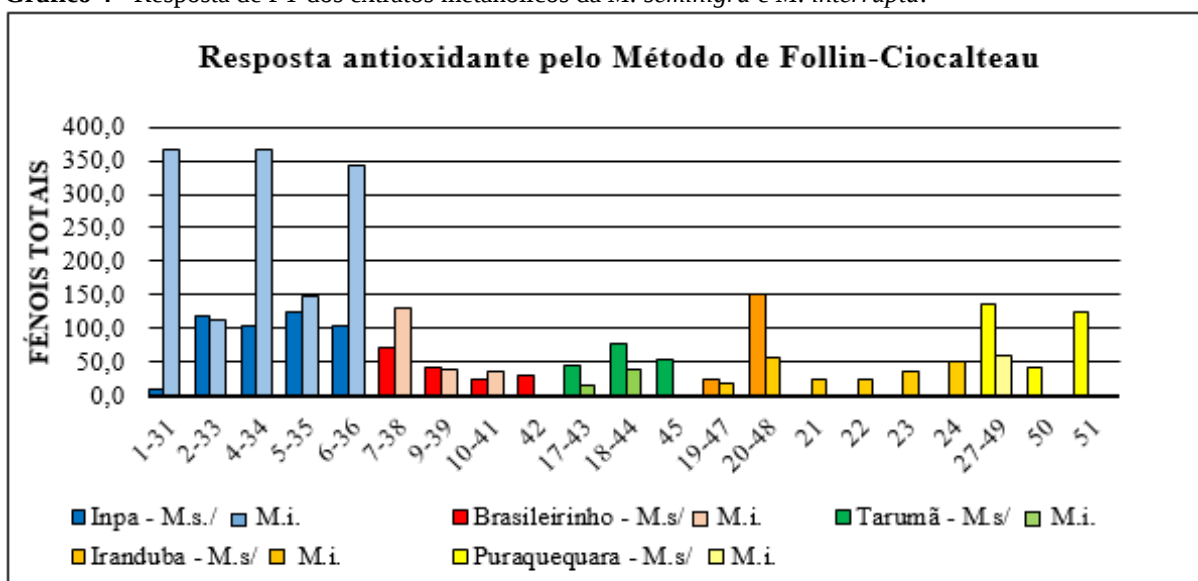
Os resultados pelos desvios padrões pouca variação entre as réplicas das amostras refletindo em uma maior precisão dos valores em torno da média o que gerou confiabilidade nos resultados obtidos.

Gráfico 3 - Resposta de CI50 dos extratos metanólicos da *M. seminigra* e *M. interrupta*.



Fonte Rebello, L.S.S., 2018.

Gráfico 4 - Resposta de FT dos extratos metanólicos da *M. seminigra* e *M. interrupta*.



Fonte Rebello, L.S.S., 2018.

Os extratos metanólicos da geoprópolis da região INPA para ambas as espécies apresentou melhor resposta antioxidante em relação as outras localidades, tanto pelo método de CI50 quanto por fenóis totais. O resultado corroborou para confirmar as informações encontradas por ESI-EM e RMN provando a rica constituição química desta própolis em substâncias de caráter fenólico como flavonoides e ácidos orgânicos. As outras regiões apresentaram valores interessantes, porém menores que a localidade do Inpa.

A região do Inpa por ser de preservação florística com várias espécies de plantas registradas, acredita-se que a proximidades de famílias ricas em compostos fenólicos como Fabaceae, Myrtaceae, Anacardiaceae tenham contribuído para a riqueza química. Além disso, a extração com MeOH auxiliou na remoção dos compostos polares que possuem um número substancial de hidroxilas livres em anéis aromáticos, além das duplas conjugadas muito presentes em substâncias flavonoídicas e nos derivados dos ácidos fenólicos favorecendo para que todas as regiões apresentassem resultados interessantes (PASCOAL *et al.*, 2014).

Os valores encontrados para CI50 e FT da região do Inpa para *M. seminigra* e *M. interrupta* revelaram ser superiores aos resultados encontrados nos extratos EtOH de geoprópolis de *Scaptotrigona postica* que apresentou valor máximo de CI50 de 210,55 µg/mL e FT de 1,76 mg GAE/g (ALBANO; CORR; OLIVEIRA, 2016). Outro estudo com pólen de *M. subnitida* Ducke revelou para as frações EtOH, Hex e AcOET valores de CI50 de 104,5; 212,0 e 41,9 µg/mL respectivamente para pólen amarelo e 106,1; 236,5 e 43,7 para pólen marrom, o que mostrou que os extratos MeOH de *M. seminigra* e *M. interrupta* foram mais ativos que as frações Hex e EtOH do estudo, e que as da região do Inpa mostraram proximidade quanto aos valores de AcOET (SILVA *et al.*, 2006).

O atual estudo revelou valores de inibição de CI50 na região do Inpa abaixo estudo realizado em (2013) para o extrato MeOH da espécie *M. seminigra* frente aos extratos de EtOH e MeOH. Já os da espécie *M. interrupta* revelaram estar próximos ao relatado na literatura (DA SILVA *et al.*, 2013) e os valores de FT na faixa de 30 a 150 µg/mL para o estudo realizado por (MUNIZ *et al.*, 2009) com as espécies.

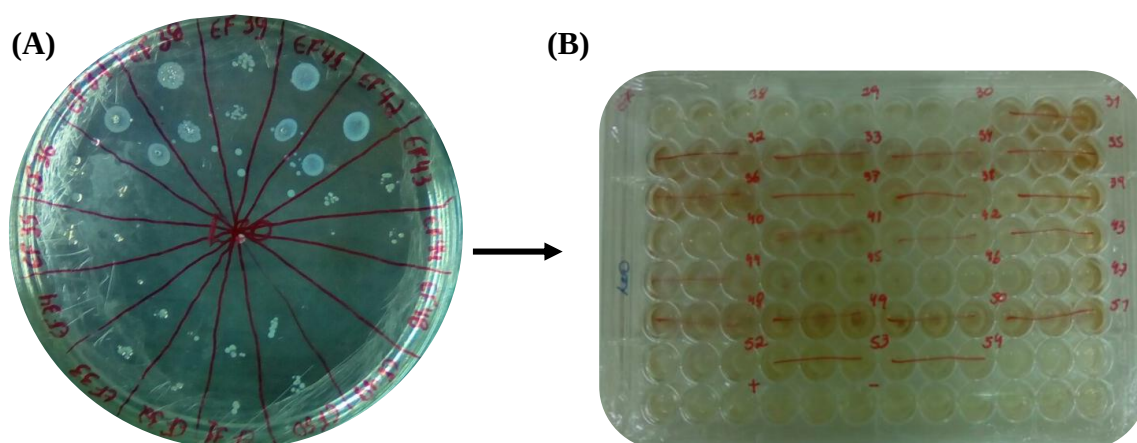
A quantidade de substâncias fenólicas progressivamente identificadas na geoprópolis, como a naringenina (DA SILVA *et.al.*, 2013), 6-O-p-coumaroil-D-galactopiranosose (DE SOUZA *et. al.*, 2013), ácido gálico (DUTRA *et al.*, 2014) está fortemente ligada a sua propriedade antioxidante. A evidência está nos relatos da literatura que provam a eficácia anti-radicalar na correlação com os teores de CI50 baixos e FT altos (BATISTA *et al.*, 2016; BONAMIGO *et al.*, 2017;).

5.8.2. Detecção de atividade Antimicrobiana

A complexa composição química da geoprópolis, possibilita a existência de substâncias que enalteçam a sua propriedade antimicrobiana paralisando ou até mesmo impedindo o crescimento e proliferação de bactérias e fungos. Relatos na literatura com geoprópolis constataam essa característica inibitória (LIBERIO *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2014; DE SOUZA *et al.*, 2013; DOS SANTOS *et al.*, 2017a;).

A atividade antimicrobiana foi verificada utilizando os micro-organismos dos grupos gram-positivo: *Staphylococcus aureus* causadora de infecções na pele, em órgãos (pulmões, rins e cérebro) devido ao uso materiais hospitalares contaminados (cateteres e tubos respiratórios) e por intoxicação alimentar (CORDEIRO *et al.*, 2015) e a *Enterococcus faecalis* causadora do envenenamento do sangue, septicemia, meningite e doenças do trato urinário (LINS *et al.*, 2013) e grupo gram-negativo: *Escherichia coli* agente de infecções do trato digestivo e urinário e *Pseudomonas aeruginosa* responsável por infecções no ouvido, sistema respiratório e sanguíneo. Além dos fungos *Candida albicans* e *Candida tropicalis* causados de infecções orais, no órgão genital feminino e candidíase, respectivamente (ALTERTHUM, 2015).

Os resultados qualitativos e quantitativos obtidos da atuação antimicrobiana nas 54 amostras das espécies *M. seminigra* e *M. interrupta* frente aos seis micro-organismos foram observados através das placas de Petri e os valores de concentração inibitória mínima (CIM) adquiridos em placas de Eliza 96 poços (Figura 75). Os valores foram organizados no quadro (5) na sequência:



Fonte – Rebello, L.S.S., 2017.

Figura 75 – Constatação da atividade antimicrobiana frente a bactéria *Enterococcus faecalis*. **(A)** Placa de Petri (inibição bacteriostática); **(B)** Placa de Eliza 96 poços (CIM).

Quadro 3. Amostras de *M. seminigra* e *M. interrupta*, extrato metanólico com atividade antimicrobiana.

Amostras (µg/mL)	Patógenos											
	<i>Candida</i>				<i>E. feacalis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>E. coli</i>	
	<i>albicans</i>		<i>tropicalis</i>									
	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+
6	NTA		NTA		NTA	1000	NTA		NTA		NTA	
7	NTA		NTA		NTA	500	1000	500	NTA		NTA	
31	NTA		NTA		NTA	1000	NTA	500	NTA		NTA	
32	NTA		NTA		NTA	1000	NTA	500	NTA		NTA	
33	NTA		NTA		NTA	1000	NTA	500	NTA		NTA	
34	NTA		NTA		1000	500	NTA	500	NTA		NTA	
35	NTA		NTA		NTA	1000	NTA		NTA		NTA	
36	NTA		NTA		NTA	1000	NTA		NTA		NTA	
39	NTA		NTA		NTA	1000	NTA		NTA		NTA	
43	NTA		NTA		NTA	1000	NTA	1000	NTA		NTA	
44	NTA		NTA		NTA	1000	NTA		NTA		NTA	
48	NTA		NTA		500	125	NTA	500	NTA		NTA	
49	NTA		NTA		500	250	1000	500	NTA		NTA	
50	NTA		NTA		NTA	1000	NTA		NTA		NTA	
51	NTA		NTA		1000	250	1000	500	NTA		NTA	
Fluconazol*	1000				-				-			
Tetraciclina*	-				-				1000			
Ampicilina*	-				1000				-			

++: Bactericida/Fungicida; + Bacteriostático/Fungistático; NTA: Não teve atividade. * Padrão de referência.

A investigação da atividade biológica dos 54 extratos metanólicos, revelou que apenas 15 amostras sendo duas (6 e 7) da espécie mais generalista (*M. seminigra*) e as outras treze da espécie mais restritiva (*M. interrupta*) apresentaram alguma propriedade de inibição frente as cepas.

