

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ANÁLISE DOS MÉIS DE ABELHAS DO
GÊNERO *Melipona* (ABELHAS SEM FERRÃO) ATRAVÉS
DE *LC-SPE/NMR*, *LC-BPSU/NMR* E RMN ALIADA À
QUIMIOMETRIA**

Darlene da Silva Pinto*

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Antonio Gilberto Ferreira

* bolsista CNPq

**São Carlos - SP
2015**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

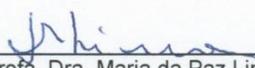
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

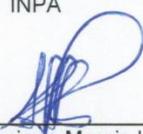
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Darlene da Silva Pinto, realizada em 07/05/2015:



Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira
UFSCar



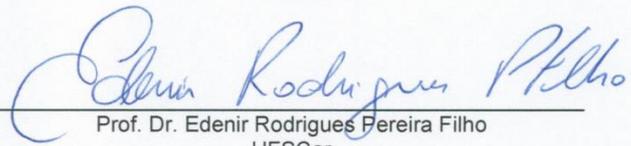
Prof. Dra. Maria da Paz Lima
INPA



Prof. Dr. Luciano Morais Lião
UFG



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho
UFSCar



Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho
UFSCar

*Dedico este trabalho
aos meus pais, Elias e Deucinda,
e ao meu pequeno Luiz Henrique.*

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”

Cora Coralina

“Não tenha medo dos dias mais tristes da sua vida, aproveite a oportunidade para escrever os capítulos mais importantes da sua história...”

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e a graça do seu amor concedido diariamente, dando-me forças para chegar até aqui.

Ao Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira, pela orientação, incentivo e ensinamentos transmitidos.

À Dra. Gislene Carvalho-Zilse pelo trabalho em colaboração.

A todos os laboratórios de pesquisa do Departamento de Química, CLAE, Síntese e PN, pela ajuda nos experimentos de bancada.

Aos técnicos do laboratório de RMN, Luciana e Paulo, por todo apoio e ajuda prestados.

Aos meus queridos e amados pais, Elias e Deucinda, por toda dedicação, incentivo e principalmente por todo tempo dispensado em ajudar nesses últimos anos, meus sinceros agradecimentos. Também aos meus irmãos, Débora, Eliezer e Karol por todo apoio, mesmo distante, e também por compreender a ausência dos nossos pais em vários momentos.

À minha nova família, Luizinho, que apesar de pouco compreender foi meu suporte e minha força em todo momento.

Aos queridos amigos, Lyege, Giovana, Sérgio, Marcela, Tatielih e Thayana, por todo apoio, amizade sincera e ajuda em todos os momentos, acreditem a presença e companhia de vocês foram primordiais.

Aos amigos de laboratório Claudimar, Clayton, Elenilson, Lorena, Nazish, Sheraz e Tatiana, pelos ensinamentos, discussões e por todos os momentos de alegria e de boa convivência.

Aos professores da banca pelas contribuições.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES, FAPESP e INCT-CBIP.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ACN-d ₃	Acetonitrila deuterada
AQ	Tempo de aquisição
ATMA	Automatic Tuning and MAtching
FID	Decaimento livre de indução
F1	Frequência no domínio de tempo t1
F2	Frequência no domínio de tempo t2
G _z	Gradiente de campo magnético na direção z
gCOSY	COrrrelation SpectroscopY
gHBMC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
gHSQC	Heteronuclear Single-Quantum Coherence
GP	General Phase
HD	High Density
LC	Cromatografia Líquida
LC-NMR	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Ressonância Magnética Nuclear
BPSU-36	Bruker Parking Sampling Unit
LB	Lorentzian-Broadening
MeOD	Metanol-d4
NS	N.º de varreduras
rf	Radiofrequência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN 1D	Ressonância Magnética Nuclear unidimensional
RMN 2D	Ressonância Magnética Nuclear bidimensional
SPE	Extração em Fase Sólida
SH	Strong Hydrophobic
SW	Janela espectral
TD	N.º de pontos do domínio de tempo
TMS	TetraMetilSilano
tr	Tempo de retenção
t ₁	Interferograma
t ₂	Tempo de decaimento livre por indução
TFA	Ácido TriFluoracético

UV-DAD Detector ultravioleta com arranjo de diodos
HLB Hydrophilic-Lipophilic Balance

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Substâncias identificadas em méis de abelhas sem ferrão	6
Tabela 3.1	Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de RMN de ^1H e ^2H	27
Tabela 3.2	Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos 1D de hidrogênio	29
Tabela 3.3	Massas do material de partida e das frações obtidas da partição líquido-líquido	31
Tabela 3.4	Fases estacionárias dos cartuchos de SPE - Hysphere TM	34
Tabela 4.1	Amostras originais coletadas no INPA e comerciais adquiridas na região	39
Tabela 4.2	Relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ calculada para metila ($^2\text{H}/^1\text{H}$) _l dos etanóis obtidos da fermentação dos méis.	44
Tabela 4.3	Valores típicos relatados na literatura para relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$	45
Tabela 4.4	Dados espectroscópicos para os açúcares encontrados nos méis de abelha se ferrão.	49
Tabela 4.5	Dados espectroscópicos para os aminoácidos encontrados nos méis de abelha se ferrão.	51
Tabela 4.6	Dados espectroscópicos para o composto 5-hidróximetilfurfural.	52
Tabela 4.7	Estruturas das substâncias identificadas na fase CH_2Cl_2 de MS-BRD.	74
Tabela 4.8	Dados espectroscópicos para o composto presente em MS-BRD2 (álcool fenético).	75
Tabela 4.9	Dados espectroscópicos para o composto presente em MS-BRD5 (ácido abscísico).	79
Tabela 4.10	Dados espectroscópicos para o composto majoritário presente em MS-BRD7 (4H-1-benzopiran-4-ona).	82
Tabela 4.11	Dados espectroscópicos para o composto presente em MS-BRD9 (ácido faseico).	86
Tabela 4.12	Dados espectroscópicos para o composto presente em MS-BRD10 (2,3-dihidro-1H-quinolin-4-ona).	89

Tabela 4.13	Estruturas das substâncias identificadas na fase acetato de etila de <i>Melipona seminigra</i> (MS-BRA).	94
Tabela 4.14	Dados espectroscópicos para o composto presente em MI-05D1 (xanthoceron A).	97
Tabela 4.15	Dados espectroscópicos para o composto majoritário presente em MI-05D5 (dehidrovomifoliol).	101
Tabela 4.16	Dados espectroscópicos para o composto minoritário presente em MI-05D5 (ácido verátrico).	104
Tabela 4.17	Estruturas das substâncias identificadas na fração MI-BRa através do SPE (GP).	114
Tabela 4.18	Dados espectroscópicos para o composto presente em MI-BRa2 (α -D-galactopiranosídeo).	116
Tabela 4.19	Dados espectroscópicos para o composto presente em MI-BRa3 (Tirosol).	116
Tabela 4.20	Dados espectroscópicos para o composto presente em MI-BRa4 (ácido <i>p</i> -cumárico).	117
Tabela 4.21	Dados espectroscópicos para o composto presente em MI-BRa10 (4- (3- hidróxi- 1- butenilideno)- 3, 5, 5- trimetil ciclohex-2 -en- 1- ona).	117
Tabela 4.22	Dados espectroscópicos para o composto presente em MI-BRa11 (4- (3- Oxobut- 1- enilideno)- 3, 5, 5- trimetil ciclohex-2-en-1-ona).	118
Tabela 4.23	Dados espectroscópicos para o composto presente em MI-BRa12 (2-fenil-etil- α -D-glicosídeo).	119
Tabela 4.24	Dados espectroscópicos para o composto presente em MI-BRa16 (ácido 2-hidróxi-benzenopropanóico).	119
Tabela 4.25	Dados espectroscópicos para o composto presente em MI-BRa16 (1-fenil-2,3-butanodiol).	120

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Entrada do ninho da espécie <i>M. seminigra</i> .	3
Figura 1.2	Ninho da espécie <i>M. interrupta</i> .	4
Figura 1.3	Espectros de RMN de ^1H de várias amostras, onde os deslocamentos químicos e demais informações serão utilizados para construção da matriz nxm.	13
Figura 3.1	Coleta de méis no meliponário do INPA.	25
Figura 3.2	Representação gráfica da sequência de pulsos do experimento de ^1H com pré-saturação do sinal da água (<i>noesygppr1d</i>).	29
Figura 3.3	Representação esquemática da partição líquido-líquido realizada nos méis de <i>M. seminigra</i> e <i>M. interrupta</i>	30
Figura 3.4	Representação esquemática da extração em fase sólida (SPE) realizada nos méis de <i>M. seminigra</i> e <i>M. interrupta</i> .	32
Figura 4.1	Espectro de ^1H do etanol obtido da fermentação de um mel comercial.	41
Figura 4.2	Espectro de ^2H do etanol obtido da fermentação de um mel comercial.	41
Figura 4.3	Espectro de ^1H do mel autêntico de <i>M. interrupta</i> (MI-05)	46
Figura 4.4	Ampliação do mapa de correlação HSQC-TOCSY de uma amostra de mel de abelha sem ferrão, mostrando as correlações dos hidrogênios anoméricos com os carbonos dentro do mesmo sistema de <i>spin</i> .	47
Figura 4.5	Mapa de correlação COSY ampliado de uma amostra de mel de abelha sem ferrão.	47
Figura 4.6	Mapa de correlação HSQC ampliado de uma amostra de mel de abelha sem ferrão.	48
Figura 4.7	Mapa de correlação HMBC ampliado de uma amostra de mel de abelha sem ferrão.	48
Figura 4.8	Espectro de ^1H e ampliações do mel autêntico de <i>M. interrupta</i> , mostrando os sinais característicos de aminoácidos.	50
Figura 4.9	Ampliações do mapa de correlação HSQC-TOCSY (a) e HSQC (b) mostrando as correlações dos aminoácidos fenilalanina e tirosina.	50

Figura 4.10	Expansão do espectro de RMN de ^1H do mel comercial MS-A.	53
Figura 4.11	Expansão do mapa de correlação HSQC do mel comercial MS-A.	53
Figura 4.12	Gráfico de escores de PC1xPC3 dos espectros de RMN de ^1H dos méis autênticos e comerciais.	55
Figura 4.13	Gráfico de pesos de PC1xPC3 dos espectros de RMN de ^1H dos méis autênticos e comerciais.	55
Figura 4.14	Gráfico de escores de PC1xPC2 da região aromática dos espectros de RMN de ^1H dos méis autênticos e comerciais.	56
Figura 4.15	Gráfico de pesos de PC1xPC2 da região aromática dos espectros de RMN de ^1H dos méis autênticos e comerciais.	56
Figura 4.16	Gráfico de escores de PC1xPC2 dos espectros completos de RMN de ^1H dos méis autênticos (<i>M. seminigra</i> e <i>M. interrupta</i>), comerciais de abelhas sem ferrão e comerciais de <i>A. melifera</i> .	57
Figura 4.17	Gráfico de pesos de PC1xPC2 dos espectros de RMN de ^1H dos méis autênticos (<i>M. seminigra</i> e <i>M. interrupta</i>), comerciais de abelhas sem ferrão e comerciais de <i>A. melifera</i> .	58
Figura 4.18	Ampliação do gráfico de pesos de PC1xPC2 dos espectros de RMN de ^1H dos méis autênticos (<i>M. seminigra</i> e <i>M. interrupta</i>), comerciais de abelhas sem ferrão e comerciais de <i>A. melifera</i> .	59
Figura 4.19	Gráfico mostrando a influência das variáveis em PC2 referente à discriminação observada na figura 25.	59
Figura 4.20	Gráfico de escores de PC2xPC3 dos espectros completos de RMN de ^1H dos méis autênticos (<i>M. seminigra</i> e <i>M. interrupta</i>), comerciais de abelhas sem ferrão e comerciais de <i>Apis melifera</i> .	60
Figura 4.21	Gráfico de pesos de PC2xPC3 dos espectros de RMN de ^1H dos méis autênticos (<i>M. seminigra</i> e <i>M. interrupta</i>), comerciais de abelhas sem ferrão e comerciais de <i>A. melifera</i> .	60
Figura 4.22	Gráfico dos espectros de um mel autêntico e um comercial, mostrando a diferença na quantidade de açúcar presente nos mesmos (MS-188 em vermelho	61

representa o mel de *Melipona seminigra* e MS-B em azul, um mel comercial).

- Figura 4.23** Gráfico dos espectros dos méis comerciais (AM-7 e AM-3), mostrando a diferença no teor de HMF presente. 61
- Figura 4.24** Gráfico dos espectros dos méis autênticos, mostrando a diferença no teor dos aminoácidos fenilalanina presentes. 62
- Figura 4.25** Gráfico de escores de PC1xPC2 da região de aromáticos dos espectros de RMN de ¹H dos méis autênticos (*M. seminigra* e *M. interrupta*), comerciais de abelhas sem ferrão e comerciais de *A. melifera*. 63
- Figura 4.26** Gráfico de pesos de PC1xPC2 dos espectros de RMN de ¹H dos méis autênticos (*M. seminigra* e *M. interrupta*), comerciais de abelhas sem ferrão e comerciais de *A. melifera*. 63
- Figura 4.27** Representação gráfico de um espectro de mel autêntico de abelhas sem ferrão e um comercial. 64
- Figura 4.28** Representação gráfico de alguns espectros de méis autênticos de abelhas sem ferrão mostrando a variação no teor do aminoácido fenilalanina. 64
- Figura 4.29** Gráfico de escores de PC1xPC2 da região de aromáticos dos espectros de RMN de ¹H dos méis autênticos (*M. seminigra* e *M. interrupta*), comerciais de abelhas sem ferrão, comerciais de *A. melifera* e 2 comerciais degradados (AM1 e AM2). 65
- Figura 4.30** Gráfico de escores de PC1xPC2 da região de 3,2 a 0,5 ppm dos espectros de RMN de ¹H dos méis autênticos (*M. seminigra* e *M. interrupta*), comerciais de abelhas sem ferrão e comerciais de *A. melifera*. 66
- Figura 4.31** Gráfico de pesos de PC1xPC2 da região de 3,2 a 0,5 ppm dos espectros de RMN de ¹H dos méis autênticos (*M. seminigra* e *M. interrupta*), comerciais de abelhas sem ferrão e comerciais de *A. melifera*. 67
- Figura 4.32** Gráficos da variância explicada e de escores dos espectros de RMN de ¹H dos méis autênticos (*M. seminigra* e *M. interrupta*). 68
- Figura 4.33** Cromatogramas ($\lambda = 254$ e 230 nm) obtidos do mel de *M. seminigra* (MS-BR), com eluição gradiente 5-95% de ACN em 50 min, volume de injeção 30 μ L e vazão de 1 mL/min. (a) 200 mg/mL e (b) 18 mg/mL, dissolvidos em acetoneitrila: água (50:50). 69

Figura 4.34	Cromatogramas ($\lambda = 254$ e 230 nm) obtidos do mel de <i>M. seminigra</i> (MS-BR), com eluição gradiente 5-95% de ACN em 50 min, volume de injeção 30 μ L e vazão de 1 mL/min. (a) 200 mg/mL e (b) 20 mg/mL, dissolvidos em acetonitrila: água.	70
Figura 4.35	Representação gráfica do cromatograma obtido em metanol do extrato diclorometano do mel de <i>Melipona seminigra</i> (MS-BRD).	71
Figura 4.36	Representação gráfica do cromatograma obtido em acetonitrila do extrato diclorometano do mel de <i>Melipona seminigra</i> (MS-BRD).	71
Figura 4.37	Representação gráfica do cromatograma otimizado de MS-BRD e picos selecionados para retenção nos cartuchos de <i>SPE General Phase</i> (GP).	72
Figura 4.38	Representação gráfica do cromatograma otimizado de MS-BRD e picos selecionados para retenção nos cartuchos de <i>SPE Strong Hydrophobic</i> (SH).	73
Figura 4.39	Espectro de RMN de ^1H do álcool fenetílico. Sequência de pulsos com dupla pré-saturação: lc1pnf2.	76
Figura 4.40	Mapa de correlação COSY do álcool fenetílico.	76
Figura 4.41	Mapa de correlação HSQC do álcool fenetílico.	77
Figura 4.42	Mapa de correlação HMBC do álcool fenetílico.	77
Figura 4.43	Espectro de RMN de ^1H do ácido abscísico.	80
Figura 4.44	Mapa de correlação COSY do ácido abscísico.	80
Figura 4.45	Mapa de correlação HSQC do ácido abscísico.	81
Figura 4.46	Mapa de correlação HMBC do ácido abscísico.	81
Figura 4.47	Espectro de RMN de ^1H de 4H-1-benzopiran-4-ona. Dados obtidos utilizando a sequência de pulsos com dupla pré-saturação: lc1pnf2.	83
Figura 4.48	Mapa de correlação COSY do composto majoritário da fração MS-BRD7 (4H-1-benzopiran-4-ona).	83
Figura 4.49	Mapa de correlação HSQC do composto majoritário da fração MS-BRD 7 (4H-1-benzopiran-4-ona).	84
Figura 4.50	Mapa de correlação HMBC do composto majoritário da fração MS-BRD 7 (4H-1-benzopiran-4-ona).	84

Figura 4.51	Espectro de RMN de ^1H e expansões do ácido faseico. Dados obtidos utilizando a sequência de pulsos com dupla pré-saturação: lc1pnf2.	87
Figura 4.52	Mapa de correlação COSY do ácido faseico.	87
Figura 4.53	Mapa de correlação HSQC do ácido faseico.	88
Figura 4.54	Mapa de correlação HMBC do ácido faseico.	88
Figura 4.55	Espectro de RMN de ^1H do composto majoritário da fração MS-BRD10 (2,3-dihidro-1H-quinolin-4-ona). Dados obtidos utilizando a sequência de pulsos com dupla pré-saturação: lc1pnf2.	90
Figura 4.56	Mapa de correlação COSY do composto majoritário da fração MS-BRD10 (2,3-dihidro-1H-quinolin-4-ona).	90
Figura 4.57	Mapa de correlação HSQC do composto majoritário da fração MS-BRD10 (2,3-dihidro-1H-quinolin-4-ona).	91
Figura 4.58	Mapa de correlação HMBC do composto majoritário da fração MS-BRD10 (2,3-dihidro-1H-quinolin-4-ona).	91
Figura 4.59	Cromatograma obtido em acetonitrila como modificador orgânico do extrato acetato de etila do mel de <i>Melipona seminigra</i> (MS-BRA).	92
Figura 4.60	Representação gráfica do cromatograma otimizado de MS-BRA e picos selecionados para retenção nos cartuchos de SPE (<i>HysphereTM-resin Strong Hydrophobic</i> (SH)).	93
Figura 4.61	Representação gráfica do cromatograma obtido em Metanol do extrato diclorometano do mel de <i>Melipona interrupta</i> (MI-05D).	95
Figura 4.62	Representação gráfica do cromatograma otimizado de MI-05D e picos selecionados para retenção nos cartuchos de SPE (<i>HysphereTM – General Phase</i>).	96
Figura 4.63	Espectro de RMN de ^1H do composto majoritário da fração MI-05D1 (xanthoceronona A). Dados obtidos utilizando a sequência de pulsos com dupla pré-saturação: lc1pnf2.	98
Figura 4.64	Ampliação do mapa de correlação HSQC da xanthoceronona A.	98
Figura 4.65	Ampliação do mapa de correlação HMBC da xanthoceronona A.	99

Figura 4.66	Espectro de RMN de ^1H e expansões do dehidrovomifoliol. Dados obtidos utilizando a sequência de pulsos com dupla pré-saturação: lc1pnf2.	102
Figura 4.67	Mapa de correlação COSY do composto majoritário dehidrovomifoliol.	102
Figura 4.68	Mapa de correlação HSQC do composto majoritário dehidrovomifoliol.	103
Figura 4.69	Mapa de correlação HMBC do composto majoritário dehidrovomifoliol.	103
Figura 4.70	Representação gráfica do cromatograma obtido em metanol do extrato acetato de etila do mel de <i>Melipona interrupta</i> (MI-05A).	105
Figura 4.71	Representação gráfica do cromatograma otimizado de MI-05A e picos selecionados para retenção nos cartuchos de SPE.	106
Figura 4.72	Resumo das substâncias identificadas nos méis de <i>Melipona</i> .	108
Figura 4.73	Representação gráfica do cromatograma obtido da extração em fase sólida (SPE) de MI-BR, em meio ácido.	109
Figura 4.74	Representação gráfica do cromatograma obtido da extração em fase sólida (SPE) de MI-BR, em meio básico.	110
Figura 4.75	Representação gráfica do cromatograma ampliado da fração MI-BRa tratada em SPE (HLB) meio ácido e fortificada com o padrão interno (naringina - 40 $\mu\text{g/mL}$).	111
Figura 4.76	Representação gráfica do cromatograma obtido da extração em fase sólida (SPE) de MI-BRa, em meio ácido e picos selecionados para retenção em GP.	112
Figura 4.77	Representação gráfica do cromatograma obtido da extração em fase sólida (SPE) de MI-BRa, em meio ácido e picos selecionados para retenção em GP.	113
Figura 4.78	Representação gráfica do cromatograma de MI-BRa, mostrando as regiões selecionadas para o coletor de frações usando o modo <i>time slice</i> .	121
Figura 4.79	Representação gráfica do cromatograma de MI-BRa, mostrando as regiões selecionadas para o coletor de frações usando o modo <i>time slice</i>	121

- Figura 4.80** Representação gráfica do cromatograma de MI-BRa, mostrando as 4 regiões selecionadas para o coletor de frações usando o modo *time slice* para concentrar os compostos de interesse. 122
- Figura 4.81** Substâncias identificadas no mel de *M. interrupta* após tratamento no SPE. 123

RESUMO

ANÁLISE DOS MÉIS DE ABELHAS DO GÊNERO *Melipona* (ABELHAS SEM FERRÃO) ATRAVÉS DE LC-SPE/NMR, LC-BPSU/NMR E RMN ALIADA À QUIMIOMETRIA. No Brasil são encontradas aproximadamente 200 espécies de abelhas sem ferrão, principalmente na região amazônica. Dentre as espécies que mais se destacam na Amazônia Central estão *Melipona seminigra* e *M. interrupta*, pois são abundantes e apresentam grande potencial melífero, no entanto, pouco se conhece a respeito dos constituintes químicos desses méis. Assim, um dos objetivos desse trabalho foi estudar os méis provenientes das espécies citadas, através das técnicas LC-SPE/NMR e LC-BPSU/NMR, na tentativa de identificar os constituintes minoritários presentes. A técnica de RMN de ^1H aliada à quimiometria e à determinação da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ (SNIF-NMR) também foi utilizada com o intuito de avaliar a autenticidade dos méis comerciais. Os méis considerados autênticos foram adquiridos no meliponário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e os méis comerciais adquiridos em vários locais da região norte do Brasil. A análise por SNIF-NMR mostrou que todos os méis avaliados são provenientes do ciclo biossintético C_3 , e portanto, através da análise isotópica foi possível inferir que não houve adulterações nos méis no sentido de adição de açúcar diretamente no mel ou alimentação das abelhas com açúcar, também observou-se com esse resultado que as abelhas não demonstram preferência por plantas de ciclos diferentes. No entanto, a quimiometria mostrou claramente um outro tipo de fraude realizada na comercialização dos méis de abelhas sem ferrão, foi possível observar a diferença em entre os méis autênticos e comerciais, devido a presença de 5-hidróximetilfurfural (HMF) e ácido cítrico somente nos méis comerciais. Dos dez méis comerciais analisados, somente dois agruparam-se aos méis autênticos. Na tentativa de determinar a origem desses méis comerciais, também foram analisadas algumas amostras de mel de abelha com ferrão (*Apis mellifera*). Os resultados mostraram o agrupamento dos méis comerciais adquiridos como de abelha sem ferrão com os méis de *Apis mellifera*. A partir das análises quimiométrica também ficou claro a presença dos aminoácidos fenilalanina e treonina somente nos méis autênticos, o que auxiliou na separação dos méis comerciais. Através das técnicas LC-SPE/NMR e LC-BPSU/NMR foi possível identificar 5 substâncias nos méis de *M. seminigra*; e 19 nos méis de *M. interrupta*, sendo 11 nunca relatadas em méis.

ABSTRACT

ANALYSIS OF HONEY TYPES OF BEES OF THE GENUS *Melipona* (STINGLESS BEES) BY LC-SPE/NMR, LC-BPSU/NMR AND NMR COMBINED WITH CHEMOMETRICS. In Brazil, there are approximately 200 species of stingless bees, especially in the Amazon region. The *Melipona seminigra* and the *M. interrupta* are species that stand out in Central Amazon, since they are abundant and have great honey potential; however, little is known about the chemical constituents of the honey varietals produced by these species. Therefore, the objective of this work was to study the honey varietals produced by the aforementioned species through LC-SPE/NMR and LC-BPSU/NMR techniques in order to identify the minor constituents. The ^1H NMR technique combined with chemometrics and with the determination of the isotopic $^2\text{H}/^1\text{H}$ (SNIF-NMR) ratio was also used in order to evaluate the authenticity of commercial honey varietals. The varietals considered authentic were acquired from the apiary of the *Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)* and the commercial varietals were bought at different stores in the north region. The SNIF analysis showed that all evaluated types of honey come from the C_3 biosynthetic cycle and, thus, through isotopic analysis, it was possible to infer that there was no adulteration to the varietals when it comes to addition of sugar directly to the honey or to the feeding of bees and it was also possible to observe that the bees did not prefer plants of different cycles. Nonetheless, the chemometrics clearly showed another type of fraud performed in the commercialization of stingless bee honey. It was possible to observe the difference between authentic and commercial honey varietals, especially due to the presence of 5-hydroxy-methyl-furfural (HMF) and citric acid only in the commercial varietals. Only two of the ten commercial honey varietals analyzed grouped together with the authentic ones. In order to determine the origin of these commercial types, some samples of honey produced by bees with stings (*Apis mellifera*) were also analyzed. The results showed the grouping of commercial honey varietals bought as being from stingless bees together with the honey types from *Apis mellifera*. From the chemometrics analyses, the presence of phenylalanine and threonine was clear only in the authentic honey varietals, which helped in the separation of the commercial varietals. Through the LC-SPE and LC-BPSU techniques, it was possible to identify 5 substances in the honey varietals from *M. seminigra*, and 19 in the varietals from *M. interrupta*, of which 11 had never been reported in honey.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1- INTRODUÇÃO	2
1.1- <i>Melipona seminigra merrillae</i> Cockerel, 1919	2
1.2 <i>Melipona interrupta manaosensis</i> Schwarz, 1932	4
1.3 O mel das abelhas sem ferrão	5
1.4 SNIF-NMR (<i>Site Specific Natural Isotopic Fractionation studied by Nuclear Magnetic Resonance</i>)	8
1.4.1 RMN de ^2H	10
1.4.2 Os mecanismos biossintéticos	11
1.5 Análise quimiométrica	12
1.5.1 Análise exploratória dos dados	13
1.6 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à ressonância magnética nuclear (LC-NMR)	15
1.6.1 Modo <i>on-flow</i>	17
1.6.2 Modo <i>stopped-flow</i>	18
1.6.3 Modo <i>loop Storage</i>	19
1.6.4 LC-SPE-NMR	20
2.0 OBJETIVOS	23
3.0 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	25
3.1 Coleta e obtenção dos méis	25
3.2 Preparo das amostras e aquisição de dados para análise da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$	25
3.2.1 Fermentação dos méis e preparo das amostras	26
3.2.2 Aquisição dos espectros de RMN de ^2H e ^1H	26
3.3 Cálculo da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$	27
3.4 Preparo das amostras e aquisição de dados para análise quimiométrica	28
3.5 Análise dos constituintes dos méis por LC-SPE/NMR	30
3.5.1 Preparo das amostras através de partição líquido-líquido.	30

3.5.2	Preparo das amostras através de extração em fase sólida (SPE) <i>off line</i> .	31
3.5.3	Uso de padrão interno para verificar a eficiência do método de extração por SPE	32
3.5.4	Sistema LC-SPE/NMR	33
3.5.5	Sistema LC-BPSU/NMR	35
3.5.6	Equipamento de RMN	35
3.6	Materiais e equipamentos em geral	36
4.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	Coleta e obtenção dos méis	38
4.2	Análise da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$	40
4.3	Identificação dos componentes majoritários dos méis.	45
4.4	Análise quimiométrica	54
4.5	Análise dos constituintes minoritários dos méis por LC-SPE/NMR	69
4.5.1	Análise dos méis por LC-SPE utilizando partição líquido-líquido como pré-tratamento	69
4.5.1.1	Análise da Fase CH_2Cl_2 de <i>Melipona seminigra</i> (MS-BRD)	70
4.5.1.2	Análise da Fase Acetato de etila de <i>Melipona seminigra</i> (MS-BRA)	92
4.5.1.3	Análise da Fase CH_2Cl_2 de <i>Melipona interrupta</i> (MI-05)	95
4.5.1.4	Análise da Fase AcOEt de MI-05	105
4.5.2	Análise dos méis utilizando extração em fase sólida (SPE) como pré-tratamento.	109
4.5.2.1	Desenvolvimento do método e avaliação da taxa de recuperação.	109
4.5.2.2	Avaliação da taxa de Recuperação da Extração em Fase Sólida (SPE).	111
4.5.2.3	Análise dos compostos através do LC-SPE	112
	CONCLUSÃO	139
	REFERÊNCIAS BIBLIORÁFICAS	142

1.0 INTRODUÇÃO

1.0 INTRODUÇÃO

No mundo existem cerca de 20 mil espécies de abelhas, sendo que grande parte dessas espécies não formam colônias, por isso são conhecidas como abelhas solitárias. Entre as que formam colônias, de 300 a 400 espécies não possuem ferrão e são classificadas como Meliponíneos (CARVALHO-ZILSE et al., 2005).