Analisando os resultados foi possível constatar que as amostras 48 e 49 (Tarumã e Puraquequara) apresentaram atividade bactericida (morte) da bactéria *E. feacalis* na concentração de 500 µg/mL abaixo do padrão e as de número 34 e 51 (Inpa e Puraquequara) na concentração de 1000 µg/mL na mesma concentração da referência. As amostras 48, 49, 51, 34 e 7 impediram o desenvolvimento da cepa (bacteriostática) nas concentrações de 125, 250 e 500 µg/mL respectivamente. Todas as outras (6, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 39, 43, 50) revelaram inibição na concentração de 1000 µg/mL igual ao padrão.

Observando as amostras 7, 49 e 51, estas ainda apresentaram atividade bactericida e bacteriostática nas concentrações de 1000 e 500 µg/mL respectivamente, contra a bactéria *S. aureus*. Além destas, as amostras (31, 32, 33, 34, 43, 44, 48, 49 e 51) revelaram apenas atividade inibitória (bacteriostática) para o crescimento desta cepa.

As 15 amostras apresentaram atividade antimicrobiana eficaz contra as bactérias gram-positivas: *E. faecalis* e *S. aureus* e não tiveram êxito contra as gram-negativas: *E. coli* e *P. aeruginosa*. A explicação está em relação a estrutura celular, as bactérias gram-positivas não possuem membrana externa protetora, indicando uma parede simples. Já as gram-negativas possuem uma membrana externa rica em (lipoproteínas, fosfolipídios e polissacarídeos), isso lhes garante maior defesa contra as substâncias químicas de antibióticos, oriundas de extratos vegetais e de produtos provenientes de animais (ALTERTHUM, 2015;).

O estudo realizado com extrato etanólico de geoprópolis de *M. scutellaris*, apresentou atividade bactericida (morte) de *S. aureus* e *E. faecalis* nas concentrações de acima de 1600 µg/mL e bacteriostática (paralisação) de 6,25-12,25 e 800-1600 µg/mL respectivamente (DA CUNHA *et al.*, 2013b). Os valores encontrados com extrato MeOH, foram melhores para atividade bactericida, causando a morte dos patógenos nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL. A atividade bacteriostática foi melhor apenas para a bactéria *E. faecalis* conseguindo valores entre 125 a 1000 µg/mL.

O extrato etanólico de geoprópolis de *M. quadrifasciata* (Lepelletier) revelou atividade bactericida contra *E. faecalis* na concentração de 125 µg/mL sendo equivalente a encontrada na amostra 48 do Tarumã da *M. interrupta* (COSTA *et al.*, 2014).

O estudo com extrato hidroalcoólico da geoprópolis de *M. orbignyi* apresentou valores de inibição e morte para *S. aureus* de 6,13 µg/mL e 8,59 µg/mL. E para *E. faecalis* o valor de 8,17 µg/mL e de 10,9 µg/mL respectivamente. Estes valores foram muito altos frente aos encontrados no extratos MeOH, que variaram de 0,125 a 1,0 µg/mL tanto para inibição quanto morte dos patógenos (DOS SANTOS *et al.*, 2017b).

Os valores apresentados no quadro (5) mostraram que nenhuma dos extratos apresentou atividade contra as bactérias *E. coli* e *P. aeruginosa*, e nem para os fungos *C. albicans* e *C. Tropicalis*, na concentração máxima de 1000 µg/mL respeitada para o ensaio.

A dificuldade da atividade antimicrobiana contra os fungos se faz presente em outros estudos com geoprópolis do gênero *Melipona*, como evidenciado em pesquisas com o produto oriundo das espécies de abelhas *M. quadrifasciata* e *M. scutellaris* as quais não apresentaram inibição frente aos fungos (LIBERIO *et al.*, 2011; FARIA *et al.*, 2017;). A atividade antimicrobiana contra as bactérias gram-positivas está diretamente vinculada a alta presença de substâncias fenólicas como flavonoides e ácidos fenólicos e alguns poucos triterpenos e benzofenonas.

CONCLUSÃO

Os extratos metanólicos obtidos a partir das geoprópolis das duas espécies de abelhas, coletadas em cinco pontos dos arredores de Manaus analisados por ESI-EM no modo negativo revelaram seus perfis espectrais várias classes fenólicas: flavonoides glicosilados, benzofenonas, ácidos fenólicos e derivados. Os dados obtidos foram aplicados as técnicas não supervisionadas da Quimiometria (HCA e PCA) evidenciando a separação das amostras de *M. seminigra* e *M. interrupta* em três grupos responsáveis pela tipificação das amostras. A análise quimiométrica revelou que a distinção química das geoprópolis ocorreu por região na qual as abelhas estavam inseridas, onde o Brasileirinho e Iranduba estão mais propensos a possuírem benzofenonas preniladas, o Inpa com flavonoides (excelentes antioxidantes) e Puraquequara e Tarumã com ácidos fenólicos.

Os *fingerprints* obtidos dos extratos metanólicos por RMN foram explorados e também aplicados aos métodos quimiométricos revelando a formação de quatro grupos para as amostras de *M. seminigra* tipificando as regiões através dos *bucketings* que cada um pertencia, os deslocamentos químicos corroboraram com as classes de substâncias propostas por ESI-EM e LC-MS, sendo encontrados dois flavonoides, uma benzofenona e um ácido fenólico. Não foi possível aplicar os parâmetros de análise quimiométrica aos indivíduos amostrais da espécie *M. interrupta*, visto que seus *fingerprints* de RMN foram bem semelhantes quanto aos sinais de deslocamentos químicos para os flavonoides definidos nos espectros da espécie *M. seminigra* da região do Inpa.

A confirmação da presença das substâncias foi definida pela técnica de LC-MS que revelou a massa exata das mesmas, além da identificação de mais vinte e oito substâncias de quatro classes químicas. As análises por CG/EM revelaram que as fases hexânicas de ambas espécies eram ricas em ésteres metílicos e terpenos.

Os ensaios apresentaram valores de atividade antimicrobiana satisfatórios para duas amostras de *M. seminigra* e treze amostras de *M. interrupta* frente aos patógenos *S. aureus* e *E. faecalis* com valores de inibição variando entre 125, 250, 500 a 1000 µg/mL. Já os ensaios antioxidantes apresentaram resultados otimistas com valores de CI50 variando entre 40 a 280 µg/ mL para ambas as espécies.

O estudo contribuiu para o conhecimento científico a respeito dos constituintes químicos e das propriedades biológicas presentes na geoprópolis de ambas as espécies muito utilizadas na região Amazônica, enriquecendo o produto fornecido por essas abelhas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, B.V.B.; DUTRA, R.P.; BATISTA, M.C.A.; AZEVEDO, C.C.; NOGUEIRA, A.M.C.; COSTA, M.C.P.; RIBEIRA, M.N.S.. Polifenóis de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith coletado no Cerrado maranhense. **Revista de Ciências da Saúde**, v. 8, p. 18–24, 2006.
- ABREU, B.V.B. **Bioprospecção de pólen de *Melipona fasciculata* SMITH**. Tese (Doutorado - Biotecnologia). Universidade Federal do Maranhão, 2016.
- ABSY, M. L.; BEZERRA, E. B.; KERR, W. E. Plantas nectaríferas utilizadas por duas espécies de *Melipona* da Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 10, p. 271–281, 1980.
- ABSY, M. L.; KERR, E. E. Algumas plantas visitadas para obtenção de pólen por operárias de *Melipona seminigra merrillae* em Manaus. **Acta Amazonica**, v. 7, n. 3, p. 309–315, 1977.
- ALBANO, J. R.; CORREA, W. R.; OLIVEIRA, R. P. 8º JORNADA CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DO IFSULDEMINAS, 5º Simpósio de Pós-Graduação. 2016. Minas gerais. **Avaliação da atividade antioxidante da geoprópolis de *Scaptotrigona postica***. 2016, 4 p.
- ALBUQUERQUE, I. L.; ALVES, L. A.; LEMOS, T. L.G.; MONTE, F. J.Q.; BRAZ-FILHO, R.; Ácido canário (3,4-Seco derivado do lupano) em própolis do Ceará. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 828–831, 2007.
- ALMEIDA, J. A.S.; BARBOSA, L. M.S.; PAIS, A. A.C.C.; FORMOSINHO, S. J.. Improving hierarchical cluster analysis: A new method with outlier detection and automatic clustering. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 87, p. 208–217, 2007.
- ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6ª Edição ed. São Paulo: Atheneu, 2015.
- ALVES, J. O. **Espectrometria de massas com ionização eletrospray (ESI-MS) e métodos quimiométricos: caracterização de azeites de oliva (extra virgem e puro) e outros óleos vegetais e quantificação de óleos adulterantes em azeite de oliva extra virgem**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.
- ARAÚJO, M.; BUFALO, M.; CONTI, B.; JR, A.; TRUSHEVA, B.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J.. The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in northeast Brazil. **Journal of Molecular Pathophysiology**, v. 4, n. 1, p. 12, 2015.
- AYATOLLAHI, M. A.; GHANADIAN, M.; AFSHARYPUOR, S.; MESAİK, M. A.; ABDALLA, O. M.; SHAHLAEI, M.; FARZANDI, G.; MOSTAFAVI, H.. Cycloartanes from *Euphorbia aellenii* Rech. f. and their Antiproliferative Activity Abdul. **Iranian Journal Phamaceutical Research**, v. 10, n. April 2010, p. 7, 2011.

- AYDOS, G. L. P. **Sistemas Catalíticos Iônicos aplicados à Etenólise de Metil Ésteres de Óleos Vegetais**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2014
- BACELAR-LIMA, C. G.; FREIRE, D. DA C. B.; COLETTI-SILVA, A.; COSTA, K. B. DA; LARAY, J. P. B.; VILAS-BOAS, H. C.; CARVALHO-ZILSE, G. A.. Melitocoria de *Zygia racemosa* (Ducke) Barneby & Grimes por *Melipona seminigra merrillae* Cockerell, 1919 y *Melipona compressipes manaosensis* Schwarz, 1932 (Hymenoptera, Meliponina) en la Amazonía Central, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 3, p. 343–348, 2006.
- BAGGETT, S.; MAZZOLA, E. P.; KENNELLY, E. J. The Benzophenones: Isolation, Structural Elucidation and Biological Activities. **Stud. Nat. Prod. Chem.**, v. 32, n. i, p. 721–771, 2005.
- BANDEIRA, P. N.; DEUSDÊNIA, O.; PESSOA, L.; TERESA, M.; TREVISAN, S.; GOMES, L.. Metabólitos secundários de protium *Heptaphyllum march*. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1078–1080, 2002.
- BANKOVA, V. et. al. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Brazilian Propolis. **Z. Naturforsch**, p. 167–172, 1995.
- BANKOVA, V. et. al. Constituents of Brazilian geopropolis. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 53, n. 5–6, p. 402–406, 1998.
- BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1–2, p. 114–117, 2005.
- BANKOVA, V. “Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds”. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 1, p. 23–28, 2009.
- BANKOVA, V.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, p. 3–15, 2000.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113–123, 2006.
- BARTH, M. O.; BARROS, M. A.; FREITAS, F. O. Análise palinológica em amostras arqueológicas de geoprópolis do vale do rio Peruaçu, Januária, Minas Gerais, Brasil. **Arquivos do Museu de História Natural**. v. 19. p. 277-290. 2009.
- BARTH, O. M.; FREITAS, S.. Palynology as a tool to distinguish between propolis and geopropolis : Southern Brazilian samples. **Open Access Library Journal Palynology**, v. 2, p. 1–10, 2015.