No Brasil são encontradas aproximadamente 200 espécies de abelhas sem ferrão (CARVALHO et al., 2005), principalmente na região amazônica, o que torna a Amazônia conhecida como o berço mundial das abelhas sem ferrão (CARVALHO-ZILSE et al., 2005). Dentre as espécies que ocorrem na região, destacam-se as do gênero *Melipona*, pois apesar de serem amplamente distribuídas nos Neotrópicos, e encontradas em todos os estados brasileiros, é na região amazônica que se concentra a maior ocorrência de espécies desse gênero, inclusive as que ainda não foram descritas (SILVEIRA et al., 2002). Este gênero pertencente à subfamília Meliponinae, possui características fisiológicas, ecológicas e comportamentais diferentes de outros grupos sociais de Hymenoptera (NUNES-SILVA et al., 2008), sendo então o único classificado dentro da tribo Meliponini (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Conforme o local onde vivem, as abelhas sem ferrão polinizam de 30% a 90% da flora nativa brasileira (KERR et al., 2001; CARVALHO-ZILSE et al., 2005). Por isso, têm uma função muito importante na formação das florestas, contribuindo também para manter a diversidade de plantas e animais que vivem na várzea (CARVALHO-ZILSE et al., 2005). Espécies que se destacam na Amazônia Central são *Melipona seminigra merrilae* Cockerel, 1919 e *M. interrupta manaosensis* Schwarz, 1932, pois são abundantes e apresentam grande potencial melífero (KERR et al., 2001).

1.1 *Melipona seminigra merrilae* Cockerel, 1919

De acordo com CAMARGO e PEDRO (2008) a espécie *Melipona seminigra* é de ocorrência natural somente no estado do Amazonas, podendo ser encontrada desde Paricatuba (no baixo Purus) até a região dos rios Camanaú e Cariaú; em Manaus e ao longo do rio Negro (PERALTA et al., 1999).

Popularmente essa espécie é conhecida como urucu-boca-de-renda ou jandaíra (PORTUGAL-ARAÚJO, 1978; PERALTA et al., 1999), a entrada do seu ninho é bem peculiar, no qual as abelhas a constroem em forma de trombeta radiada e curta

(Figura 1.1). Normalmente uma colônia dessa espécie é composta de cerca de uns 1300 indivíduos e de modo geral são abelhas pouco agressivas. Estima-se que a produção de mel seja de até 3 litros mel/colmeia/ano (PORTUGAL-ARAÚJO, 1978).



Figura 1.1. Entrada do ninho da espécie *M. seminigra*

Estudos com meliponíneos da Amazônia mostraram que as abelhas do gênero *Melipona* são mais especializadas no que diz respeito à organização e comunicação (MARQUES-SOUZA, 1996), pois essas abelhas aproveitam ao máximo as fontes mais atrativas e com isso mantêm certa fidelidade a determinadas espécies de plantas, resultando na pouca diversidade em suas coletas de pólen e néctar (MARQUES-SOUZA et al., 2002).

Dentre as espécies de plantas visitadas por *M. seminigra*, a maioria é de ocorrência somente na região amazônica, dentre as quais se destacam: mari-mari (*Cassia grandis* - Fabaceae), embaúba (*Cecropia* sp. - Urticaceae), taperebá (*Spondias mombin* - Anacardiaceae), socoró (*Mouriria ulei* - Melastomataceae), pau-de-facho (*Aparisthium cordatum* - Euphorbiaceae), goiaba-de-anta (*Bellucia grossularioides* - Melastomataceae), cupania (*Matayba* sp. - Sapindaceae), baginha (*Stryphnodendron guianense* - Fabaceae), dentre outras (MARQUES-SOUZA et al., 2002).

No entanto, essa espécie por ser muito produtiva, é exaustivamente visada por extrativistas (meleiros) e corre o risco de ser eliminada rapidamente de nossa floresta, afirma Kerr (2002). Classificada como ameaçada de extinção, *M. seminigra* merece atenção especial, no sentido de se propagar a ideia da criação racional de abelhas sem ferrão, contribuindo assim para sua preservação.

1.2 *Melipona interrupta manaosensis* Schwarz, 1932

A espécie *Melipona interrupta* se destaca por ter sido uma das primeiras a ser criada para produção de mel no Brasil. Esta espécie tem uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo no Brasil (Amapá, Amazonas e Pará), na Guiana Francesa (Cayenne), na Guiana e Suriname (Marowijne) (CAMARGO e PEDRO, 2008).

Na Amazônia, *M. interrupta* é conhecida popularmente como jupará ou jandaíra- preta-da-Amazônia, podendo ser encontrada desde Manaus, subindo o rio Branco até a Guiana Inglesa (PERALTA et al., 1999). A colônia dessa espécie é constituída, em média, por cerca de 5000 operárias, aproximadamente 250 machos e uma rainha (Figura 1.2).



Figura 1.2. Ninho da espécie *M. interrupta*

As operárias medem cerca de 1,2 cm, de cor preta e listras amarelas no abdômen e são pouco defensivas. Tanto *M. interrupta* quanto *M. seminigra* constroem ninhos em locais protegidos, como ocos de árvores. Como não desenvolveram ferrão, quando atacadas usam de artifícios próprios para se defenderem, por exemplo, enrolam-se nos cabelos e pelos, entram em ouvidos, nariz e olhos, ou, ainda, lançam substâncias resinosas que ardem a pele (CARVALHO-ZILSE et al., 2005)

A entrada do ninho desta espécie é feita de resina misturada com barro endurecido de cor esbranquiçada (KERR, 2002). CARVALHO-ZILSE (2006), estima-se uma produtividade de 1 litro/colmeia/ano em colmeias racionais de *M. interrupta* na região da Amazônia central.

Dentre as espécies de plantas que atraem as campeiras de *M. interrupta* destacam-se *Alchornea* sp. (Euphorbiaceae), *Borreria* sp. (Rubiaceae), *Casearia*

arborea (Flacourtiaceae), *Cordia tetrandia* (Boraginaceae), *Eugenia* sp. (Myrtaceae), *Miconia* sp. (Melastomataceae), *Mora paraensis* (Moraceae), *Protium heptaphyllum* (Burseraceae), *Solanum* sp. (Solanaceae) (ABSY et al., 1984).

1.3 O mel das abelhas sem ferrão

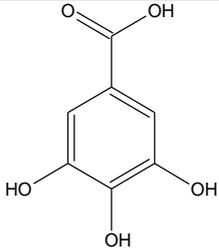
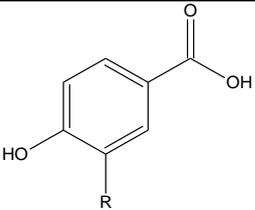
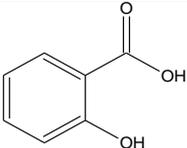
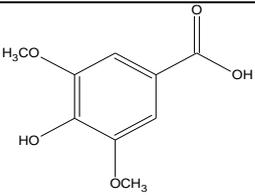
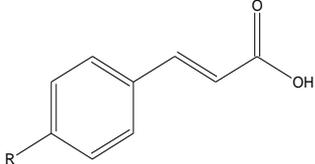
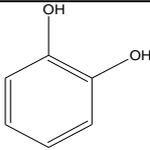
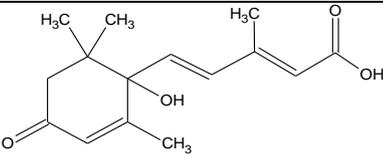
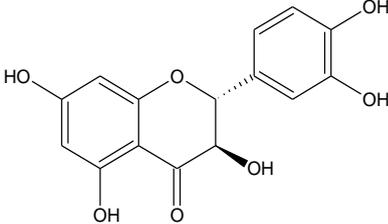
Embora os meliponíneos produzam mel em menor quantidade, ainda assim se destacam quanto a sua importância, pois fornecem um produto diferenciado do mel de *Apis mellifera*. Essa diferença é notada principalmente na doçura inigualável, no sabor diferenciado e na maioria das vezes mais aromático (KERR, 1996; KERR, 2001; NOGUEIRA-NETO, 1997; MARCHINI et al., 1998).

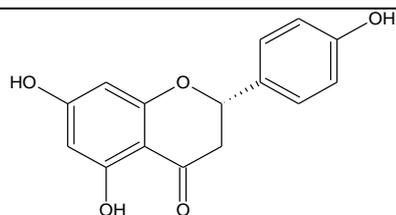
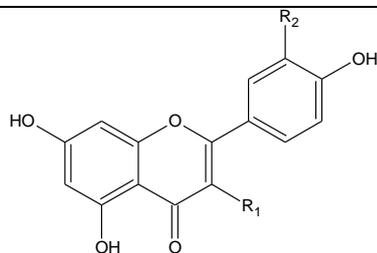
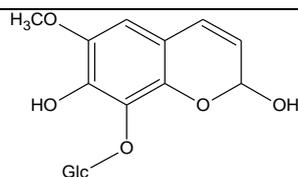
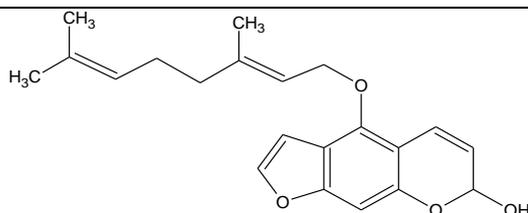
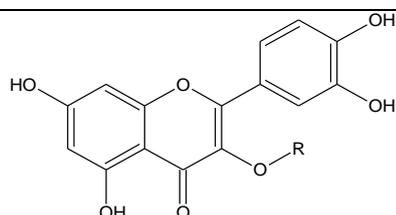
De modo geral a composição do mel varia decorrente de alguns fatores, como as fontes vegetais de onde as abelhas visitam, o tipo de solo, a espécie da abelha, o estado da colônia, o tempo de maturação do mel, além das condições meteorológicas na época da colheita (CAMPOS e MODESTA, 2000; CRANE, 1985).

A literatura relata que o mel produzido pelas abelhas sem ferrão apresenta diferenças em alguns parâmetros físico-químicos, quando comparados ao mel produzido por *A. mellifera*, uma das mais importantes é a porcentagem de água (umidade) que é bastante elevada, o que torna esse mel menos denso que o mel das abelhas africanizadas (*A. mellifera*) (CAMPOS e MODESTA, 2000). Um exemplo disso é o estudo realizado por SOUZA et al. (2004) que determinaram a umidade de méis de algumas espécies de *Melipona* ocorrentes na Amazônia. Eles observaram uma variação de 25 a 35% de umidade para esses méis, considerado elevado, quando comparado com o mel de *A. mellifera* que apresenta teor de água variando de 15 a 21% (CARVALHO et al., 2005). É importante ressaltar também a variedade da cor desses méis de meliponíneos, pois vai desde o quase transparente ao âmbar (BEZERRA e SOUZA, 2002; AZEREDO et al., 1999).

De modo geral, além dos açúcares em solução, o mel também contém ácidos orgânicos, enzimas, vitaminas, flavonoides, sais minerais e uma extensa variedade de compostos orgânicos, que contribuem para sua cor, odor e sabor (VILHENA e ALMEIDA-MURADIAN, 1999). Com relação aos estudos envolvendo a identificação dos constituintes dos méis de abelha sem ferrão, pouco se tem relato. A tabela 1.1 mostra alguns componentes reportados para esse tipo de mel (abelha sem ferrão).

Tabela 1.1. Substâncias identificadas em méis de abelhas sem ferrão

Estrutura da substância	Nome da substância
	Ácido gálico ^I
	R= OH = Ácido protocatecuico ^I R= H = Ácido 4-hidroxibenzoico ^I R= OCH ₃ = Ácido vanílico ^I
	Ácido salicílico ^I
	Ácido siríngico ^I
	R= OH = Ácido p-cumárico ^I R= H = Ácido cinâmico ^I
	Catecol ^I
	Ácido abscísico ^{I,IV}
	Taxifolina ^I

Naringenina^IR₁= H; R₂= OH = Luteolina^{I, II}R₁= OH; R₂= OCH₃ = Isorhamnetina^{II}Fraxina^{II}Bergamottina^{II}R= Rhamnose = Quercitrina^{II}R= Rutinose = Rutina^{III}

I- DA SILVA et al., 2013; II- GERRINI et al., 2009; III- PIMENTEL et al., 2013; IV- SILVA et al., 2013

Com relação aos benefícios do mel, há muito se conhece a respeito, pois além de ser adoçante natural e fonte de energia, de maneira geral o mel é conhecido por apresentar efeitos imunológicos, antibacteriano, anti-inflamatório, analgésico, sedativo, expectorante e hiposensibilizador (WIESE, 1986). Na região amazônica, há relatos da utilização dos méis de abelhas sem ferrão, no combate às doenças pulmonares, impotência, infecção dos olhos, fortificantes a agentes bactericidas (KERR, 2001; SOUZA et al., 2004).

Devido a essa grande reputação, os méis de meliponíneos estão sendo cada vez mais valorizados e comercializados no comércio local. Isso é interessante, uma vez que auxilia de maneira significativa na renda familiar e ainda contribui para a

conservação da biodiversidade da região (CORTOPASSI-LAURINO et al., 2006). No entanto, por ser um produto de alto valor, cerca de 10 vezes maior que o de *A. mellifera*, é passível de adulterações das mais variadas formas.

Uma forma de aumentar a produção de mel e que pode ser facilmente executada é a alimentação das abelhas com uma solução aquosa de sacarose, que é somente permitido no período chuvoso, pois as abelhas ficam impossibilitadas de sair para coleta. Outra forma é a adição de açúcar diretamente no mel, resultando num aumento da quantidade de mel a ser comercializado. Há ainda a possibilidade de venda fraudulenta, onde pessoas agindo de má fé podem vender mel de abelhas africanizadas, como sendo de abelhas sem ferrão, pois a produção de méis de *Apis mellifera* é mais significativa e o custo é mais baixo.

De acordo com a instrução normativa nº 11 do Ministério da Agricultura, que afirma que ao mel não pode ser adicionado açúcares e/ou outras substâncias que alterem a sua composição original, todos esses atos acima citados se configuram então em adulterações.

Apesar da importância desse tipo de mel, a Legislação Brasileira que regulamenta a padronização do mel para fins de comercialização só atende às características do mel de *Apis*, não contemplando o mel das abelhas nativas do país (AMAVIDA), o que leva à necessidade de estudos desses méis para a sua padronização e uma futura Legislação Brasileira.

Neste sentido, pouco valor é agregado ao produto comercial, devido principalmente ao desconhecimento dos constituintes químicos, por esse motivo, lançamos mão de ferramentas analíticas hifenadas com grande potencial na identificação e caracterização de substâncias (*LC-SPE/NMR*), na tentativa de tornar conhecida a composição do mel de abelha sem ferrão.

Por outro lado, visando garantir a qualidade do produto oferecido detectando possíveis fraudes utilizou-se conjuntamente as técnicas de RMN de ^1H - aliada à quimiometria e *SNIF-NMR* (determinação da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$).

1.4 SNIF-NMR (*Site Specific Natural Isotopic Fractionation studied by Nuclear Magnetic Resonance*)

As proporções específicas de isótopos presentes nos compostos ou moléculas dependem das variações nas condições climáticas e geográficas, ou até

mesmo do metabolismo fotossintético das plantas. O efeito dessas variações na composição isotópica é conhecido como fracionamento ou discriminação isotópica (REID et al., 2006). Esse fracionamento pode ser explorado através de duas técnicas IRMS (*Isotope-Ratio Mass Spectrometry*) e SNIF-NMR. No entanto, os valores fornecidos pela análise por espectrometria de massas normalmente são limitados à média das razões isotópicas de todos os diferentes isotopômeros das espécies em estudo, tornando os resultados difíceis de interpretar devido à falta de especificidade (ZHANG et al., 2003).

A técnica SNIF-NMR foi primeiramente idealizada por MARTIN (1981) como uma proposta alternativa para análise de fracionamento isotópico mais focado em um sítio específico. Nos anos 1990 a técnica foi oficialmente definida para a autenticação de amostras de vinho no controle do enriquecimento ou *chaptalization* (adição de açúcares ao mosto de uvas antes da fermentação) (*The Commission of the EC*, 1990).

A análise da razão isotópica é uma poderosa ferramenta não somente na determinação da origem de açúcares em sucos e vinhos (OGRINC et al., 2003, OGRINC et al., 2001, MARTIN et al., 1983), mas também é usado atualmente para o controle de diversos outros tipos de alimentos, como mel (BOFFO et al., 2012, LINDNER et al., 1996), tequila (BAUER-CHRISTOPH et al., 2003), café (DANHO et al., 1992), vinagre (BOFFO et al., 2009a) e azeite de oliva (ROYER et al., 1999).

No caso de estudos do fracionamento isotópico com méis o material analisado é o etanol obtido da fermentação. Em decorrência da pequena abundância natural de deutério em moléculas orgânicas ($100-160 \times 10^{-6}$), a probabilidade de se ter uma espécie bideuterada é muito pequena e pode ser ignorada (MARTIN et al., 1983). Dessa forma, apenas três isotopômeros monodeuterados de etanol são considerados $\text{CH}_2\text{DCH}_2\text{OH}$ (I), CH_3CHDOH (II) e $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OD}$ (III) (MARTIN et al., 1988).

Apesar de nem sempre ser possível distinguir todos os diferentes isotopômeros de deutério em um espectro devido à baixa sensibilidade, mesmo usando um campo mais alto, 11,7T ou 14,1 T, a quantidade de informação disponível quando se obtém um espectro de ^2H é suficiente para caracterizar um composto por SNIF-NMR (MARTIN et al., 1990).

Para medir a relação isotópica dos sítios $(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{I}}$ e $(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{II}}$, correspondentes à metila (I) e metileno (II), um padrão de referência interna é usado,

TMU (tetrametilureia), e os dados de ^2H RMN são utilizados com base na equação 1. O valor para a razão ($^2\text{H}/^1\text{H}$) do padrão TMU, é de 135 ppm (MARTIN et al., 1988; MARTIN et al., 1990; MARTIN et al., 1991).

$$\left(\frac{^2\text{H}}{^1\text{H}}\right)_i^A = \frac{I_i^A \cdot P^P \cdot m^P \cdot M^A}{I^P \cdot P_i^A \cdot m^A \cdot M^P} \left(\frac{^2\text{H}}{^1\text{H}}\right)^P$$

Onde:

$(^2\text{H}/^1\text{H})_i^A$: relação isotópica no sítio i do composto em estudo, A, neste caso etanol;
 I_i^A e I^P : área de integração dos sinais de ^2H RMN do sítio i de A e do padrão, respectivamente;
 P^P e P_i^A : número de hidrogênios do padrão e do sítio i de A, respectivamente;
 m^P e m^A : massa do padrão de A, respectivamente;
 M^A e M^P : massa molar de A e do padrão, respectivamente;
 $(^2\text{H}/^1\text{H})^P$: relação isotópica do padrão, TMU.

1.4.1 RMN de ^2H

Alguns relatos na literatura mostram que espectroscopia de RMN de ^2H quantitativo, com abundância natural é uma ferramenta poderosa para investigar a distribuição interna de ^2H em vários compostos orgânicos (MARTIN, 1991, ZHANG et al., 2003, BOFFO et al., 2009a).

Apesar de o deutério possuir uma baixa abundância natural (0,015%) e apresentar sensibilidade sete vezes menor que o hidrogênio, a RMN de ^2H apresenta propriedades interessantes, pois devido ao seu número quântico de spin 1 e sua relativa pequena constante de acoplamento quadrupolar ($2,8 \times 10^{-31} \text{ m}^2$), o relaxamento do núcleo de ^2H é dominado por interações quadrupolares e conseqüentemente, não envolve qualquer efeito nuclear Overhauser. Este comportamento é uma vantagem para medidas de relação isotópica exatas de hidrogênio e deutério (GUILLOU et al., 1992). Muito embora, esse momento quadrupolar seja suficiente para causar alargamento de linha no espectro (CLARIDGE, 2009).

Para a aquisição de experimentos de RMN de ^2H quantitativamente, alguns parâmetros especiais devem ser seguidos. Como o cuidado na variação do campo magnético, pois mesmo magnetos supercondutores estão susceptíveis a variações no campo. Esse ajuste na variação do campo magnético (*drift*) é realizado

pelo travamento de spins (*lock*), que mantém a força do campo magnético constante em toda a aquisição (JACOBSEN, 2007). No caso em que o *lock* de deutério não está disponível para corrigir essas variações no campo, o *lock* de ^{19}F é utilizado para evitar deslocamentos no campo e consequente alargamento dos sinais. No entanto, quando não há possibilidade de aquisição de experimentos utilizando o *lock* de ^{19}F , e se deseja adquirir experimentos com o núcleo de deutério, é necessária a aquisição dos dados sem *lock*. Isso é possível quando se utiliza intervalos de tempo limitados, dependente da velocidade de deslocamento do campo magnético (*drift*) do espectrômetro (CLARIDGE, 2009).

1.4.2 Os mecanismos Biossintéticos

De acordo com a bioquímica, a composição isotópica dos açúcares sintetizados por uma planta é resultado das transformações fotossintéticas, da fisiologia da planta, e do ambiente geográfico e climatológico. No entanto, a principal fonte de formação do conteúdo isotópico de carbono nos açúcares é o tipo de metabolismo que as plantas usam para captá-lo (GUILLOU et al., 1992).

A absorção de carbono, através do CO_2 , também chamada de fixação de carbono, ocorre através da fotossíntese por meio do Ciclo de Calvin. Há três comportamentos diferentes que as plantas apresentam em relação ao modo de fixação de carbono, são chamados de C3, C4 e CAM.

A maioria dos organismos fotossintéticos utiliza o mecanismo C3 como método de fixação de carbono e ocorre principalmente em regiões tropicais úmidas. As plantas C3 fixam CO_2 usando a enzima ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) para convertê-lo em uma molécula estoque de 3 carbonos, ácido 3-fosfoglicérico, por isso são denominadas de plantas C3 (BOOM, 2004).

O ciclo C4, descoberto por HATCH e SLACK (1996), diferencia fundamentalmente do ciclo C3 na fase inicial de captação do CO_2 , pois o carbono é primeiramente fixado através da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEP) no lugar da Rubisco, na qual é fixada na forma de ácidos C4, podendo ser aspártico ou málico. Dessa forma, a planta cria um reservatório interno de ácidos C4, que podem ser convertidos em CO_2 pela Rubisco. Elas recebem este nome C4 devido a presença desses ácidos de 4 moléculas de carbono (BOOM, 2004).

Os produtos noturnos (o que são produtos noturnos? Reescrever essa frase) de fixação de carbono podem ser armazenados em vacúolos especiais dentro

das mesmas células onde a fotossíntese durante o dia acontece. Devido à alta fixação de CO₂, as plantas C4 apresentam uma grande vantagem em relação às plantas C3, podendo sobreviver mais facilmente em ambientes áridos. Isto ocorre devido às plantas C4 atingirem taxas máximas de fotossíntese sob elevada radiação solar, fazendo com que fixem mais CO₂ por unidade de água perdida. As plantas C4 ocorrem em áreas áridas com menores quantidades de água disponível nos solos (BOOM, 2004, LEHNINGER, 2006).

O ciclo de CAM, também conhecido como metabolismo do ácido crassuláceo (*Crassulacean Acid Metabolism – CAM*), é assim denominado por ter sido reportado primeiramente em plantas da família Crassulaceae (HALL et al., 1995). É mais comumente encontrado em plantas dos desertos, ou regiões sujeitas à secas periódicas, mas também ocorre em muitas plantas aquáticas epífitas e até mesmo submersas. Com exceção das plantas aquáticas, as plantas CAM se especializaram para sobreviver em condições de escassez de água extrema. A abertura dos estômatos (poros que controlam a entrada e saída de gases nas plantas) durante a noite, evita a grande perda de água, ao mesmo tempo em que o CO₂ é fixado, por meio do ácido málico. Durante o dia, os estômatos se fecham para minimizar a perda de água por transpiração e o CO₂ fixado é então utilizado na realização da fotossíntese (BOOM, 2004; VOET et al., 2006).

1.5 Análise quimiométrica

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma das técnicas mais bem sucedidas para análises em diversas matrizes, incluindo principalmente a análise de produtos alimentícios, pois gera ricas informações a respeito das estruturas dos compostos, além de fornecer um *fingerprint*, contendo informações mais completas sobre a composição de um produto e das suas características qualitativas e quantitativas. Estas informações podem ser usadas com o objetivo de comparar, discriminar e/ou classificar as amostras (LINDON et al., 2000).

Além disso ela apresenta outras vantagens, como uma boa sensibilidade, medições não destrutivas, pouco tempo utilizado no preparo das amostras e tempos de experimentos rápidos. Tudo isso gera um grande número de informações obtidas em um espectro de RMN de ¹H, por exemplo, levando a uma possível dificuldade na interpretação dos dados quando se tem um grande número de amostras. Neste sentido, os métodos de estatística multivariada podem fornecer

meios especializados de análise e de máxima extração de informações dos dados de matrizes complexas envolvendo a técnica de RMN.

A quimiometria é uma ferramenta estatístico-matemática que aliada a diferentes métodos analíticos químicos, como a RMN, possibilita a análise de um grande número de variáveis em uma única amostra (BRERETON, 2002). Foi descrita utilizando dados de RMN inicialmente em 1971, por KOWALSKI e REILLY (1971).

Entre os métodos Quimiométricos utilizados neste trabalho, destaca-se a análise exploratória dos dados e a classificação de amostras.

1.5.1 Análise Exploratória dos dados

As técnicas de análise exploratória dos dados têm por objetivo agrupar as amostras similares e diferenciá-las entre um conjunto de amostras submetidas a certo tipo de análise. Os métodos multivariados consideram a correlação das amostras e variáveis analisadas simultaneamente, permitindo uma melhor extração de informações, quando comparado a análises de variável a variável (MOITA-NETO e MOITA, 1998). Neste método os dados obtidos das amostras são organizados em uma planilha, que é construída por n amostras e m variáveis, resultando em uma matriz $n \times m$. Desta forma, a partir de um conjunto de dados formado por espectros de RMN de ^1H , os espectros (experimentos) são as amostras e as variáveis são os deslocamentos químicos dos sinais nos espectros (Figura 1.3) (BRESCIA et al., 2002; Manual do AMIX 2004).