BARTOLOMEU, A. R.; FRIÓN-HERRERA, Y.; DA SILVA, L. M.; RAMAGNOLI, G. G. DE OLIVEIRA, D. E.; SFORCIN, J. M.; Combinatorial effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith with anticancer drugs against human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, v. 81, p. 48–55, 2016.

BASTOS, D. H. M.; SALDANHA, L. A.; CATHARINO, R. R.; SAWAYA, A. C.H.F.; CUNHA, I. B.S.; CARVALHO, P. O.; EBERLIN, M. N.; Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 423–432, 2007.

BATISTA, M. C. A.; ABREU, B. V. de B.; DUTRA, R. P.; CUNHA, M. S.; AMARAL, F. M. M. do; TORRES, L. M. B.; RIBEIRO, M. N. de S.. Chemical composition and antioxidant activity of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* (Meliponinae) in flooded fields and cerrado areas of Maranhão State, northeastern Brazil. **Acta Amazonica**, v. 46, n. 3, p. 315–322, 2016.

BECKER, T. **Desenvolvimento de colmeias de abelhas *Melipona interrupta* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Meliponini) sob diferentes temperaturas em condições de laboratório**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2014.

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics: a practical guide**. John Wiley ed. New York: 1998.

BELTON, P. S.; COLQUHOUN, I. J.; KEMSLEY, E. K.; DELGADILLO, I.; ROMA, P.; DENNIS, M. J.; SHARMAN, M.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K.; SPRAUL, M.. Application of chemometrics to the ¹H NMR spectra of apple juices: Discrimination between apple varieties. **Food Chemistry**, v. 61, n. 1–2, p. 207– 213, 1998.

BEZZAN, L. C. F.; NASCIMENTO, E. **Estudo e caracterização dos constituintes de uma amostra de própolis da região do triângulo mineiro**, 2001. Disponível em: <<http://www.sbq.org.br/ranteriores/23/resumos/1393/index.htm>>. Acesso em: 23 jun. 2018.

BIANCO, E. M.; SANTOS, C. A. M. Substâncias isoladas das folhas de Bauhinia microstachya (Raddi) Macbr. (Caesalpiniaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 93–99, 2003.

BOFFO, E. F.; TAVARES, L. A.; TOBIAS, A. C. T.; FERREIRA, M. M. C.; FERREIRA, A. G.. Identification of components of Brazilian honey by ¹H NMR and classification of its botanical origin by chemometric methods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 49, n. 1, p. 55–63, 2012.

BONAMIGO, T. et. al. Antioxidant, Cytotoxic, and Toxic Activities of Propolis from Two Native Bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v., 2017.

BORRELLI, F.; MAFFIA, P.; PINTO, L.; IANARO, A.; RUSSO, A.; CAPASSO, F.; IALENTI, A.. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**, v. 73, p. S53–S63, 2002.

BRAND-WILLIAMS; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Food Sci. Technol.**, v. 28, p. 25–30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa no 3, de 19 de janeiro de 2001. **Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis**. Publicado no Diário Oficial da União de 23/01/2001, Seção 1. 18 p. 2001.

BUDZIKIEWICZ, H.; WILSON, J. M.; DJERASSI, C. Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. XXXII.' Pentacyclic Triterpenes. **Tetrahedron letters**, v. 2091, n. 4, p. 3688–3699, 1963.

BURDOCK, G. A. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 347–363, 1998.

CABRAL, B.; SIQUEIRA, E. M. S.; BITENCOURT, M. A.O.; LIMA, M. C. J. S.; LIMA, A. K.; ORTMANN, C. F.; CHAVES, V. C.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; ROCHA, H. A.O.; SCORTECCI, K. C.; REGINATTO, F. H.; GIORDANI, R. B.; ZUCOLOTTI, S. M.. Phytochemical study and anti-inflammatory and antioxidant potential of *Spondias mombin* leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, n. 3, p. 304– 311, 2016.

CÂMARA, J. Q.; SOUSA, A. H. DE; VASCONCELOS, W. E. DE; FREITAS, R. DA S.; MAIA, P. H. DA S.; ALMEIDA, J. C. DE; MARACAJÁ, P. B.. Estudos de meliponíneos, com ênfase a *Melipona subnitida* D. no município de Jandaíra, RN. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, n. 1, p. 20, 2004.

CAMARGO, J.M.F. & PEDRO, S. R. M. *Meliponini Lepeletier*, 1836. In J.S. Moure; D. Urban & G.A.R. Melo (Orgs.), **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region**. 2007.

CAMPOS, J. F. et. al. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 374–380, 2014.

CAMPOS, J. F. **Composição química e atividades biológicas da própolis das abelhas sem ferrão *Melipona orbignyi* e *Tetragonisca fiebrigi* (HYMENOPTERA, APIDAE)**. Tese (Doutorado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade). Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), 2016.

CAMPOS, J. F.; DOS SANTOS, C. M.; DOS SANTOS, H. F.; BALESTIERI, J. B. P.; ESTEVINHO, L. M.; SOUZA, K. DE P.; DOS SANTOS, E. L. 1º Simpósio Científico sobre recursos Naturais - SCR.N. 2017. **Atividade antimicrobiana do geoprópolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (HYMENOPTERA, APIDAE)**, Dourados-MS, 2017.

CARDOZO, D. V.; MOKOCHINSKI, J. B.; MACHADO, C. S.; SAWAYA, A. C. H. F.; CAETANO, I. K.; FELSNER, M. L.; TORRES, Y. R.. Variabilidade química de geoprópolis produzida pelas abelhas sem ferrão jataí, mandaçaia e manduri. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2457– 2474, 2015.

CARVALHO-ZILSE, G. A.; KERR, W. E. Utilização de marcadores microssatélites para estudos populacionais em *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini). **Magistra**, v. 18, n. 0102-5333, p. 213–220, 2006.

CARVALHO-ZILSE, G. A.; NUNES-SILVA, C. G. Threats to the stingless bees in the brazilian amazon: how to deal with scarce biological data and an increasing rate of destruction. In: FLORIO, R. M. (Ed.). Bees: Biology, Threats and Colonies. **Nova Science Publishers**, 2012. p. 147–168.

CARVALHO-ZILSE, G. P. et. al. Atividades de voo de operárias de *Melipona seminigra* (Hymenoptera: Apidae) em um sistema agroflorestral da Amazônia. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 1, p. 94–99, 2007.

CASIDA, L. E. Microbial metabolic activity in soil as measured by dehydrogenase determinations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 34, n. 6, p. 630–636, 1977.

CASTRO, M. L.; APARECIDO, J.; LUIZ, P.; DUARTE, S. Própolis do sudeste e nordeste do brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512–1516, 2007.

CASTRO, M.S.; KOEDAM, D.; CONTRERA, F.A.L.; VENTURIERI, G.C.; PARRA, G.N.; MALAGODI-BRAGA, K.S.; CAMPOS, L.O.; VIANA, M.; CORTOPASSI-LAURINO, M.; NOGUEIRA-NETO, P.; PERUQUETTI, R.C.

IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.. Stingless bee. In: HOLOS, E. (Ed.). Bees as pollinators in Brazil: assessing the status and suggesting best practices. Ribeirão Preto. p. 114.

- CHEN, C. N.; WU, C. L.; LIN, J. K. Propolin C from propolis induces apoptosis through activating caspases, Bid and cytochrome c release in human melanoma cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, p. 53–66, 2004.
- CHENG, H.; QIN, Z. H.; GUO, X. F.; HU, X. S.; WU, J. H.. Geographical origin identification of propolis using GC-MS and electronic nose combined with principal component analysis. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 813–822, 2013.
- CHOI, CHANG W.; KIM, SEI C.; HWANG, SOON S.; CHOI, BONG K.; AHN, HYE J.; LEE, MIN Y.; PARK, SANG H.; KIM, SOO K.. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 163, n. 6, p. 1161–1168, 2002.
- CHOI, Y. M.; NOH, D. O.; CHO, S. Y.; SUH, H. J.; KIM, K. M.; KIM, J. M.. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 7, p. 756–761, 2006.
- COELHO, G. R.; MENDONÇA, R. Z.; DE SENNAVILAR, K.; FIGUEIREDO, C. A.; BADARI, J. C.; TANIWAKI, N.; NAMİYAMA, G.; DE OLIVEIRA, M. I.; CURTI, S. P.; EVELYN SILVA, P.; NEGRI, G.. Antiviral action of hydromethanolic extract of geopropolis from *scaptotrigona postica* against antiherpes simplex virus (HSV-1). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p. 10, 2015.
- CONSONNI, R.; CAGLIANI, L. R. Ripening and Geographical characterization of Parmigiane Reggiano cheese by ¹H NMR spectroscopy. **Talanta**, v. 76, p. 200–205, 2008.
- CONSONNI, R.; CAGLIANI, L. R. Nuclear Magnetic Resonance and Chemometrics to Assess Geographical Origin and Quality of Traditional Food Products. In: **Advances in Food and Nutrition Research**. 1. ed. Milan, Italy: Elsevier Inc., 2010. v. 59p. 87–165.
- CONSTANTINO, M. G.; DA SILVA, G. V. J. A transformada de fourier em basic. **Química Nova**. v. 23, n. 3, p. 413–417, 2000.
- CORDEIRO, E.R.; FERNANDE, A.W.C.; PEREIRA, A.F.C.; DA COSTA, M.M.; NASCIMENTO, M.L.F.; DE OLIVEIRA, H.P.. Staphylococcus aureus biofilm formation on polypyrrole: an electrical overview. **Química Nova**, v. 38, n. 8, p. 1075–1079, 2015.
- CORREIA, F. C. DA S.; PERUQUETTI, R. C.; FERREIRA, M. G.; CARVALHO, Y. K. DE. Abundância, distribuição espacial de ninhos de abelhas sem ferrão (Apidae: Meliponini) e espécies vegetais utilizadas para nidificação em um fragmento de floresta secundária em Rio Branco, Acre. **EntomoBrasilis**, v. 9, n. 3, p. 163–168, 2016.

- CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: Explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 481–487, 2007.
- CORREIA, S. D. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de anacardiaceae. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1287–1300, 2006.
- COSTA PINTO, M. DE F. F. DA. **Caracterização de locos microssatélites em duas de abelhas espécies da região amazônica: *Melipona compressipes* e *Melipona seminigra* (Hymenoptera: Apidae: Meliponina)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, 2007.
- COSTA, R. T. DA; CORRÊA, W. R.; SALVADOR, M. J.; MELO, B. M. R.; PRADO, S. C. DO;. **6º Jornada Científica e Tecnológica e 3º Simpósio de Pós-Graduação do IFSULDEMINAS**. Avaliação antimicrobiana da geoprópolis de *Melipona quadrifasciata* (lepeletier), Posou Alegre-MG, 2014.
- COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoids: Potential therapeutic agents for the inflammatory process. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241–256, 2009.
- CUNHA, I. B. S.; SAWAYA, A. C. H. F.; CAETANO, F. M.; SHIMIZU, M. T.; MARCUCCI, M. C.; DREZZA, F. T.; POVIA, G. S.; CARVALHO, P. DE O. Factors that Influence the Yield and Composition of Brazilian Propolis Extracts. **Journal Brazilian Chemistry Society**. v. 15, n. 6, p. 964–970, 2004.
- DA CUNHA, M. G.; FRANCHIN, M.; GLAVÃO, L. C. C.; DE RUIZ, A. L. T. G.; DE CARVALHO, J. E.; OKEGAKI, M.; DE ALENCAR, S. M.; KOO, H.; ROSALEN, P. L.. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 23, 2013.
- DA CUNHA, M. G. **Geoprópolis de *Melipona scutellaris*: atividade antimicrobiana, antiproliferativa e ação sobre biofilme de *Streptococcus mutans* in vitro**. Dissertação (Mestrado em Odontologia) Universidade de Piracicaba. 2012.
- DA CUNHA, M. G.; FRANCHIN, M. PAULA-EDUARDO, L. F; DE FREIRES, I. A.; BEUTLER, J. A.; DE ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; TABCHOURY, C. P. M.; CUNHA, T. M.; ROSALEN, P. L.. Anti-inflammatory and anti-biofilm properties of entnemorosone from Brazilian geopropolis. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 27–35, 2016a.
- DA CUNHA, M. G.; ROSALEN, P. L.; FRANCHIN, M.; DE ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; RANSOM, T.; BEUTLER, J. A. Antiproliferative constituents of geopropolis from the bee *Melipona scutellaris*. **Planta Medica**, v. 82, n. 3, p. 190–194, 2016b.

- DA SILVA, E. C. C. **Estudo da composição química e atividade biológica da geoprópolis de *Melipona interrupta* e *Melipona seminigra***. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal do Amazonas, 2012.
- DA SILVA, E. C. C.; MUNIZ, M. P. NUNOMURA, DE C., S. R.; NUNOMURA, S. M.; CARVALHO-ZILSE, G. A.. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. **Química Nova**, v. 36, n. 5, p. 628–633, 2013a.
- DA SILVA, M. DO S. S.; CITÓ, A. M. DAS G. L.; CHAVES, M. H.; LOPES, J. A. D.. Triterpenóides tipo cicloartano de própolis de Teresina - PI. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 801–804, 2005.
- DA SILVA, I. A. A.; DA SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A.; QUEIROZ, N.; MAGNANI, M.; DE NOVAIS, J. S.; SOLEDADE, L. E. B.; LIMA, E. DE O.; DE SOUZA, A. L.; DE SOUZA, A. G.; Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. **Food Chemistry**. v. 141, n°4, p. 3552-3558, 2013b.
- DA SILVA, I. A. A.. **Perfil de fenólicos e propriedades bioativas dos méis de abelhas sem ferrão (*Melipona seminigra merrillae*) produzidos no Estado do Amazonas**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal da Paraíba, 2013c.
- DA SILVA, P. L.; DE LIMA, L. S.; CAETANO, Í. K.; TORRES, Y. R.. Comparative analysis of the volatile composition of honeys from Brazilian stingless bees by static headspace GC–MS. **Food Research International**, v. 102, n. August, p. 536–543, 2017.
- DA SILVA, F. C. Benzofenonas em Guttiferae e perfil fotoquímico dos extratos lipofílicos de *Clusia criuva*, *Clusia fluminenses* e *Hypericum carinatum*. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.
- DAMETTO, A. C. **Estudo químico e avaliação da atividade biológica de *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia involucrata* (Myrtaceae)**. Tese (Doutorado em Química). Universidade Estadual Paulista, 2014.
- DE ALMEIDA, S. C. X.; DE LEMOS, T. L. G.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. Volatile and non-volatile chemical constituents of *Cochlospermum vitifolium* (Willdenow) Sprengel. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 57–60, 2005.
- DE MENDONÇA, I. C. G.; PORTO, I. C. C. DE M.; DO NASCIMENTO, T. G.; DE SOUZA, N. S.; OLIVEIRA, J. M. DOS S.; ARRUDA, R. E. DOS S.; MOUSINHO, K. C.; DOS SANTOS, A. F.; BASÍLIO-JÚNIOR, I. D.; PAROLIA, A.; BARRETO, F. S. Brazilian red propolis: Phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2015.

DE PINHO, P. G.; PEREIRA, D. M.; GONÇALVES, R. F.; VALENTÃO, P.; FERNANDES, F.; TAVEIRA, M.; ANDRADE, P.; B. Headspace-Solid Phase MicroExtraction and Gas Chromatography Mass Spectrometry Applied to Determination of Volatiles in Natural Matrices. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 1–15, 2009.

DE SOUSA, D. N.; OLINDA, R. G.; MARTINS, C. G.; ABRANTES, M. R.; COELHO, W. A.. Prospecção fitoquímica, toxicidade in vitro e avaliação das atividades anti-radicalar e antibacteriana da geoprópolis da abelha jandaíra. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 9, n. 2, p. 134–140, 2015.

DE SOUZA, E. C. A. DE; DA SILVA, E. J.; CORDEIRO, H. C.; FILHO, N. M. L.; DA SILVA, F. M. A.; DOS REIS, D. L. S.; PORTO, C.; PILAU, E. J.; DA COSTA, L. A. M. A.; DE SOUZA, A. D.L. DE SOUZA.; MENEZES, C.; FLACH, A.;. Chemical compositions and antioxidant and antimicrobial activities of propolis produced by *Frieseomelitta longipes* and *Apis mellifera* bees. **Química Nova**, v. XY, n. 00, p. 1–8, 2018.

DE SOUZA, S. A. **Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante da geoprópolis da abelha sem ferrão Jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke)**. Tese (Mestrado em Química). Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2012.

DE SOUZA, S. A.; CAMARA, C. A.; DA SILVA, M. S.; EVA SILVA, T. M. S.. Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (jandaíra) bees. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v., 2013.

DE SOUZA, S. A. **Estudo químico, atividade antinociceptiva, antifúngica e potencial antioxidante da geoprópolis produzida pela jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke)**. Tese (Doutorado em Biociência Animal). Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2016.

DE OLIVEIRA, L. P. **Estudo químico comparativo de geoprópolis e pólen de abelha sem ferrão amazônica**. Trabalho de Conclusão de Curso (Química). Universidade Federal do Amazonas, 2016.

DETTMER, K.; ARONOV, P. A.; HAMMOCK, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 26, p. 51–78, 2007.

DIEGUEZ, C. M. T.; MONTANHEIRO, L. V.; CLETO, L. B.; BONFIM, M. J.C.; DARTORA, C.A.. Os fundamentos quânticos da Ressonância Magnética Nuclear. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 40, n. 1, p. 1–9, 2017.

DJERASSI, C.; BUDZIKIEWICZ, H.; WILSON, J. M.; mass spectrometry in structural and stereochemical problems1 unsaturated pentacyclic triterpenoids. **Tetrahedron Letter**, v. 361, n. 7, p. 263–270, 1962.

DOS SANTOS, C. M.; CAMPOS, J. F.; DOS SANTOS, H. F.; BALESTIERI, J. B. P.; SILVA, D. B.; SOUZA, DE P. K.; CAROLLO, C. A.; ESTEVINHO, L. M.; DOS SANTOS, E. L.. Chemical Composition and Pharmacological Effects of Geopropolis Produced by *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 13, 2017a.

DOS SANTOS, D. S.; RODRIGUES, F. M. M. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, p. 29, 2017.

DOS SANTOS, H. F.; CAMPOS, J. F.; DOS SANTOS, C. M.; BALESTIERI, J. B. P.; SILVA, D. B.; CAROLLO, C. A.; SOUZA, K. DE P.; ESTEVINHO, L. M. DOS SANTOS, E. L.. Chemical profile and antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic and antimicrobial activities of geopropolis from the stingless bee *Melipona orbignyi*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 5, 2017b.

DUAILIBE, S. A. DE C.; GONÇALVES, A. G.; AHID, F.J. M. Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* counts in vivo. **Journal of Applied Oral Science**, v. 15, p. 420–423, 2007.

DUTRA, R.P., NOGUEIRA, A.M.C., MARQUES, R.R.O., COSTA, M.C.P., RIBEIRO, M.N.S.. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. October, p. 557–562, 2008.

DUTRA, R. P. **Bioprospecção da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith como insumo na geração de produtos leishmanicidas**. Tese (Doutorado em Biotecnologia), 2012.

DUTRA, R.P.; ABREU, B.V.; CUNHA, M.S.; BATISTA, M.C.; TORRES, L.M.; NASCIMENTO, F.R.; RIBEIRO, M.N.; GUERRA, R.N.. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 12, p. 2549–2557, 2014.

FALCÃO, S.I.; VILAS-BOAS, M.; ESTEVINHO, L.M.; BARROS, C.; DOMINGUES, M.R.; CARDOSO, S.M.. Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: Usual and unusual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 396, n. 2, p. 887– 897, 2010.

FARIA, M. R. G. et. al. Avaliação da capacidade antifúngica de mel e geoprópolis de *Melipona quadrifasciata* sobre *candida albicans*. **Revista Eletrônica da Faculdade Evangélica de Ceres**, v. 6, n. 2317–1367, p. 1–15, 2017.

FERNANDES JR, A.; LEOMIL, L.; FERNANDES, A.A.H.; SFORCIN, J.M... The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* and brazilian stingless bees. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 7, n. 0104-7930, p. 173–182, 2001.

FERNÁNDEZ, M. C.; CUESTA-RUBIO, O.; PEREZ, A. R.; DE OCA PORTO, R. M.; HERNÁNDEZ, I. M. PICCINELLI, A. L.; RASTRELLI, L.. GC-MS determination of isoflavonoids in seven red cuban propolis samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 9927– 9932, 2008.

FERREIRA, A. DO A.; FERREIRA, E. A. E.; FERRAZ, V. P.; CARBALLO, L. F.; SANDE, D.; TAKAHASHI, J. A.. **XXIV Simpósio de plantas medicinais do Brasil - Análise Cromatográfica do Óleo Essencial do Geoprópolis de *Melipona quadrifasciata* (Mandaçaia)**, Belo Horizonte - MG, 2016.

FERREIRA, M. G.; ABSY, M. L. Pollen analysis of the post-emergence residue of *Melipona* (Melikerria) *interrupta* Latreille (Hymenoptera : Apidae) bred in the central Amazon region. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, n. 4, p. 709–713, 2013.

FERREIRA, M. G.; ABSY, M. L. Pollen analysis of honeys of *Melipona* (Michmelia) *seminigra* merrillae and *Melipona* (Melikerria) *interrupta* (Hymenoptera: Apidae) bred in Central Amazon, Brazil. **Grana**, v. 56, n. 6, p. 436–449, 2017.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria, Conceitos, Métodos e aplicações**. Única ed. Campinas, SP: p. 497, 2015.

FINGER, D. **Estudo da composição química do extrato oleoso de própolis da região de Prudentópolis**. Dissertação (Mestrado em Química), 2009.