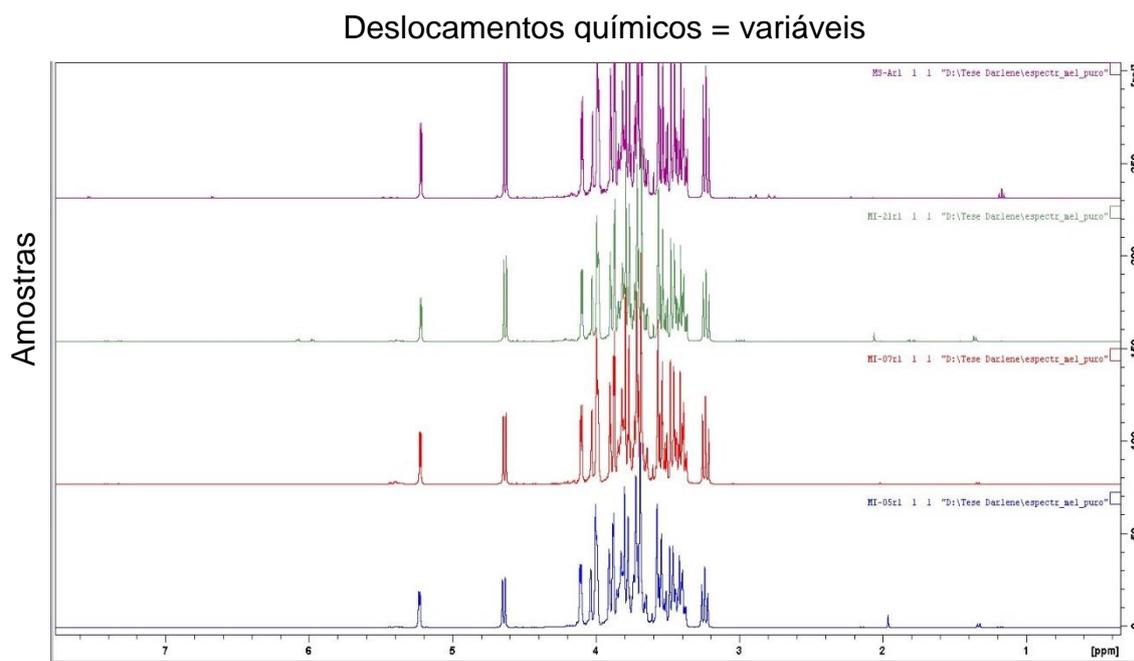


Figura 1.3. Espectros de RMN de ^1H de várias amostras, onde os deslocamentos químicos e demais informações serão utilizados para construção da matriz $n \times m$.

Os métodos de análise exploratória mais utilizados são através da análise por componentes principais PCA (*Principal Component Analysis*) e através da análise por agrupamento hierárquico HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*). Tanto PCA quanto HCA são metodologias exploratórias que se baseiam em similaridades ou diferenças entre amostras de um determinado conjunto de dados (SOUZA e POPPI, 2012).

A análise por componentes principais consiste em um método não supervisionado de análise multivariada dos dados, que permite a redução da dimensionalidade através da projeção de dados n -dimensionais em um espaço de baixa dimensão, denominados componentes principais (PC). Ou seja, as n -variáveis originais geram n -componentes principais, através de suas combinações lineares, que tem como característica a ortogonalidade e são construídos em ordem decrescente de máxima variância, em outras palavras, a componente principal 1 detém mais informações estatísticas que a componente principal 2, que tem mais informação que componente principal 3 e assim sucessivamente (MOITA-NETO e MOITA, 1998). Assim, as análises por componentes principais reduzem a dimensionalidade do conjunto de dados original, de modo que as informações mais relevantes são descritas nas primeiras componentes e as de menor importância nas últimas. De modo geral, as primeiras componentes são suficientes para descrever o sistema e mostrar as informações necessárias (BRESCIA et al., 2002).

Em uma análise de componentes principais, a estrutura dos dados é mostrada através de gráficos de escores e de pesos (*loadings*), cujos eixos são as componentes principais (PCs) onde os dados são projetados. Os escores geram a composição das PCs relacionadas às amostras, e os de pesos fornecem essa mesma composição em relação às variáveis (BEEBE, 1998). Em um gráfico de escores, cada ponto corresponde a uma amostra e as distâncias entre elas são aproximações das distâncias no espaço multivariado, ou seja, é possível a visualização do agrupamento das amostras semelhantes. No gráfico de pesos (*loadings*) cada ponto corresponde a uma variável, e ele informa quais foram as variáveis que mais influenciaram para que ocorresse uma dada discriminação. Portanto, uma análise a partir de espectros de RMN permite revelar quais foram os sinais que mais influenciaram a discriminação (BEEBE, 1998; JALALI-HERAVI et al., 2004; Manual do Amix, 2004).

A análise por agrupamento hierárquico (HCA) é uma técnica baseada em determinar a semelhança e dissimilaridade entre as amostras por meio de cálculo

de distância entre elas. HCA é um processo hierárquico no qual cada amostra é representada como um ponto no espaço de m variáveis e o objetivo é transformar os dados m -dimensional em bidimensional de maneira a enfatizar os seus agrupamentos e padrões naturais (BEEBE, 1998).

A distância entre os pontos (amostras ou variáveis) mostra a similaridade de suas propriedades, sendo útil para relacionar as amostras de forma que as mais semelhantes são agrupadas entre si. Essas distâncias são visualizadas através de diagramas conhecidos como dendogramas, que indicam as amostras mais semelhantes, ou seja, quanto menor a distância entre os pontos, maior é a similaridade entre as mesmas (PANERO e da SILVA, 2008; BEEBE, 1998).

Neste sentido, as análises quimiométricas têm sido amplamente empregadas em conjunto com a RMN principalmente em análise de alimentos, um exemplo disso é o trabalho de COSONNI et al. (2014) que mostrou ser possível a discriminação de méis florais de acordo com a origem geográfica. Ressalta-se também a discriminação realizada em quiabo (PANERO et al., 2009), óleos (SOUZA e POPPI, 2012), água de côco (SOUZA et al., 2006) e vinhos (BRESCIA et al., 2002). Todos esses trabalhos demonstram o potencial da quimiometria aliada a RMN, mostrando ser uma importante ferramenta no controle de qualidade e autenticação de produtos.

1.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Ressonância Magnética Nuclear (LC-NMR)

É sabido que a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma potente e eficiente ferramenta para elucidação estrutural de compostos orgânicos, pois além de apresentar essa possibilidade de identificação inequívoca de metabólitos, oferece algumas outras vantagens, como ser uma técnica não destrutiva e não-seletiva, apresenta certa sensibilidade, e fornece informações essenciais a respeito do conteúdo estrutural, como deslocamentos químicos, multiplicidade, integrais, interações intermoleculares e dados sobre a dinâmica do material em solução (CORCORAN e SPRAUL, 2003). Essas informações obtidas através da RMN são cruciais para estudos com caracterização de novos metabólitos. No entanto, quando a análise é de uma mistura complexa, o acoplamento a outras técnicas, como cromatografia líquida é necessário para melhorar a eficiência da identificação (CLOAREC et al., 2007).

Um sistema acoplado deve gerar informações ortogonais, pois tem o objetivo de fornecer informações diferentes a respeito dos componentes da matriz estudada. Algumas hifenações já são bem consolidadas, como é o caso das técnicas de separação cromatográficas, CG (cromatografia gasosa) e LC (cromatografia líquida), acopladas a UV-DAD, EM e RMN, que fornecem informações suficientes a respeito das estruturas dos compostos (EXARCHOU et al., 2005, WOLFENDER et al., 2003).

O sistema LC-UV-DAD é uma técnica eficaz para triagem de misturas, no entanto, os dados de absorvância de luz ultravioleta não são suficientes para uma elucidação estrutural (SNYDER et al., 1997). Outra técnica hifenada bastante relatada é LC-UV-EM, embora existam vantagens e numerosas aplicações, essa hifenação não fornece informação estrutural detalhada e conclusiva a respeito dos constituintes da amostra, especialmente quando estão presentes isômeros de compostos bioativos (WOLFENDER et al., 1998, ALBERT, 2004).

O primeiro experimento da hifenação LC-NMR foi realizado por WATANABE e NIKI (1978), no final dos anos 1970, os quais realizaram experimentos em uma mistura de compostos conhecidos através do fluxo interrompido (*stopped-flow*). Pouco depois, BAYER et al. (1979) empregou o modo de fluxo interrompido (*stopped-flow*) e também o modo de fluxo contínuo (*on-flow*) em uma mistura de compostos conhecidos.

A primeira amostra real analisada por LC-NMR foi combustível de aviação militar, no qual foi utilizada uma coluna no modo de eluição normal e clorofórmio deuterado como fase móvel. No entanto, o uso de cromatografia no modo normal de eluição restringia o campo das aplicações, por outro lado o uso de fase reversa causava problemas com pressaturação, devido a necessidade do uso de misturas de solventes, como água e acetonitrila ou metanol. No decorrer dos anos 1980, uma vasta lista de trabalhos fora publicada, com o intuito de minimizar esses inconvenientes na técnica LC-NMR (BAYER et al., 1982; ALBERT et al., 1989). Da mesma forma, houve um crescimento na área da RMN, no que diz respeito a força do campo magnético que permitiu análises de compostos menos concentrados, além do surgimento de técnicas e/sequências capazes de suprimir adequadamente os solventes utilizados (SPRAUL et al., 1993, WOLFENDER et al., 1998).

Dessa forma, LC-NMR, agora é considerada uma poderosa ferramenta para elucidação estrutural de compostos desconhecidos com uma variedade de

aplicações. Atualmente, existem vários sistemas de LC-NMR disponíveis, e a aquisição dos dados pode ser realizada utilizando vários modos de operação. Alguns exemplos são modo fluxo contínuo (*on-flow*), fluxo interrompido (*stopped-flow*), *loop-storage* e LC-SPE-NMR (EXARCHOU et al., 2005).

1.6.1 Modo *On-flow*

Neste modo, o sistema cromatográfico permite o acoplamento direto ao espectrômetro de RMN, onde o mesmo trabalhar semelhante a um detector de UV ou EM num sistema de cromatografia. Ocorre que, a amostra passa continuamente através da cela de fluxo durante a aquisição dos dados de RMN, ou seja, chega com a concentração e solvente fornecidos pela separação cromatográfica (LEVSEN et al., 2000, EXARCHOU et al., 2005). O resultado desta análise pode ser apresentado na forma de um gráfico bidimensional (domínio da frequência x tempo de retenção) (GRIFFITHS, 1995). Para se obter um melhor resultado nas análises no modo *on-flow*, deve-se levar em consideração a taxa de fluxo necessária para melhor resolução cromatográfica e ganho na sensibilidade no RMN, ou seja a vazão ideal é aquela que proporciona a melhor resolução cromatográfica e tempo suficiente para obtenção de espectros com boa relação sinal-ruído (LEVSEN et al., 2000, EXARCHOU et al., 2005).

Normalmente, o modo *on-flow* é utilizado para determinar os principais compostos de uma mistura complexa. O principal agravante deste modo é a aquisição de dados de RMN dos compostos minoritários, pois o tempo de residência na cela é insuficiente para realização de experimentos longos. Outra desvantagem do modo *on-flow* ocorre quando é utilizado gradiente na fase móvel para separação cromatográfica, pois os deslocamentos químicos sofrem interferência da composição dos solventes e variam continuamente à medida que os espectros são adquiridos (GRIFFITHS, 1995), além de ser necessário a utilização de pelo menos um solvente deuterado na mistura de solventes utilizados.

Visando minimizar a desvantagem do modo *on-flow* no que diz respeito à aquisição de experimentos de RMN 2D, cujos tempo de aquisição não permitem a realização, alguns trabalhos têm sido relatados, como é o caso reportado recentemente por QUEIROZ-JÚNIOR et al., 2012, que aplicaram a técnica *Ultrafast NMR* aliada à cromatografia no modo *on-flow* para adquirir mapas de correlação gCOSY em uma mistura de compostos orgânicos conhecidos. Outro exemplo de

aquisição de experimentos 2D no modo *on-flow*, foi proposto por ZHOU et al. (2007), que demonstraram a aquisição de dados em tempo real de espectros de RMN 2D (TOCSY) baseando-se no esquema de Hadamard. Esses trabalhos mostram que a aquisição de experimentos 2D é possível utilizando o modo *on-flow*, tornando viável a utilização da técnica para identificar compostos oriundos diretamente da corrida cromatográfica, reacendendo o uso da técnica há muito em desuso.

1.6.2 Modo *Stopped-flow*

No modo *stopped-flow* a corrida cromatográfica é interrompida após um tempo de transferência definido, de modo que a banda cromatográfica de interesse fica localizada na cela do RMN para a realização dos experimentos. Dessa forma, experimentos 1D e 2D podem ser realizados por várias horas. Se o fluxo é parado num intervalo menor que 2 horas, não é observado alargamento dos picos cromatográfico devido à difusão, no entanto, após este tempo, pode haver perda de resolução, especialmente se a corrida estiver em condições de separações isocráticas (LEVSEN et al., 2000). Após a aquisição de dados de RMN, a corrida cromatográfica é reiniciada e o processo é repetido para o próximo analito. É importante deixar claro que paradas frequentes também podem comprometer a qualidade da separação e compostos muito concentrados podem contaminar a cela em fluxo, causando o efeito memória (EXARCHOU et al., 2005). Além disso, nessa modalidade também é necessário o uso de pelo menos um solvente deuterado.

De modo geral, *stopped-flow* é recomendado para análises de misturas constituídas por poucos constituintes e com uma boa resolução cromatográfica. A combinação do modo *on-flow* e *stopped-flow* tem sido amplamente utilizada na análise de produtos naturais (EXARCHOU et al., 2005).

Muitos estudos têm sido realizados ressaltando a importância da combinação das técnicas LC-NMR e LC-MS-NMR. Um exemplo disso, é o trabalho realizado por DURAND et al. (2012), que analisaram um herbicida pertencente à família das tricetonas, conhecido como mesotriona, amplamente utilizado no combate à ervas daninhas. No entanto, esse composto apresenta poucos estudos acerca de suas vias de biodegradação e destino no meio ambiente. Com base nesse problema foi realizado um monitoramento através do LC-NMR utilizando o modo *stopped-flow* para determinar a rota de biodegradação completa da mesotriona por uma estirpe de bactéria *Bacillus* sp. A partir dos experimentos de RMN obtidos no modo *on-flow*, foi

possível a determinação inequívoca de dois produtos inéditos de transformação da mesotriona. Além disso, os autores afirmam que foi possível a quantificação de cada metabólito por RMN, mesmo sem a presença de um composto de referência.

PAWLUS et al. (2013) também lançaram mão das hífenações LC-NMR e LC-MS-NMR, fazendo um estudo monitorado do fracionamento de vinho, com o objetivo de identificar estilbenoides há muito não relatados na literatura. Os dados obtidos de ambas as técnicas permitiram a caracterização de quatro estilbenoides não identificados em vinho anteriormente. Demonstrando a importância das técnicas hífenadas no acompanhamento do fracionamento de compostos de interesse.