FONTEQUE, J. H.; SAITO, M. E.; RIZELO, P. A.; TEIXEIRA, W. T.; KOHAYAGAWA, A.. Comparação entre duas metodologias para a realização do teste de redução do tetrazólio nitroazul (NBT) em caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 1970, p. 1–4, 2015.

FRANCHIN, M. **Avaliação do potencial anti-inflamatório e antinociceptivo da geoprópolis de *Melipona scutellaris***. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP, 2012.

FRANCHIN, M.; DA CUNHA, M. G.; DENNY, C.; NAPIMOGA, M. H.; CUNHA, M. C.; KOO, H.; DE ALENCAR, S. M.; OKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 b and TNF- a. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 709–715, 2012.

FRANCHIN, M.; DA CUNHA, M. G.; DENNY, C.; NAPIMOGA, M. H.; CUNHA, T. M.; BUENO-SILVA, B.; DE ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, L. P.. Bioactive Fraction of Geopropolis from *Melipona scutellaris* Decreases Neutrophils Migration in the Inflammatory Process: Involvement of Nitric Oxide Pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 9, 2013.

FRANCINI, I. B. **Variabilidade genética do loco csd em populações de cativeiro de *Melipona interrupta* manaosensis Schwarz, 1932 e *Melipona seminigra* merrillar Cockerell, 1919 (apidae, Meliponini) na Amazônia.** Tese (Mestrado em Química). Universidade Federal do Amazonas, 2008.

FREIRES, I. A.; DE ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 110, p. 267–279, 2016.

FREITAS, M. O.; PONTE, F. A.F.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R. Flavonoids and triterpenes from the nest of the stingless bee *Trigona spinipes*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 3, p. 532–535, 2008.

GAD, H. A.; EL-AHMADY, S. H.; ABOU-SHOER, M. I.; AL-AZIZI, M. M.. Application of chemometrics in authentication of herbal medicines: A review. **Phytochemical Analysis**, 2012.

GEKKER, G.; HU, S.; SPIVAK, M.; LOKENSGARD, J. R.; PETERSON, P. K.. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 158–163, 2005.

GEMPERLINE, P. **Practical guide to chemometrics**. 2° edition. Taylor & Francis Group, LCC, p. 520, 2006.

GRAIKOU, K.; POPOVA, M.; GORTZI, O.; BANKOVA, V.; CHINOUE, I.. Characterization and biological evaluation of selected Mediterranean propolis samples. Is it a new type?. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 261–267, 2016.

GUSTAFSON, K.R., BLUNT, J.W., MUNRO, M.H.G., FULLER, R.W., MC KEE, T.C., CARDELLINA II, J.H., MCMAHOM, J.B., GRAGG, G.M., BOYD, M.R.. The guttiferones, hiy-inhibitory benzophenones from *Symuhonia globulifera*, *Garcinia livinastonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. **Tetrahedron**, v. 48, n. 10093–10102, p. 10, 1992.

HARBONE, J. B. **Introduction to Ecological Biochemistry**. Fourth Edition. ed. UK: University of Reading, 1993.

HRNCIR, M.; JARAU, S.; BARTH, F. G. Stingless bees (Meliponini): senses and behavior. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, v. 202, n. 9–10, p. 597–601, 2016.

HUANG, S.; ZHANG, C.-P.; WANG, K.; LI, G. HU, F.-L.. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules*, v. 19, n. 12, p. 19610–19632, 2014.

HULEIHEL, M.; ISANU, V. Anti-herpes simplex vírus effect of an aqueous extract of própolis. *The Israel Medical Association Journal AMIJ*, v. 4, p. 923–927, 2002.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; SARAIVA, A. M.; JONG, D. DE. **Bees as pollinators in Brazil: assessing the status and suggesting best practices**. Ribeirão Preto: Holos Editora, p. 112, 2006.

IOSET, K. N.; NYBERG, N. T.; VAN DIERMEN, D.; MALNOE, P.; HOSTETTMANN, K.; SHIKOV, A. N.; JAROSZEWSKI, J. W.. Metabolic profiling of *Rhodiola rosea* rhizomes by ¹H NMR spectroscopy. *Phytochemical Analysis*, v. 22, p. 158–165, 2011.

ISHIDA, DE C. V. F.; NEGRI, G.; SALATINO, A. BANDEIRA, M. F. C. L. A new type of Brazilian propolis: Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. *Food Chemistry*, v. 125, n. 3, p. 966–972, 2011.

JIN, U. H.; CHUNG, T. W.; KANG, S. K.; SUH, S. J.; KIM, J. K.; CHUNG, K. H.; GU, Y. H.; SUZUKI, I.; KIM, C. H. Caffeic acid phenyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: Isolation and identification. *Clinica Chimica Acta*, v. 362, p. 57–64, 2005.

KALIL, J.; PESSINE, F.B.T.; FIDELIS, C.H.V.; MENEZES, F.H.; MENEZES, F.H.; PALMA, P.C.R.. Analysis of electrocautery generated smoke by chromatographic-mass spectrometry. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 43, p. 124–128, 2016.

KERR, W. E. Abelhas indígenas brasileiras (Meliponíneos) na polinização, na produção de mel, pólen geoprópolis e cera. *Informe Agropecuário*, v. 13, p. 15–22, 1987.

KERR, W. E. et. al. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. *Mensagem Doce*, v. 80, p. 45–60, 2001.

KERR, W. E. Extinção de Espécies: a grande crise biológica do momento e como afeta os meliponíneos. Ribeirão Preto, SP, 2002.

KOSMIDES, A. K.; KAMISOGLU, K.; CALVANO, S. E.; CORBETT, S. A.; ANDROULAKIS, I. P.. Metabolomic *Fingerprinting*: Challenges and Opportunities. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, v. 41, n. 3, p. 205–221, 2013.

KRISHNAN, P.; KRUGER, N. J.; RATCLIFFE, R. G. Metabolite *fingerprinting* and profiling in plants using NMR. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 410, p. 255– 265, 2005.

KUBO, I.; MASUOKA, N.; HA, T. J.; TSUJIMOTO, K.. Food Chemistry Antioxidant activity of anacardic acids. **Food Chemistry** v. 99, p. 555– 562, 2006.

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

KUMAR, N.; BANSAL, A.; SARMA, G. S.; RAWAL, R. K.. Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview. **Talanta**, v. 123, p. 186–199, 2014.

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

LEITE, T. C. C. (Melastomataceae), **Estudo químico e farmacológico biomonitorado de sete espécies do gênero Miconia**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

LEONARD, A. S.; DORNHAUS, A.; PAPA, D. R. Flowers help bees cope with uncertainty: signal detection and the function of floral complexity. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 1, p. 113–121, 2011.

LIBERIO, S. A.; PEREIRA, A. L. A.; DUTRA, R. P.; REIS, A. S.; JOSÉ, M.; ARAÚJO, A. M.; MATTAR, N. S.; SILVA, L. A.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F. GUERRA, R. N. M. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, p. 1– 10, 2011.

LIMA, M. V. D. DE. **Geopropolis produzida por diferentes espécies de abelhas : atividades antimicrobiana e antioxidante e determinação do teor de compostos fenólicos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Pará, 2015.

LINS, R. X.; DE OLIVEIRA, A. A.; HIRATA J. R.; WILSON, M. J.; LEWIS, M. A.O.; WILLIAMS, D. W. FIDEL, R. A. S.. Antimicrobial resistance and virulence traits of *Enterococcus faecalis* from primary endodontic infections. *Journal of Dentistry*, v. 41, n. 9, p. 779–786, 2013.

LOPES, B. G.-C. “Análise da composição de amostras de própolis vermelha do Brasil por espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* e cromatografia líquida de ultraeficiência (uhplc-esi-ms) e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana”. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 2014.

- LÓPEZ, B. G. C.; SCHMIDT, E. M.; EBERLIN, M. N.; SAWAYA, A. C.H.F.. Phytochemical markers of different types of red propolis. **Food Chemistry**, v. 146, n. 0308-8146, p. 174–180, 2014.
- LUSTOSA, S. R. et. al. Propolis: Atualizacoes sobre a quimica e a farmacologia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 447–454, 2008.
- MAGALHÃES, I. L. **Contribuição ao conhecimento Químico de plantas do Nordeste : Caesalpinia ferrea (Leguminosae)**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Ceará, 2014.
- MAGALHÃES, T. L.; VENTURIERI, G. C. **Aspectos econômicos da criação de abelhas indígenas sem ferrão (Apidae: Meliponini) no nordeste paraense**. 1º Edição, Versão eletrônica. Embrapa Amazônia Oriental. Belém, PA, 2010.
- MARASCHIN, M.; KUHNEN, S.; LEMOS, P. M.M. DE OLIVEIRA, S. K.; DA SILVA, D. A.; TOMAZZOLI, M. M.; SOUZA, A. C. V.; PINTO, R. M.; UARROTA, V. G.; UARROTA, I. C.; FERREIRA, A. G.; ZEGGIO, A. R. S.; VELEIRINHO, M. B. R.; DELGADINLLO, I.; VIEIRA, F. A.. **Metabolomics and Chemometrics as Tools for Chemo (bio) diversity Analysis**. In: DR. KURT, V. (Ed.). *Metabolomics and Chemometrics as Tools for Chemo(bio)diversity Analysis - Maize Landraces and Propolis*, **Chemometrics in Practical Applications**. InTech, p. 326, 2012.
- MARASCHIN, M.; SOMENSI-ZEGGIO, A.; OLIVEIRA, S. K.; KUHNEN, S.; TOMAZZOLI, M. M.; RAGUZZONI, J. C.; ZERI, A. C.M.; CARREIRA, R.; CORREIA, S.; COSTA, C.; ROCHA, M. Metabolic profiling and classification of propolis samples from southern brazil: An NMR-based platform coupled with machine learning. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 1, p. 13–23, 2016.
- MARASCHIN, M.; SOMENSI-ZEGGIO, A.; OLIVEIRA, S. K.; KUHNEN, S.; TOMAZZOLI, M. M.; RAGUZZONI, J. C.; ZERI, A. C.M.; CARREIRA, R.; CORREIA, S.; COSTA, C.; ROCHA, M. In Rodrigo Ribeiro Resende, *Biotechnologia Aplicada à Agro&Indústria*. In: BLUCHER, E. (Ed.). *Metabolômica e quimiometria como ferramentas para análises quimio(bio) diversas*. São Paulo - SP. p. 1-33, 2017.
- MARCUCCI, M. Propolis : chemical composition , biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, v. 26, p. 83–99, 1995.
- MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; CUSTÓDIO, R.; FERREIRA, M. M.; BANKOVA, V. S.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BRETZ, W.. Evaluation of phenolic compounds in Brazilian

propolis from different geographic regions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, p. 76-81, 2000.

MARQUES-SOUZA, A. C.; MIRANDA, I. P. de A.; Moura, C. de O.; RABELO, A.; Barbosa, E. M.. Características morfológicas e bioquímicas do pólen coletado por cinco espécies de Meliponíneos da Amazônia Central. **Acta Amazônica**, v. 32, n. 2, p. 271–229, 2002.