Sistemas hífenados como LC-NMR são ideais para análise de compostos sensíveis e instáveis, pois são totalmente automatizados, evitando contato e exposição do analito. Um exemplo disso, foi o trabalho realizado por TODE et al. (2009), que analisaram suco de tomate, óleo de palma e suco de laranja com o objetivo de caracterizar os tipos de carotenoides. Os materiais brutos foram extraídos com um solvente orgânico e analisados no modo *stopped-flow*, após um simples pré-tratamento. Três, quatro e dois tipos de carotenoides foram identificados para o suco de tomate, óleo de palma e suco de laranja, respectivamente.

Esses resultados comprovam a utilidade da técnica para análise de compostos frágeis e sensíveis à luz e ao ar.

1.6.3 Modo *Loop Storage*

No modo *loop storage*, ou armazenamento em capilares cíclicos (*loop*) a corrida cromatográfica não é interrompida, e os picos cromatográficos de interesse são armazenados em um *loop* individual para posterior aquisição dos dados de RMN. Através desse procedimento, o manuseio das amostras é minimizado, permitindo a transferência da amostra ao RMN sem a presença de ar ou luz e sem manipulação dos operadores (EXARCHOU et al., 2005). Também nesse caso, e nessa modalidade, é necessário o uso de pelo menos um solvente deuterado.

Neste caso, o atraso da amostra (*delay time - t_d*), que corresponde ao tempo necessário para transportar o analito do detector UV até o dispositivo de armazenamento (*loop*), deve ser calibrado. Ao se utilizar esse modo de operação, deve-se levar em consideração a estabilidade do analito, pois serão armazenados por longos períodos antes e durante as análises por RMN. Após as medidas necessárias, o *loop* e cela de fluxo são lavados com solventes apropriados automaticamente. Como

nem sempre é possível prever a estabilidade da amostra em estudo, este método não é muito recomendado para matrizes desconhecidas (EXARCHOU et al., 2005).

1.6.4 LC-SPE-NMR

Embora haja vantagens no modo *on-flow* e *stopped-flow* no uso do RMN como detector em tempo real, a sensibilidade e a resolução obtidas nos espectros são limitadas pelo curto tempo de residência dos analitos na cela de fluxo (ALBERT, 2004). Isso limita todo o potencial da técnica LC-NMR em fornecer subsídios para uma completa e inequívoca elucidação estrutural. Uma solução para aumentar a sensibilidade de detecção e resolver este problema, consiste em introduzir um sistema de Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) entre o LC e o RMN (LC-SPE-NMR), a fim de reter e acumular os compostos nos cartuchos de SPE (SEGER et al., 2005; TATSIS et al., 2007).

O sistema de SPE é uma poderosa técnica que visa concentrar as amostras de interesse após a separação cromatográfica, onde os compostos selecionados são retidos em cartuchos individuais após a coluna. O processo de retenção nos cartuchos confere a esta técnica o diferencial de proporcionar um ganho de sensibilidade em relação a outras hifenções da cromatografia com RMN. O sistema de SPE também permite repetições da corrida cromatográfica para somar o conteúdo de amostra depositada nos cartuchos, aumentando consideravelmente a relação sinal/ruído dos espectros adquiridos, mesmo de compostos pouco concentrados. Além dessas vantagens, a técnica LC-SPE-NMR é mais viável do ponto de vista econômico em comparação ao LC-NMR, pois na separação cromatográfica utiliza solventes grau HPLC, não sendo necessário a utilização de um solvente deuterado. O solvente deuterado somente é utilizado na etapa de extração dos compostos presentes no cartucho.

O primeiro estudo realizado utilizando o sistema automatizado LC-SPE-NMR foi a análise de um extrato de orégano grego (EXARCHOU et al., 2003), onde seis compostos foram identificados e com base nesses resultados, os autores afirmaram que o sistema era de fato promissor e que oferecia uma vantagem considerável com relação ao aumento da sensibilidade.

Recentes trabalhos reforçam o sistema LC-SPE-NMR como uma plataforma poderosa no isolamento e identificação de compostos em produtos naturais e áreas afins. XU et al. (2012) usaram essa hifenção para estudar o extrato da planta *Ormocarpum kirkii*, com o objetivo de identificar os constituintes minoritários.

Como resultado, o autor relata o isolamento de oito compostos inéditos, dentre uma série de isoflavanonas, biflavanonas e biscumarinas.

Outro trabalho recentemente publicado foi o isolamento e identificação de quatro pirazinonas inéditas, denominadas de giovaninona A-D, esses compostos foram isolados a partir do extrato uma cultura de estirpe marinha derivada de *Streptomyces* (THOMASI et al., 2014).

2.0 OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

- Utilizar a técnica SNIF-NMR para obtenção da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$, a fim de identificar possíveis adulterações nos méis comercializados como de abelhas sem ferrão (*M. seminigra* e *M. interrupta*), seja através da comercialização de méis de *Apis mellifera* como *Melipona*, ou adição de açúcar de cana-de-açúcar na alimentação das abelhas.
- Analisar os dados de RMN de ^1H através da quimiometria, aplicando os métodos de análise exploratória, com o objetivo de verificar a diferença entre méis padrões (origem conhecida) e comerciais, detectando possíveis adulterações e a influência do efeito da sazonalidade e/ou de diferentes espécies.
- Identificar e caracterizar os constituintes químicos minoritários existentes nos méis de *M. seminigra* e *M. interrupta*, utilizando a técnica hifenada LC-SPE/NMR e LC-BPSU/NMR.

3.0 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.0 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1 Coleta e obtenção dos méis

Amostras de méis originais de *Melipona seminigra* e *M. interrupta* foram coletadas em dois períodos do ano e de várias colônias, provenientes das colmeias manejadas do Grupo de Pesquisas em Abelhas (GPA) - Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA) (Figura 3.1). As amostras comerciais foram compradas em vários pontos de venda na cidade de Manaus-AM e um (1) deles em Santarém-PA. Os méis autênticos foram retirados dos potes das melgueiras com auxílio de uma seringa descartável e acondicionados em frascos de polietileno, com tampa rosqueada (capacidade de 50 mL). O material foi transportado até o laboratório de Ressonância Magnética Nuclear – UFSCar e mantido sobre refrigeração.



Figura 3.1. Coleta de méis no meliponário do INPA

3.2 Preparo das amostras e aquisição de dados para análise da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$

A obtenção de um espectro de RMN de ^2H em amostras constituídas majoritariamente de carboidratos, como o mel, é muito difícil, pois o espectro mostra-se complexo e com muitos sinais sobrepostos. No entanto, quando o carboidrato é fermentado, a distribuição isotópica do etanol obtido se mantém a mesma da molécula que o originou (ZHANG et al., 1995). Dessa forma, como o espectro de RMN de ^2H do etanol é mais simples que o da amostra original e mantém as informações a respeito da fonte do açúcar (CROSS et al., 1998), os méis então foram fermentados de acordo com a metodologia descrita a seguir e o etanol resultante analisado por RMN.

3.2.1 Fermentação dos méis e preparo das amostras

A fermentação dos méis foi feita em *Erlenmeyer* (500 mL) utilizando-se 10 g de mel; 5 g de fermento biológico seco *Saccharomyces cerevisiae*, da marca *Fleischmann*[®] e 60 mL de água destilada. A fermentação ocorreu por 48h, em temperatura ambiente. Após esse período, todo o material resultante da fermentação foi submetido a uma destilação fracionada, utilizando-se uma coluna de *Vigraux* de 55 cm de comprimento.

As amostras foram constituídas por 600 μL de etanol e 100 μL de tetrametiluréia (TMU) 99%, com conteúdo isotópico conhecido (abundância natural). Esses volumes foram utilizados com o objetivo de obtermos os sinais de ^1H da metila do etanol e do TMU relativamente na mesma intensidade (1:1).

3.2.2 Aquisição dos espectros de RMN de ^2H e ^1H

Os espectros de RMN de ^1H foram realizados no espectrômetro Bruker Avance III – 9,4 Tesla (400 MHz para ^1H) equipado com a sonda multinuclear SmartProbe[™] (5 mm), com gradiente de campo em z (50 G/cm) e uma unidade de ajuste automático da sintonia - ATMA (*Automatic Tuning and MAtching*). A sequência de pulsos utilizada para aquisição dos dados de ^1H consistiu de um único pulso com ângulo de rotação de 90° (*zg* - Bruker). O experimento foi realizado sem giro e com controle da temperatura da amostra em 300 K. Os parâmetros utilizados na aquisição estão descritos na tabela 3.1. Finalizada a aquisição dos dados, estes foram processados aplicando-se uma transformada de *Fourier* com 65.536 pontos, e uma correção automática da fase e da linha.

Os espectros de RMN de ^2H foram obtidos logo após os de ^1H , também no espectrômetro Bruker Avance III equipado com a mesma sonda utilizada nos experimentos de ^1H . A sequência de pulsos utilizada consistiu de um único pulso no canal do ^2H (*zg2h* - Bruker); os parâmetros utilizados na aquisição desse experimento estão listados na tabela 3.2.

Para a realização deste experimento foi necessário fazer algumas modificações nas posições dos cabos na entrada do pré-amplificador do espectrômetro de RMN, que consistiu em trocar a posição do cabo do canal BB para o canal do ^2H , deixando o cabo do ^2H desconectado. No programa que gerencia o espectrômetro também foi preciso fazer ajustes na configuração da rota de transmissão do pulso, no caso da Bruker isso é feito através do recurso “*edasp*

setpreamp". No processamento foi aplicada uma transformada de *Fourier* utilizando-se 8951 pontos, com fator de alargamento de linha (*Line Broadening* ou *LB*) de 3,0 Hz. A fase e a linha de base foram corrigidas automaticamente.

Os espectros de ^2H foram adquiridos com o sistema de *lock* desligado, este procedimento está incluído na automação da sequência de pulso. Além disso, optou-se por não acrescentar D_2O na amostra, uma vez que quando foi acrescentado houve uma grande perda no ganho do receptor (RG), aumentando consideravelmente o tempo do experimento. Dessa forma, para o ajuste da homogeneidade do campo magnético utilizou-se um capilar contendo $\text{D}_2\text{O}/\text{TSP} - d_4$, sendo retirado antes da aquisição dos dados de RMN de ^2H . Todos os experimentos foram realizados em triplicata experimental.

Tabela 3.1. Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de RMN de ^1H e ^2H

Parâmetro (nomenclatura Bruker)	^1H	^2H
N.º de pontos do domínio de tempo (TD)	65536	89512
Janela espectral (SW)	12 ppm	12 ppm
Tempo de aquisição (AQ)	6,8 s	5,6 s
N.º de promediações (NS)	8	6k
Duração do pulso de 90° (P1)	8,45 μs	107,5 μs
Frequência central do pulso (O1p)	4,8	4,8
Tempo de relaxação (D1)	1 s	2,5 s
Tempo de atraso antes da aquisição (DE)	6,5 μs	10,5 μs
Ganho do receptor (RG)	1	5,6
Potência (PLW1)	10 W	20 W
Temperatura (TE)	300 K	300 K

3.3 Cálculo da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$

Inicialmente foi necessário calcular a massa real de etanol no tubo de RMN, para isso utilizou-se o valor da concentração de etanol calculado a partir da área de integração dos sinais de ^1H da metila do etanol e do padrão, onde o sinal do TMU foi calibrado para 1.

A concentração de etanol pode então ser calculada utilizando-se a equação 2.

$$C_x = C_s \frac{N_s A_x}{N_x A_s} \quad (2)$$

Onde:

C_s e C_x : Concentração do padrão e de etanol, respectivamente.

N_s e N_x : Número dos hidrogênios das metilas do padrão e do etanol, respectivamente.

A_s e A_x : Área dos sinais de RMN para as metilas do padrão e do etanol, respectivamente.

Através do valor da massa de etanol encontrada no tubo a partir da fórmula descrita anteriormente e as áreas de integração dos sinais do padrão e de etanol, foi possível calcular a relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ dos méis analisados com base na equação 1.

3.4 Preparo das amostras e aquisição de dados para análise quimiométrica

As amostras foram preparadas em triplicata, diluindo-se 200 mg de mel em 500 μL de D_2O em solução de 0,2% do sal TSP- d_4 . Os espectros de RMN de ^1H foram realizados no espectrômetro Bruker Avance III – 9,4 Tesla, com frequência de 400 MHz para ^1H . Este equipamento possui uma sonda multinuclear *SmartProbe*TM para tubos com diâmetro de 5 mm, sendo equipada com uma bobina de gradiente de campo no eixo z (50 G/cm) e uma unidade de ajuste automático da sintonia - ATMA (*Automatic Tuning and MAtching*). Esse espectrômetro ainda dispõe de um amostrador automático que foi utilizado para análise sequencial das amostras. A sequência de pulsos utilizada para aquisição dos espectros de RMN de ^1H consiste de dois pulsos de 90° , com pré-saturação do sinal da água durante o tempo de relaxação e tempo de mistura, e aplicação de dois gradientes (*noesygppr1d* - Bruker) (Figura 3.2), a fim de realizar a seleção de coerência, e aumentar a eficiência da pré-saturação. Os experimentos foram realizados sem giro e, após a aquisição os espectros foram processados aplicando-se uma transformada de *Fourier* com 65536 pontos e uma multiplicação exponencial para tratamento dos sinais (*lb*) por um fator de 0,3 Hz. Os parâmetros utilizados na aquisição dos espectros de RMN de ^1H estão listados na tabela 3.

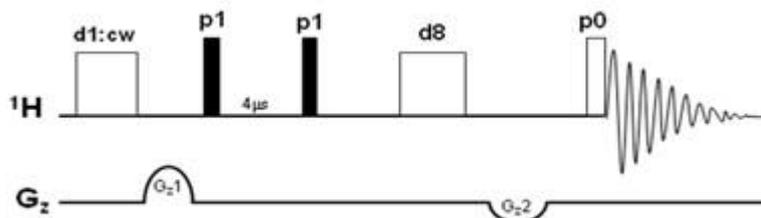


Figura 3.2. Representação gráfica da sequência de pulsos do experimento de ^1H com pré-saturação do sinal da água (*noesygppr1d*).

Tabela 3.2. Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos 1D de hidrogênio.