MÁRQUEZ HERNÁNDEZ, I.; CUESTA-RUBIO, O.; CAMPO FERNÁNDEZ, M.; ROSADO PÉREZ, A.; MONTES DE O. P. R.; PICCINELLI, A. L.; RASTRELLI, L. Studies on the constituents of yellow cuban propolis: GC-MS determination of triterpenoids and flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4725–4730, 2010.

MARSEGLIA, A.; ACQUOTTI, D.; CONSONNI, R.; CAGLIANI, L. R.; PALLA, G.; CALIGIANI, A.. HR MAS1H NMR and chemometrics as useful tool to assess the geographical origin of cocoa beans - Comparison with HR1H NMR. **Food Research International**, v. 85, p. 273–281, 2016.

MARTINS, V. C.; GODOY, R. L. DE O.; LAUDEAUZER, C. M.; GOUVÊA, A. C. M. S.; SANTIAGO, M. C. P. DE A.; BORGUINI, R. G.; PACHECO, S.; DO NASCIMENTO, L. DA S. M.; BRAGA, E. C. DE O.. Definição de parâmetros em espectrometria de massas sequencial para detecção de fraudes em café. *Semioses*, v. 9, n. 1, p. 7, 2016.

MCLAFFERTY, F. W. Mass Spectrometric Analysis. Molecular Rearrangements. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 1, p. 82–87, 1959.

MENEZES, H. Própolis : Uma Revisão Dos Recentes Estudos. **Arq. Inst. Biologia**, v. 72, n. 3, p. 405–411, 2005.

Moe, M. K.; Anderssen, T.; Strøm, M. B.; Jensen, E.. Total structure characterization of unsaturated acidic phospholipids provided by vicinal di-hydroxylation of fatty acid double bonds and negative electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 16, n. 1, p. 46–59, 2005.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (dpph) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, December 2003, p. 211–219, 2004.

MORAIS, S. M.; SILVA, K. A.; ARAUJO, H.; VIEIRA, I. G.P.; ALVES, D. R.; FONTENELLE, R. O.S.; SILVA, A. M. S.. Anacardic acid constituents from cashew nut shell liquid: NMR characterization and the effect of unsaturation on its biological activities. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2017.

- MOURE, J. S. **A Preliminary Supra-specific Classification of the Old World meliponine bees (Hym., Apoidea)**. Editora Vozes Ltda, 1961.
- MOURE, J. S.; URBAN, D.; MELO, G. A. R. Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region. **Sociedade Brasileira de Entomologia**, p. 1058, 2007.
- MUNIZ, M. P.; CARVALHO-ZILSE, G. A.; NUNOMURA, R. de C.; NUNOMURA, S. M.; **XVIII Jornada de Iniciação Científica PIBIC CNPq/FAPEAM/INPA** Avaliação dos compostos fenólicos e antioxidante dos extratos em metanol e própolis de abelhas sem ferrão amazônicas atividade etanol da própolis de abelhas sem ferrão amazônicas. Manaus-AM, 2009.
- MURAD, J. M.; CALVI, S. A.; SOARES, A. M.V.C.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J. M.. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 3, p. 331–334, 2002.
- NIBBERING, N.M.M. **The McLafferty rearrangement: A personal recollection**. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 15, n. 7, p. 956–958, 2004.
- NOGUEIRA-NETO, O. **A criação de abelhas indígenas sem ferrão**. 2º edição ed. São Paulo, SP: Chácaras e Quintas. 1970.
- NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão**. São Paulo - SP. Editora Nogueirapis, 1997.
- TORRES, R. N. S.; LOPES, J. A. D.; NETO, J. M. M.; CITÓ, A. M. DAS G. L.;. Constituintes voláteis de própolis piauiense. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 479–485, 2008.
- OLGA, P.; PETAR, K.; JELENA, M.; SRDJAN, R.. Screening method for detection of hydrocarbon-oxidizing bacteria in oilcontaminated water and soil specimens. **Journal of Microbiological Methods**, v. 74, n. 2–3, p. 110–113, 2008.
- OLIVEIRA, R. G.; JAIN, S.; LUNA, A. C.; FREITAS, S.. Screening for quality indicators and phenolic compounds of biotechnological interest in honey samples from six species of stingless bees (Hymenoptera: Apidae). **Food Science and Technology**, v. 37, n. 0101-2061, p. 552–557, 2017.
- OLIVEIRA, F. F.; RICHERS, B. T. T.; DA SILVA, J. R.; FARIAS, R. C.; MATOS, T. A. DE L.. **Guia Ilustrado das Abelhas " Sem-Ferrão " das Reservas Amanã e Mamirauá, Amazonas, Brasil (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. Tefé - AM. Editora: IDSMM, p. 270, 2013.
- OLIVEIRA, F. P. M.; ABSY, M. L.; MIRANDA, I. S. Recurso polínico coletado por abelhas sem ferrão (Apidae, Meliponinae) em um fragmento de floresta na região de Manaus - Amazonas. **Acta Amazônica**, v. 39, n. 3, p. 505–518, 2009.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do dpph•: Estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36–44, 2015.

OLIVEIRA, H. A.; OLIVEIRA, M. S.; ANDRADE, E. H. de A.; SOUZA- FILHO, A. P. S.; VENTURIERI, G. C.; GUILHON, G. M. S.; VASCONCELOS, M. A. M.. **5 ° Congresso Norte Nordeste de Química 3° Encontro Norte Nordeste de Ensino de Química 08 a 12 de abril de 2013 - Natal (Campus da UFRN)**. Principais substâncias voláteis identificadas em geoprópolis de *Melipona flavolineata* Friese, 1900 por CG-EM. Natal - RN, 2013b.

OLIVEIRA, P. S.; MÜLLER, R. C. S.; DANTAS, K. DAS G. F.; ALVES, C. N. DE VASCONCELOS, M. A. M.; VENTURIERI, G. C.. Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *M. fasciculata*, *M. flavolineata* (Apidae, Meliponini) e *Apis mellifera* (Apidae, Apini) da Amazônia. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1728–1732, 2012.

OZKUL, Y.; SILICI, S.; ERÖGLU, E. The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. **Phytomedicine**, v. 12, p. 742–747, 2004.

PARACAMPO, N. E. N. P. **Fingerprinting e análise multivariada aplicados ao estudo de identidade e qualidade de fitoproducto de ajuru (*Chrysobalanus icaco* Linnaeus)**. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Estadual de Campinas, 2017.

PASCOAL, A.; RODRIGUES, S.; TEIXEIRA, A.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L. M.. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. **Food and Chemical Toxicology**, v. 63, p. 233–239, 2014.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R.. **Introdução à Espectroscopia**. 4° ed. ed. São Paulo - SP, p. 745, 2010.

PEDRO, S. R. D. M. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 348–354, 2014.

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

Pereira, D. S.; Oliveira, M. S.; Pereira, N. S.; HOLANDA-NETO, J. P. Oliveira, M. S.; Pereira, N. S.; MARACAJÁ, P. B.; SOUZA FILHO, A. P. DA S.. Phytotoxic potential of the geopropolis extracts of the jandaira stingless bee (*Melipona subnitida*) in weeds. **Revista Caatinga**, v. 30, n. 4, p. 876–884, 2017.

PEREIRA, H. V. **Espectrometria de massas com ionização por paper spray combinada a métodos quimiométricos para identificação de falsificações em cervejas**. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.

PEREIRA SILVA, W.; LIMA, J. R.; PAZ, D. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. **Natureza on line**, v. 10, n. 3, p. 146–152, 2012.

PÉREZ, J. C. B.; BEST, C. R.; LLANES, F. Triterpenos pentacíclicos en propóleo. **Revista de la Sociedad Química del Perú**, v. 75, n. 4, p. 439–452, 2009.

PETER, C. M.; PICOLI, T.; ZANI, J. L.; LATOSINSKI, G. S.; DE LIMA, M.; VARGAS, G. D. HÜBNER, S. DE O.; FISCHER, G.. Atividade antiviral e virucida de extratos hidroalcoólicos de própolis marrom, verde e de abelhas Jataí (*Tetragonisca angustula*) frente ao herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 667–675, 2017.

PIANARO, A. Ecologia química de abelhas brasileiras: *Melipona rufiventris*, *Melipona scutellaris*, *Plebeia droryana*, *Nannotrigona testaceicornis*, *Tetragonisca angustula* e *Centris trigonoides*. p. 138, 2007.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1035– 1042, 2000.

PINO, J.; MARBOT, R.; DELGADO, A.; ZUMARRAGA, C.; SAURI, E. Volatile constituents of propolis from honey bees and stingless bees from Yucatan. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, n. 1, p. 53–56, 2006.

POPESCU, R.; COSTINEL, D.; DINCA, O. R.; MARINESCU, A.; STEFANESCU, I.; IONETE, R. E.. Discrimination of vegetable oils using NMR spectroscopy and chemometrics. **Food Control**, v. 48, p. 84–90, 2015.

POPOVA, M.; TRUSHEVA, B.; ANTONOVA, D.; CUTAJAR, S.; MIFSUD, D.; FARRUGIA, C.; TSVETKOVA, I.; NAJDENSKI, H.; BANKOVA, V.. The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1431–1435, 2011.

PRATA, V. M.; EMÍDIO, E. S.; DÓREA, H. S. Aplicação de métodos quimiométricos na caracterização de charutos utilizando extração por dispersão da matriz em fase sólida e análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, p. 53–58, 2011.

RODRIGUES, K. L. T.; SANSON, A. L.; QUARESMA, A. V.; GOMES, R. P.; DA SILVA, G. A.; AFONSO, R. J. C. F.. Chemometric approach to optimize the operational parameters of ESI for the determination of contaminants of emerging concern in aqueous matrices by LC-IT-TOF-HRMS. **Microchemical Journal**, v. 117, p. 242–249, 2014.

SANCHES, M. A.; PEREIRA, A. M. S.; SERRÃO, J. E. Pharmacological actions of extracts of propolis of stingless bees (Meliponini). **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 1, p. 50–57, 2017.

SAWAYA, A. C. H. F.; TOMAZELA, D. M.; CUNHA, I. B. S.; BANKOVA, V. S.; MARCUCCI, M. C.; CUSTODIO, A. R.; EBERLIN, M. N.. *Electrospray* ionization mass spectrometry *fingerprinting* of beer. **The Analyst**, v. 129, n. 6, p. 739–744, 2004a.

SAWAYA, A. C. H. F.; TOMAZELA, D. M.; CUNHA, I. B. S.; BANKOVA, V. S.; MARCUCCI, M. C.; CUSTODIO, A. R.; EBERLIN, M. N. Analysis of the composition of Brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their In vitro activity against gram-positive bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 1–2, p. 104–109, 2004b.

SAWAYA, A. C. H. F. **Análise da composição química de própolis brasileira por espectrometria de massas**. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 2006.

SAWAYA, A. C. H. F.; CALADO, J. C. P.; DOS SANTOS, L. C.; MARCUCCI, M. C.; AKATSU, I. P.; SOARES, A. E. E.; ABDELNUR, P. V.; CUNHA, I. B. S.; EBERLIN, M. N. E. Composition and antioxidant activity of propolis from three species of *Scaptotrigona* stingless bees. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 1; n 2; p. 37-42; 2009.

SAWAYA, A. C. H. F.; ABDELNUR, P. V.; EBERLIN, M. N.; KUMAZAWA, S.; AHN, M. R.; BANG, K. S.; NAGARAJA, N.; BANKOVA, V. S.; AFROUZAN, H.. *Fingerprinting* of propolis by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Talanta*, v. 81, n. 1–2, p. 100–108, 2010.

SAWAYA, A.C.H.F.; CUNHA, I. B. S. E. A. . *Electrospray* ionization mass spectrometry *fingerprinting* of propolis of native Brazilian stingless bees. **Apidologie**, v. 38, p. 93–103, 2007.

SEBRAE. Informações de mercado sobre mel e derivados da colméia: **relatório completo**. Brasília - DF, 2006.

SEO, E.K.; WANI, M. C.; WALL, M. E. NAVARROA, H.; MUKHERJEE, R.; FARNSWORTHE, N. R.; KINGHORNC, D. A. New bioactive aromatic compounds from *Vismia guianensis*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 1, p. 35-42, 2000.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253–260, 2011.

SHI, T.; ZHU, M. T.; CHEN, Y.; YAN, X. L.; CHEN, Q.; WU, X. L.; LIN, J.; XIE, M.. 1H NMR combined with chemometrics for the rapid detection of adulteration in camellia oils. **Food Chemistry**, v. 242, p. 308–315, 2018.

SILVA, M. S.S.; DE LIMA, S. G.; OLIVEIRA, E. H.; LOPES, J. A.D.; CHAVES, M. H.; REIS, F. A.M.; CITÓ, A. M.G.L.. Anacardic acid derivatives from brazilian propolis and their antibacterial activity. **Eclética Química**, v. 33, n. 3, p. 53–58, 2008.

SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A.; LINS, A. C. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DA SILVA, E. M. S.; FREITAS, B. M.; DOS SANTOS, F. A. R.. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6–7, p. 507–511, 2006.

SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A.; LINS, A. C. S.; AGRA, M. F.; SILVA, E. M. S.; REIS, I. T.; FREITAS, B. M.. Chemical composition, botanical evaluation and screening of radical scavenging activity of collected pollen by the stingless bees *Melipona rufiventris* (Uruçu-amarela). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 2, p. 173–178, 2009.

SILVA, T. M. S.; DOS SANTOS, F. P.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; DA SILVA, E. M. S.; DA SILVA, G. S.; DE NOVAIS, J. S.; DOS SANTOS, F. A. R.; CAMARA, C. A.. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n. 1, p. 10–18, 2013.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro, RJ: p. 550, 2007.

SOARES, D. B. DA S. **Estudo fitoquímico das folhas de *Psychotria viridis* (Rubiaceae) e avaliação da atividade biológica de extratos e constituintes**. Dissertação (Mestrado em Química), 2015.

SON, H. S.; HWANG, G. S.; KIM, K. M.; KIM, E. Y.; VAN D. B., F.; PARK, W. M.; LEE, C. H.; HONG, Y. S.. ¹H NMR-based metabolomic approach for understanding the fermentation behaviors of wine yeast strains. **Analytical Chemical**, v. 81, p. 1137–1145, 2009.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R. E.; VIEIRA, G. M.; AYRES, M. C. C.; DA COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H.. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

SOUSA, S. A. A.; MAGALHÃES, A.; FERREIRA, M. M. C. Optimized *bucketing* for NMR spectra: Three case studies. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 122, p. 93–102, 2013.

- SOUZA, R. C. S.; YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; OLIVEIRA, F. P. M.. Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região Amazônica. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 333–336, 2004.
- SUAREZ, P.; MENEGHETTI, S. Transformation of triglycerides into fuels, polymers and chemicals: some applications of catalysis in oleochemistry. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 667–676, 2007.
- SUCUPIRA, N. R.; ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M.A.; DE BRITO, E. S.; WURLITZER, N. J.; SOUSA, P. H.M.. NMR spectroscopy and chemometrics to evaluate different processing of coconut water. **Food Chemistry**, v. 216, p. 217–224, 2017.
- TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GARCÍA-VIGUERA, C.; VIT-OLIVIER, P.; FERRERES, F.; TOMÁS-LORENTE, F.. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 191–196, 1993.
- TORRES-GONZÁLEZ, A.; LÓPEZ-RIVERA, P.; DUARTE-LISCI, G.; LÓPEZ-RAMÍREZ, Á.; CORREA-BENÍTEZ, A.; RIVERO-CRUZ, J. F.. Analysis of volatile components from *Melipona beecheii* geopropolis from Southeast Mexico by headspace solid-phase microextraction. **Natural Product Research**, v. 30, n. 2, p. 237–240, 2015.
- VARMUZA, K. Chemometrics in Mass-Spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes**, v. 118, n. August 1991, p. 811–823, 1992.
- VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C.. Antibacterial *ent*-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. **Fitoterapia**, v. 71, n. 6, p. 693–696, 2000a.
- VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; MARCUCCI, M. C.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A.. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian Meliponinae. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 55, n. 9–10, p. 785–789, 2000b.
- VELIOGLU, Y.S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B.D.. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain product. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4113–4117, 1998.
- VIANA, T.; GÓES, C. A.; SANTOS, C. Meliponicultura em comunidades tradicionais do Amazonas Beekeeping in traditional communities of the Amazon. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 7, n. 3, p. 106–115, 2012.

VIEIRA, T. D. S. **Estudos visando à síntese de novos derivados do LCC com potencial atividade no tratamento da doença de Alzheimer**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade de Brasília. Brasília – DF, 2007.

VIERA, V. B.; PIOVESAN, N.; STIEBE, A. L. XXV **Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Extração assistida por ultrassom e determinação do teor de fenólicos totais da Própolis. Gramado - RS, 2016.

VILLARREAL, L. P. S. **Composição química e atividade antioxidante do pólen coletado pela abelha sem ferrão: *Melipona seminigra* Cockerell, 1919**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Amazonas, 2010.

WERNECK, H. A.; FARIA-MUCCI, G. M.. A Meliponicultura como prática educacional: abelhas sem ferrão ensinam crianças e adultos sobre conservação e uso sustentável dos recursos naturais. **Natureza on line**, v. Ano XII, n. 3, p. 146–152, 2012.

VILLAS-BÔAS, S. G.; MAS, S.; ÅKESSON, M.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J.. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, p. 613–646, 2005.

VISENTAINER, J. V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. **Química Nova**, v. 35, n. 2, p. 274–279, 2012.

VU, T. N.; LAUKENS, K. Getting your peaks in line: A review of alignment methods for NMR spectral data. **Metabolites**, v. 3, n. 2, p. 259–276, 2013.

VYNOGRAD, N.; VYNOGRAD, I.; SOSNOWSKI, Z. A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). **Phytomedicine**, v. 7, p. 1–6, 2000.

WAGH, V. D. Propolis: A wonder bees product and its pharmacological potentials. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2013, p. 11, 2013.

WARD, J. L.; BAKER, J. M.; BEALE, M. H. Recent applications of NMR spectroscopy in plant metabolomics. **FEBS Journal**, v. 274, n. 5, p. 1126–1131, 2007.

WEAVER, N.; JOHNSTON, N. C.; BENJAMIN, R.; LAW, J. H. Novel Fatty Acids From the Royal Jelly of Honeybees (*Apis mellifera*, L.). **Lipids**, v. 3, n. 6, p. 535–538, 1986.

WILLIAM, P. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Serial Review : Flavonoids and Isoflavones (Phytoestrogens): Absorption, Metabolism, and Bioactivity. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules?. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 36, n° 7, p. 838–849, 2004.

WILSON, I. D. Hyphenation and hypernation The practice and prospects of multiple hyphenation. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 325–356, 2003.

WOISKY, R.G., SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, p. 99–105, 1998.

WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal component analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 2, p. 37–52, 1987.

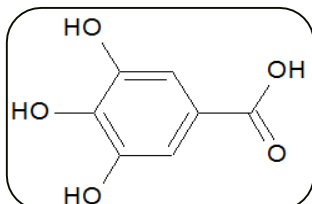
YI, L.; DONG, N.; YUN, Y.; DENG, B.; REN, D.; LIU, S.; LIANG, Y.. Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 914, p. 17–34, 2016.

APÊNDICE

Principais estruturas das substâncias identificadas utilizando as técnicas de RMN, EM e LC-MS

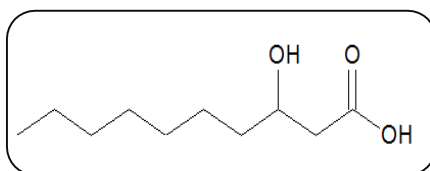
Ácidos Fenólicos

(1)



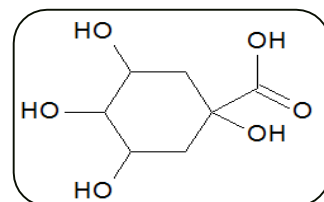
ácido gálico (m/z : 169)

(2)



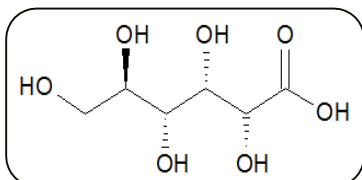
ácido 3-hidroxidecanoico (m/z : 187)

(3)



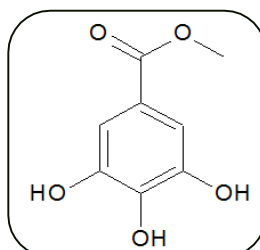
ácido quínico (m/z : 191)

(4)



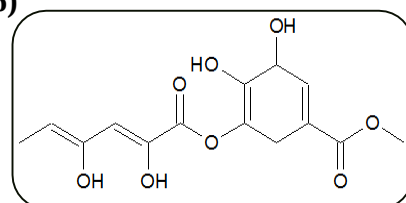
ácido glucônico (m/z : 195)

(5)



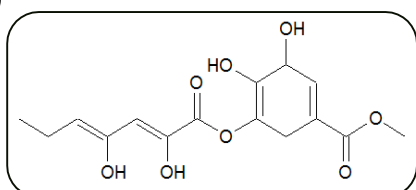
galato de metila (m/z : 183)

(6)



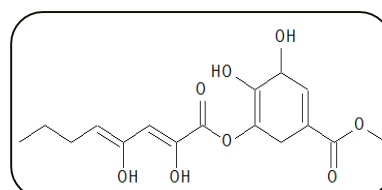
derivado do galato de metila
(m/z : 311)

(7)



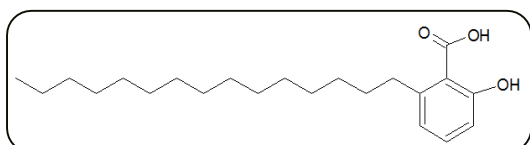
derivado do galato de metila (m/z : 325)

(8)



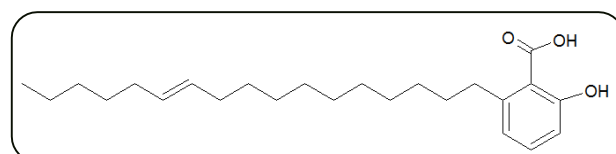
derivado do galato de metila (m/z : 339)

(9)