Parâmetro (nomenclatura Bruker)	Valor
N.º de pontos do domínio de tempo (TD)	65536
Janela espectral (SW)	20 ppm
Tempo de aquisição (AQ)	3,9 s
N.º de promediações (NS)	128
Duração do pulso de 90° (P1)	8,2 μs
Frequência central do pulso (O1)	4,8
Tempo de relaxação (D1)	2,5 s
Tempo de mistura (D8)	150 ms
Ganho do receptor (RG)	8
Potência (PLW1)	10 W
Temperatura (TE)	298 K
Amplitude do gradiente G_{z1}	50%
Duração do gradiente G_{z1}	1000 μs
Amplitude do gradiente G_{z2}	10%
Duração do gradiente G_{z2}	1000 μs

Para as análises exploratórias de PCA, os espectros foram calibrados em relação ao sinal de referência (TSP- d_4) e outros ajustes foram realizados no modo de integração disponível no programa AMIX[®]. A matriz de dados original foi processada a fim de se obter a área de cada região do espectro no intervalo de 0,04 ppm (*bucket window*) através do programa Amix 3.0.

As intensidades absolutas dos sinais foram usadas para integração das áreas dos *buckets*, que foram normalizados em relação à área total dos *buckets*. As áreas de cada *bucket* foram então utilizadas como variáveis de entrada nas análises

quimiométricas, reduzindo assim o ruído e obtendo-se uma nova matriz. A janela espectral utilizada foi de 10- 0,5 ppm. O sinal residual da água foi removido da matriz, bem como o sinal do padrão interno TSP-d₄, para não interferir na análise. Para a análise por componentes principais (PCA) dos espectros de ¹H todos os dados foram autoescalados.

3.5 Análise dos constituintes dos méis por LC-SPE/NMR

3.5.1 Preparo das amostras através de partição líquido-líquido.

Para as análises dos constituintes dos méis foram realizados dois métodos de pré-tratamento das amostras, inicialmente foi testada uma partição líquido-líquido. A sequência dos solventes utilizados na partição pode ser visualizada na figura 3.3. Os solventes foram evaporados em evaporador rotativo. As massas do material de partida e das frações obtidas podem ser observadas na tabela 3.3.

O segundo método que será tratado posteriormente foi extração por SPE (*solid phase extraction*) utilizando *Manifold* com cartuchos de fase estacionária HLB (500 mg) e XAD-2 (300 mg)

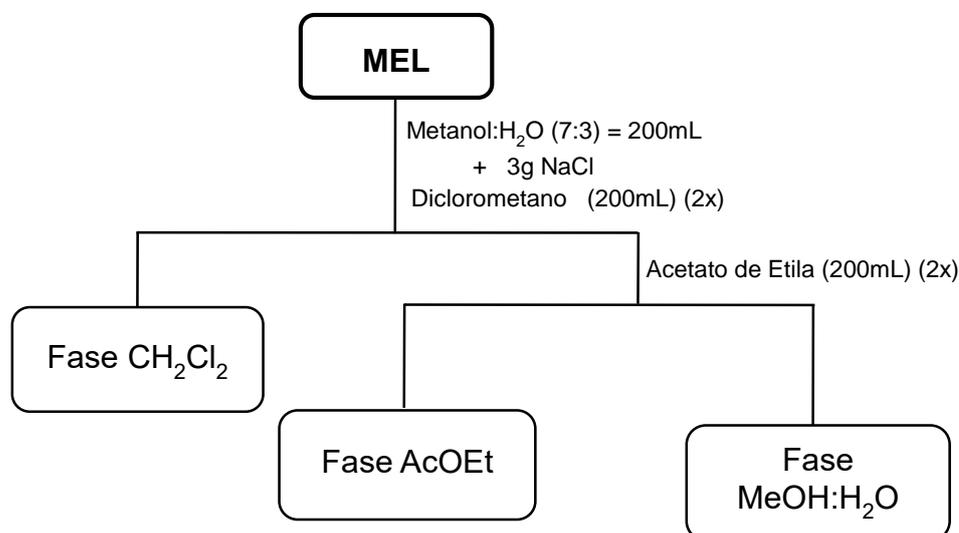


Figura 3.3. Representação esquemática da partição líquido-líquido realizada nos méis de *M. seminigra* e *M. interrupta*

Após a secagem dos solventes, as amostras foram preparadas solubilizando-se cada fase em Metanol:H₂O (50:50) e filtradas em membranas PVDF Tedia de 0,45 µm. Os solventes utilizados nas análises foram todos grau HPLC (Tedia).

Tabela 3.3. Massas do material de partida e das frações obtidas da partição líquido-líquido

Amostra (mel)	Material de partida	Fase CH ₂ Cl ₂	Fase AcOEt
<i>Melipona interruptata</i> (MI-05)	34 g	0,58 g	0,72 g
<i>Melipona seminigra</i> (MS-BR)	74 g	1,8 g	4,1 g

3.5.2 Preparo das amostras através de extração em fase sólida (SPE) *off line*.

Outra alternativa utilizada na tentativa de eliminar os açúcares presentes nas amostras de mel, foi uma microextração utilizando a Extração em Fase Sólida (SPE). A metodologia foi baseada no trabalho de MICHALKIEWICZ (2008), no qual testou diversos tipos de fase estacionária nos cartuchos. Dessa forma, com base nesses resultados, optou-se pela utilização dos cartuchos de fase estacionária polimérica Oasis HLB (500 mg) e XAD-2 (300 mg). As amostras de méis (5 g para HLB e 3 g para XAD-2) foram misturadas com água deionizada (Milli-Q) ajustada com pH= 2 (HCl), essa mistura foi agitada por 2 min em um agitador tipo vórtex.

A extração foi realizada no sistema de *Manifold* à vácuo, onde as amostras foram passadas através dos cartuchos, e em seguida lavadas com 20 mL de água deionizada para remoção de açúcar. Os compostos adsorvidos na fase estacionária foram eluídos dos cartuchos com metanol (10 mL). O procedimento foi realizado em meio ácido e básico para avaliação dos compostos retidos, como pode ser melhor visualizado na figura 3.4. O mesmo procedimento de limpeza foi realizado com cartucho de XAD-2, no entanto, a massa de mel utilizada em cada cartucho nesse caso foi de 3 g, e no condicionamento e equilíbrio utilizou-se 3 mL de MeOH e 6 mL de H₂O (pH 2), respectivamente.

O extrato resultante foi concentrado à pressão reduzida em evaporador centrífugo a 40°C (sistema *SpeedVac™*) e filtrado com filtro de membrana de 0,45 µm.

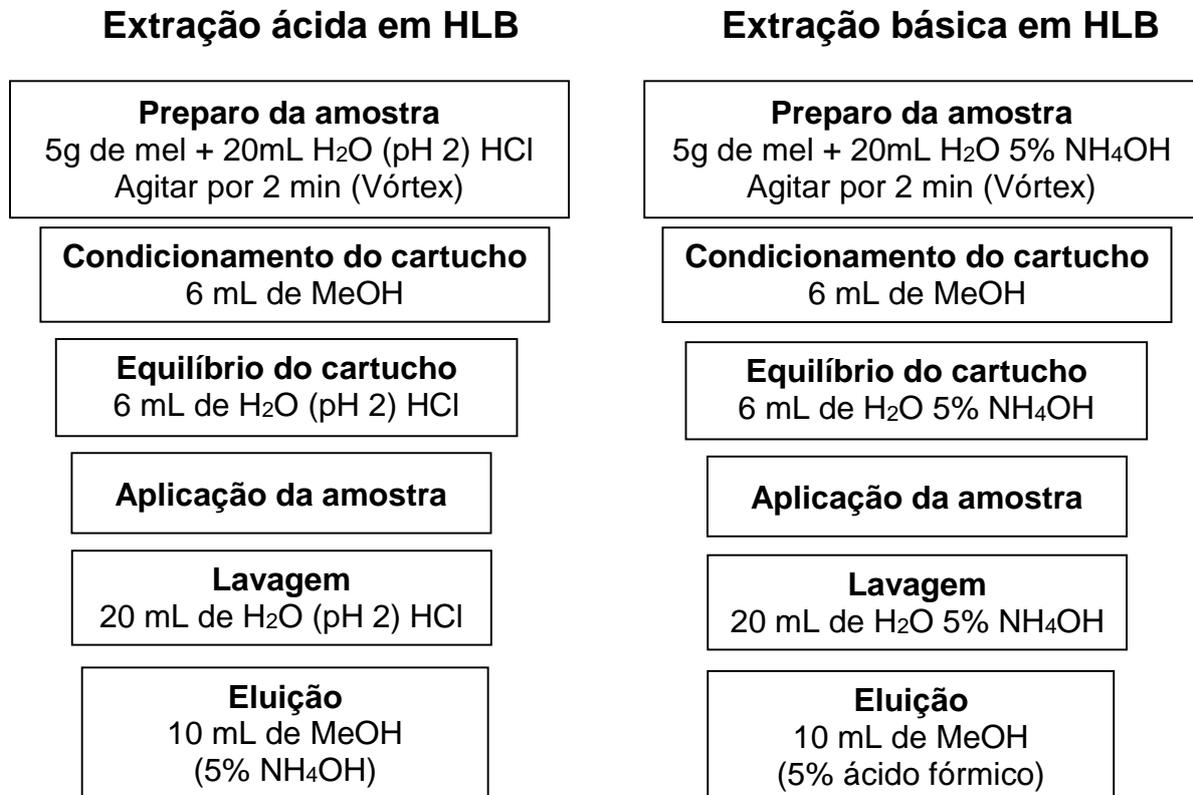


Figura 3.4 Representação esquemática da extração em fase sólida (SPE) realizada nos méis de *M. seminigra* e *M. interrupta*.

3.5.3 Uso de padrão interno para verificar a eficiência do método de extração por SPE

O padrão interno utilizado (naringina) foi adquirido da Sigma-Aldrich e a solução estoque foi preparada na concentração de 5mg.mL⁻¹. O primeiro procedimento foi a aplicação no LC do padrão interno na concentração de 40 µg.mL⁻¹. Em seguida, a matriz foi fortificada com o padrão interno, de modo que a concentração final de naringina fosse também de 40 µg.mL⁻¹. A área dos picos cromatográficos foi integrada e então calculado a taxa de recuperação do composto padrão. Esse procedimento foi realizado em triplicata.

3.5.4 Sistema LC-SPE/NMR

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência AGILENT TECHNOLOGIES 1200 SERIES, contendo uma bomba quaternária com degaseificador G1322A, um detector ultravioleta com arranjo de diodos (UV-DAD) G1315D e um auto injetor G1329A. Acoplado ao cromatógrafo encontra-se a interface PROSPEKT 2, que é o sistema de extração em fase sólida (SPE), que pode fazer a conexão com o RMN, mas neste trabalho optou-se por trabalhar sem essa parte da hifenação.

A interface Prospekt 2 é constituída por:

- Uma bomba (Knuer – K120) responsável em modificar a proporção de solvente orgânico da fase móvel oriunda da coluna cromatográfica;
- O organizador onde ficam os frascos com solventes deuterados e não deuterados usados nos cartuchos de SPE;
- Uma unidade trocadora automática de cartuchos (*ACE- Automatic Cartridges Exchanger – LC-SPE-NMR Interface*), responsável em transportar automaticamente os cartuchos em direção ao fluxo da fase móvel que contém os compostos selecionados;
- A Unidade de *Stopped-flow* (BSFU-HP – *Bruker Stopped Flow Unit – High Performance*) e válvulas VALCO.

De modo geral, o sistema de LC-SPE-NMR funciona da seguinte forma, após a corrida cromatográfica e análise dos componentes de interesse por UV-DAD, o fluxo de saída da coluna é desviado por uma válvula, ao mesmo tempo em que a bomba *Knauer* é acionada. Essa bomba é ajustada para fornecer uma proporção maior de água no fluxo (3 vezes), diminuindo assim a força de eluição dos compostos na fase móvel original, dessa forma ao passar pela fase estacionária dos cartuchos, os compostos tendem a ficar retidos.

As fases estacionárias dos cartuchos são constituídas de diversos tipos de material, a mais utilizada e capaz de reter uma grande variedade de compostos é a *General Phase* (*Hysphere™- resin*, 10 mm x 2 mm, 10 µm) (CLARKSON et al., 2007), composta de uma resina polimérica de polidivinilbenzeno e formato esférico. Este tipo de material constitui uma única bandeja com 96 cartuchos, justamente por cobrir uma ampla faixa de polaridade. Quando se pretende desenvolver métodos

testando outros tipos de cartuchos, pode-se utilizar a bandeja que contém oito fases estacionárias diferentes, cada fase com oito colunas, conforme mostra a tabela 3.4.

Tabela 3.4. Fases estacionárias dos cartuchos de SPE - Hysphere™.

Coluna	Fase estacionária
1	Hysphere™- <i>resin</i> CN -SE, 10 mm x 2 mm, 7 µm, fase estacionária cianopropil
2	Hysphere™- <i>resin</i> C2 -SE, 10 mm x 2 mm, 7 µm, fase estacionária etil
3	Hysphere™- <i>resin</i> C8 EC-SE, 10 mm x 2 mm, 10 µm, fase estacionária octil <i>end capped</i>
4	Hysphere™- <i>resin</i> C18 HD, 10 mm x 2 mm, 10 µm, fase estacionária octadecil <i>High Density</i>
5	Hysphere™- <i>resin</i> GP - <i>General Phase</i> , 10 mm x 2 mm, 10 µm, fase estacionária polidivinilbenzeno
6	Hysphere™- <i>resin</i> SH - <i>Strong Hydrophobic</i> , 10 mm x 2 mm, 35 µm, fase estacionária polidivinilbenzeno
7	Hysphere™- <i>resin mixed mode cation</i> , 10 mm x 2 mm, 10 µm
8	Hysphere™- <i>resin mixed mode anion</i> , 10 mm x 2 mm, 10 µm

O controle do cromatógrafo foi realizado através do programa HyStar versão 3.2. Este programa apresenta seis formas diferentes de desviar o fluxo da fase móvel em direção ao cartucho que será usado para reter o composto de interesse. No entanto, optou-se por utilizar somente duas modalidades de seleção de compostos, conhecidas como *threshold* e *time slice*, a primeira realiza a seleção pela intensidade da banda, e na segunda modalidade a seleção é realizada selecionando-se o tempo de retenção do analito. No modo *threshold*, ajusta-se a intensidade de absorção no detector UV-DAD e o intervalo de tempo, de modo que os picos de interesse estejam dentro dessa faixa. Quando o detector ultrapassa esse valor estipulado de absorção, o sistema direciona o fluxo do descarte para o cartucho condicionado e equilibrado, após a intensidade do sinal diminuir novamente, o fluxo volta a ser direcionado para o descarte. Esse modo de operação apresenta a vantagem que se o tempo de retenção (t_R) dos compostos varia entre uma corrida e outra, o intervalo equivalente ao pico

sempre será direcionado ao cartucho. Nesse sistema, a possibilidade de injeções múltiplas leva ao isolamento de compostos com considerável grau de pureza.