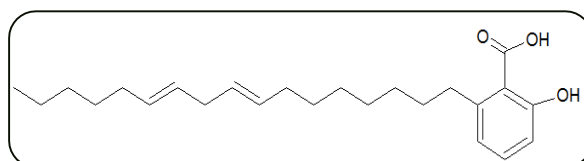
ácido anacárdico (15:0) (m/z : 347, 2548)

(10)



ácido anacárdico (17:1) (m/z : 373, 2741)

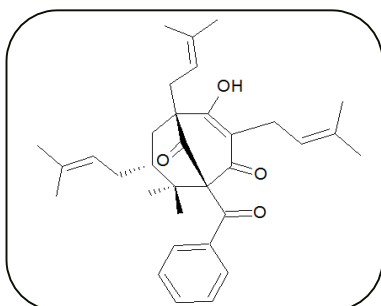
(11)



ácido anacárdico (17:2) (m/z : 371, 2741)

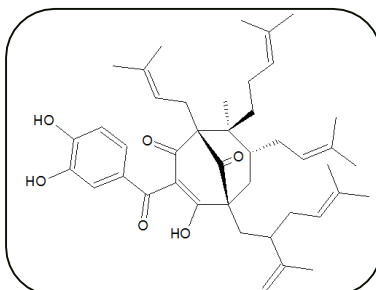
Benzofenonas

(1)



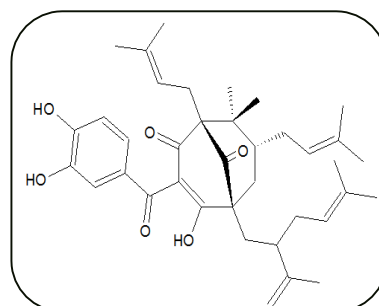
7 – epi –nemorosone
(*m/z*: 501,3010)

(2)



guttiferone C (*m/z*: 699,4333)

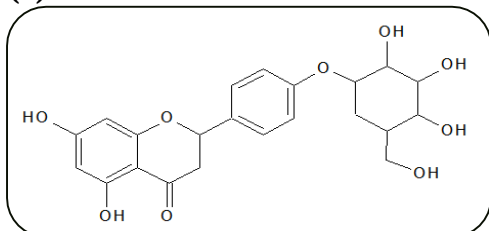
(3)



xantochymol
(*m/z*: 601,3570)

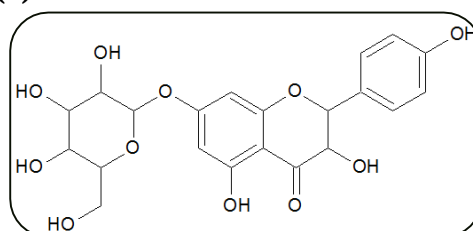
Flavonoides

(1)



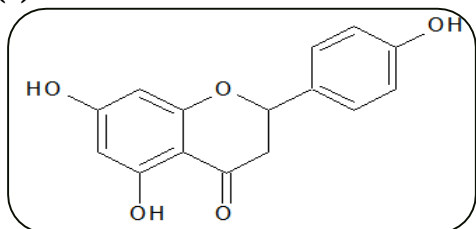
naringenina glicosilada (*m/z*: 433)

(2)



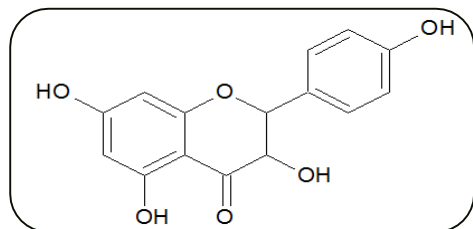
aromadendrina glicosilada (*m/z*: 449)

(3)



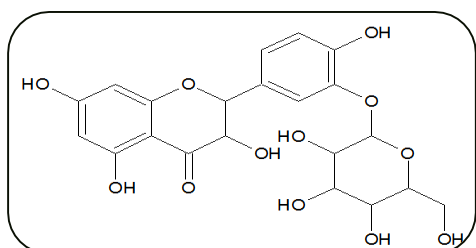
naringenina glicosilada (*m/z*: 271,0664)

(4)



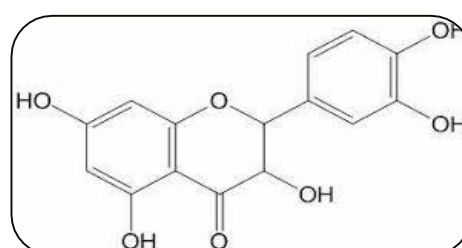
aromadendrina glicosilada (*m/z*: 287,0613)

(5)



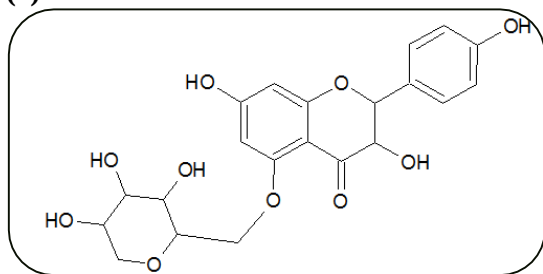
taxofolina – 3' – glucosídeo (*m/z*: 465,1026)

(6)



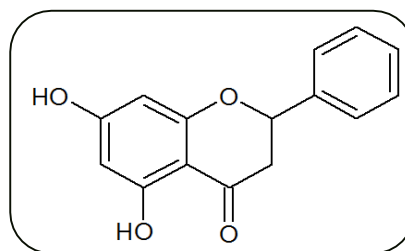
taxofolina (*m/z*: 303,2629)

(7)



aromadendrina – 7 – O – rhaminosideo
(*m/z*: 433,1121)

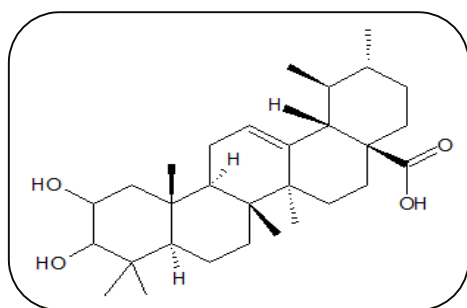
(8)



pinocembrina (*m/z*: 255)

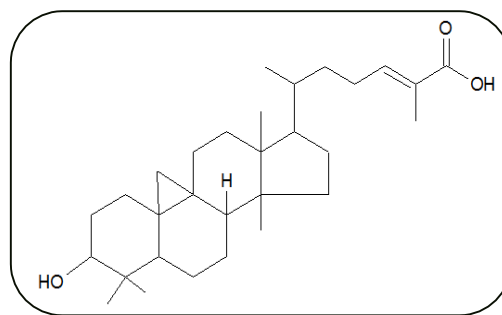
Terpenos

(1)



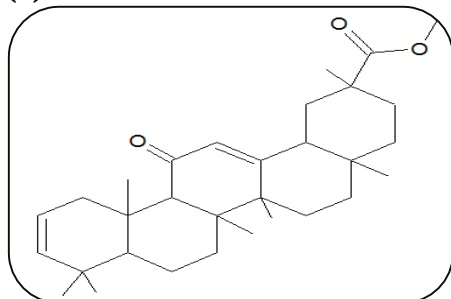
ácido corsólico (*m/z*: 471,3466)

(2)



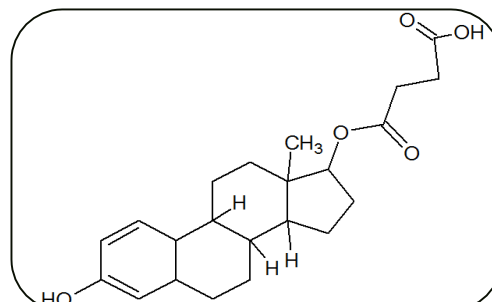
ácido mangiferólico (*m/z*: 455,3543)

(3)



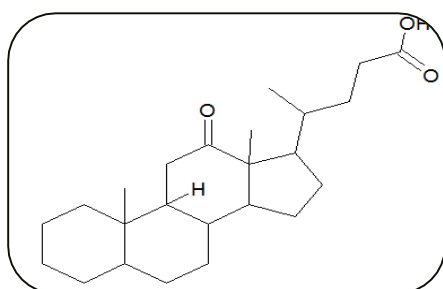
metil-11-oxooleana-2,12-dien-29-oato
(*m/z*: 465,3362)

(4)



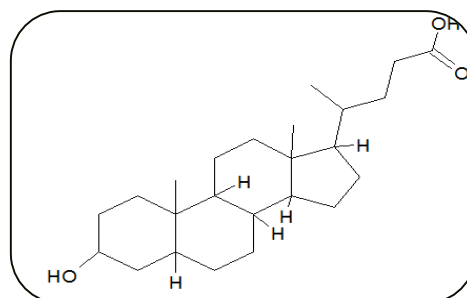
17-beta-estradiol hemisuccinato
(*m/z*: 371,1864)

(5)



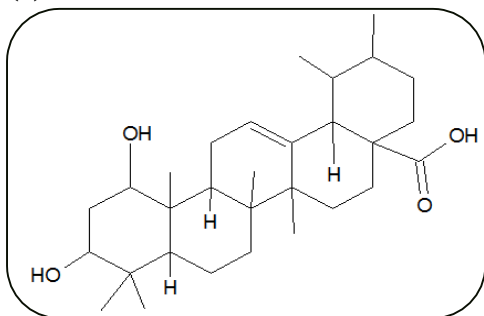
ácido (5β)-12-oxocholan-24-oico
(*m/z*: 373,2737)

(6)



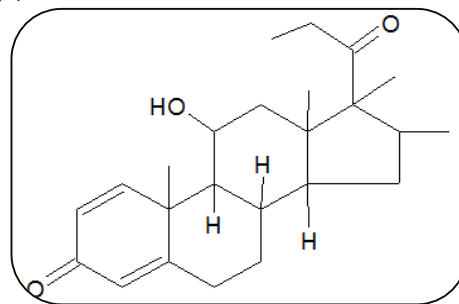
Ácido 3β-hidroxi-5α-cholan-24-oico
(*m/z*: 375,2890)

(7)



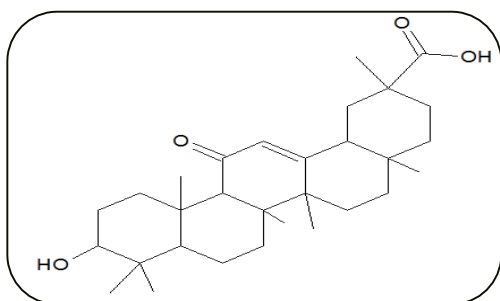
ácido canérico
(*m/z*: 471,3450)

(8)



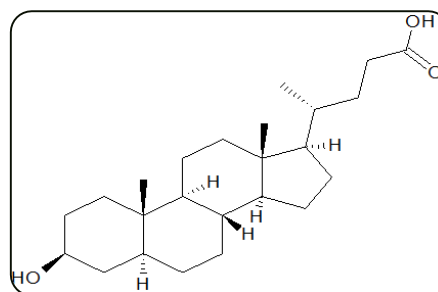
rimexolona
(*m/z*: 369,2426)

(9)



ácido glicirrhetínico (*m/z*: 469,3302)

(10)



ácido isolitocólico (*m/z*: 375, 2899)