O outro modo de seleção de compostos, chamado *time slice*, oferece a opção de selecionar intervalos de tempo específicos durante a corrida cromatográfica. Esse modo oferece a vantagem de retenção de compostos que não apresentam absorção na região do UV, uma vez que independe de intensidade de absorção. Apesar dessa vantagem, esse modo está susceptível a variações no tempo de retenção dos compostos, o que pode levar a uma mistura de compostos, isso porque não disponibilizamos de um forno para controlar a temperatura e manter a resolução cromatográfica.

Após a retenção dos compostos de interesse nos cartuchos, estes foram secos com nitrogênio gasoso por 30 minutos, e eluídos com solventes deuterados (250 μ L) diretamente para tubos de RMN de 2,5 mm.

3.5.5 Sistema LC-BPSU/NMR

Outro modo de operação do cromatógrafo corresponde ao acoplamento com a unidade BPSU. Essa unidade consiste de 36 *loops*, capazes de acomodar as frações oriundas de uma separação cromatográfica. Neste caso, também é possível utilizar os modos de operação que o *software Hystar* oferece, no entanto, da mesma forma que optamos pela utilização somente da modalidade *Threshold* e *Time Slice* no uso do SPE (Prospekt 2), aqui também foram utilizados somente esses dois modos de seleção de picos. Essa interface, BPSU, oferece a vantagem de não haver perdas dos analitos selecionados de uma corrida cromatográfica, mas também apresenta a necessidade de realizar a concentração dos picos manualmente, uma vez que essa interface não foi idealizada para concentrar os compostos de interesse.

3.5.6 Equipamento de RMN

As análises foram realizadas num espectrômetro Bruker Avance III – 14,1 Tesla, com frequências para ^1H e ^{13}C iguais a 600,23 MHz e 150,93 MHz, respectivamente. Equipado com uma sonda criogênica TCI (*Triple-resonance Cryprobe Inverse*) de 5 mm, na qual as bobinas de ^1H e ^{13}C e o pré-amplificador são refrigerados por hélio, permitindo um aumento significativo da sensibilidade, que nesse caso é 4 vezes maior em comparação a sensibilidade das sondas convencionais. Esta sonda possui uma bobina de gradiente de campo no eixo z (53

G/cm) e uma unidade de ajuste automático da sintonia - ATMA (*Automatic Tuning and MAtching*).

3.6 Materiais e Equipamentos em geral

- Ácido trifluoracético (TFA). HPLC, TEDIA BRAZIL, LOT# 1011342
- Balança analítica digital Bioprecisa modelo FA-2104N, com precisão de 0,1 mg.
- Coluna cromatográfica - Zorbax Eclipse XDB C18 (5 µm, 15 cm x 4,6 mm);
- Coluna cromatográfica - ProntoSIL C18 (5 µm, 25 cm x 4,6 mm);
- Filtro de membrana - (PVDF *Membrane Syringe Filter*, TEDIA BRAZIL, 25 mm, 0,45 µm);
- Cartucho de SPE Oasis HLB Waters® (6 cc Vac Cartridge, 500 mg, 60 µm);
- Cartuchos de SPE Amberlite® XAD-2 (300 mg, 3mL);
- Solventes
 - Acetonitrila - grau HPLC. TEDIA BRAZIL
 - Metanol - grau HPLC. TEDIA BRAZIL.
 - Acetonitrila deuterada – ACN-*d*3, Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (CIL) D, 99,8%.
 - Metanol deuterado – MeOD-*d*4, Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (CIL) D, 99,8%.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Coleta e obtenção dos méis

Foram realizadas três visitas ao Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA) para realização das coletas. As visitas foram programadas de modo que contemplássemos os dois períodos climáticos do ano que ocorre na região amazônica, que são os períodos seco e chuvoso.

Na tabela 4.1 é possível observar os méis de *M. interrupta* e *M. seminigra*, que foram coletados nas caixas manejadas do INPA, classificados como mel autêntico, pois se conhece tanto a origem quanto a autenticidade dos mesmos. Cada amostra está codificada com o número da caixa que foi coletada. É possível notar a nomenclatura diferenciada das amostras MI-BR e MS-BR, que como já citado, também foram coletadas no INPA, no entanto, foram levadas a este meliponário na semana da coleta, essas caixas eram oriundas de outro meliponário localizado na comunidade Brasileirinho (Manaus-AM). Da mesma forma aconteceu com a amostra MS-BV, que foi transportada do município de Boa Vista do Ramos – AM.

É importante ressaltar a dificuldade de coleta dos méis principalmente na época de chuva (dezembro-abril), pois as abelhas ficam impossibilitadas de ir para campo coletar néctar e pólen, por isso a produção de mel cai drasticamente, como é possível observar na tabela 4.1. Na coleta realizada em março/12 foi encontrada somente uma caixa com mel suficiente para coleta de cada espécie, pois quando a colmeia está com pouco mel maduro, ficamos impedidos de coletar para não deixar as abelhas sem alimento e assim causar a morte da colmeia.

As amostras comerciais foram obtidas de vários pontos de venda da cidade de Manaus, como descreve a tabela 4.1. Apesar do comércio de méis de meliponíneos estar crescendo cada vez mais na região, ainda encontramos dificuldade em adquirir esses méis. Essa escassez ocorre principalmente no período chuvoso, pois os meliponilcultores temem pela integridade de suas colmeias. Devido a esses fatores, foi possível a aquisição de somente dez amostras comerciais.

Tabela 4.1 Amostras originais coletadas no INPA e comerciais adquiridas na região

Espécie	Amostra	Volume (mL)	Período da coleta ou Local da compra
<i>Melipona interrupta</i>	MI-07	13	Seco (ago/10)
	MI-39	50	Seco (ago/10)
	MI-BR1	45	Seco (ago/11)
	MI-BR2	35	Seco (ago/11)
	MI-21	5	Chuvoso (jan/11)
	MI-305	5	Chuvoso (jan/11)
	MI-05	45	Chuvoso (mar/12)
<i>Melipona seminigra</i>	MS-BV	10	Seco (ago/10)
	MS-162	20	Seco (ago/10)
	MS-BR	50	Seco (ago/11)
	MS-BR1	40	Seco (ago/11)
	MS-142	8	Chuvoso (jan/11)
	MS-188	5	Chuvoso (jan/11)
	MS-162c	35	Chuvoso (mar/12)
<i>Mel comercial</i>	MS-A	300	Mercado Municipal de Manaus-Centro
	MS-B	300	Mercado Municipal de Manaus-Centro
	MS-C	300	Mercado Municipal de Manaus-Centro
	MS-D	500	Feira do Produtor-Cidade Nova I
	MS-E	250	Associação dos criadores de abelhas do AM
	MS-F	300	Lanchonete do Bosque da Ciência-INPA
	MS-G	500	Comércio de Santarém-PA
	MS-H	250	Mercado Municipal de Manaus-Centro
	MS-I	250	Mercado Municipal de Manaus-Centro
	MS-J	100	Mercado Municipal de Manaus-Centro

4.2 Análise da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$

Alguns testes foram necessários para realização desse experimento, no que diz respeito à configuração do equipamento (*hardware* e *software*), pois em setembro/2011 o espectrômetro passou por uma atualização para o modelo AVANCE III, até então era AVANCE. Dessa forma, foi necessário testar (desenvolver, configurar) e otimizar o experimento de ^2H para essa nova configuração.

A primeira tentativa para implementação foi fazer a aquisição utilizando o próprio canal do deutério para pulsar e adquirir, no entanto o resultado não foi satisfatório, pois o canal do ^2H é normalmente utilizado para fazer a correção do *drift* do campo magnético e não tem capacidade para suportar potências muito elevadas. Isso resultou em um tempo de aquisição do experimento muito prolongado (48h), o que inviabilizou o uso desse procedimento.

A outra metodologia testada consiste no uso do canal do BB no amplificador para geração do pulso e a aquisição pelo canal do ^2H . Como no canal do XBB há um filtro de deutério (filtro de passa-baixa), é necessário fazer algumas modificações nos cabos de entrada do pré-amplificador para desviar o caminho eletrônico desse filtro, que consiste na troca da posição do cabo do canal XBB para o canal do ^2H , deixando o cabo do ^2H desconectado. Com isso, se gera o pulso no amplificador usando o XBB, e no pré-amplificador utiliza-se o canal do deutério para aquisição. Mesmo tendo encontrado resultados melhores usando essa configuração, com atenuação da potência de 120 dB (pL9) e tempo de experimento de 13h (ns=6k), a duração do pulso de 90° foi otimizada para 107,5 μs . Isso porque o canal do ^2H não suporta valores maiores de potência, sendo necessário um maior intervalo de pulso.

Utilizou-se a metodologia descrita acima para aquisição dos espectros de RMN de ^2H dos etanóis obtidos dos méis autênticos e comerciais. As figuras 4.1 e 4.2 mostram um exemplo de espectro de RMN de ^1H e ^2H , respectivamente, de um mel comercial. No espectro de ^1H podem ser observados os sinais da metila como tripleto em δ 1,19 ppm ($J = 7,1$ Hz; 3H) e dos hidrogênios metilênicos como quadrupletos com deslocamento em δ 3,66 ppm ($J = 7,1$ Hz; 2H) que correspondem ao etanol. Há ainda a presença do singlete em δ 2,82 ppm do TMU e de um singlete largo em δ 4,81 ppm, atribuído aos hidrogênios da água residual da destilação.

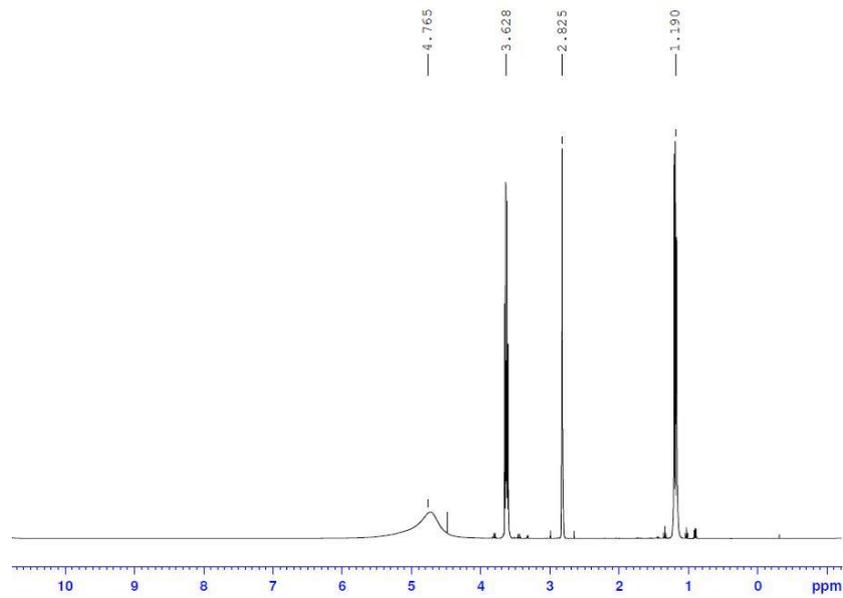


Figura 4.1. Espectro de ^1H do etanol obtido da fermentação de um mel comercial.

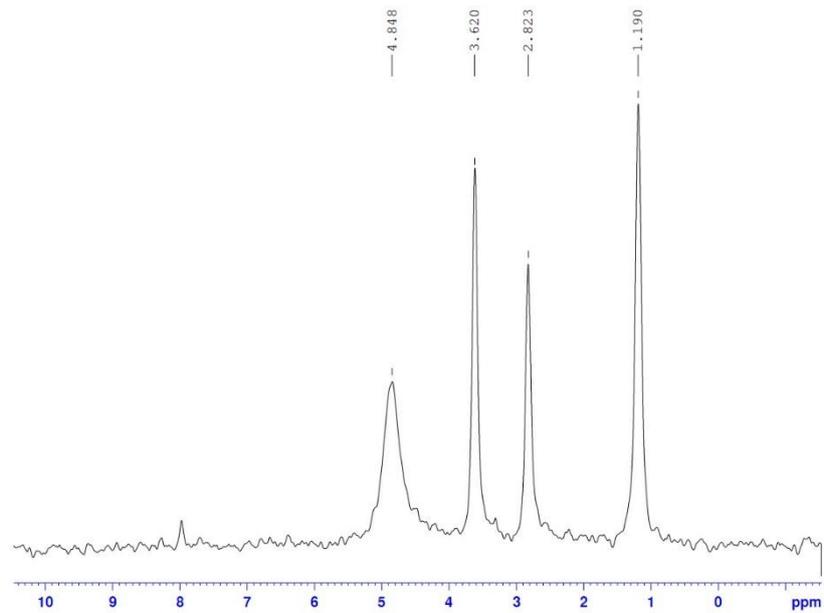


Figura 4.2. Espectro de ^2H do etanol obtido da fermentação de um mel comercial.

O espectro de RMN de ^2H (figura 4.2) apresenta os mesmos sinais que o espectro de ^1H , no entanto, todos como singletos, devido ao fator de alargamento de linha utilizado (*Line Broadening* ou *LB*) de 3,0 Hz e da largura “natural” causada pelo acoplamento quadrupolar. Observa-se também que os deslocamentos químicos para os espectros de ^2H são os mesmos encontrados no espectro de ^1H correspondente (MARTIN et al., 1983).

Para o cálculo da relação isotópica, inicialmente foi calculada a massa real de etanol no tubo, utilizando os dados obtidos nos espectros de RMN de ^1H . A partir da equação (2) a concentração de etanol foi calculada através da área de integração dos sinais da metila do etanol e do padrão. O sinal do TMU foi calibrado para 1, os demais valores utilizados são mostrados a seguir.

C_s : Concentração do padrão = 1,40 mol.L⁻¹. Considerando 99% de pureza, massa de TMU= 0,098g e volume total = 600 μL);

N_s : Número de hidrogênios do padrão = 12

N_x : Número de hidrogênios do sítio analisado de etanol (metila) = 3

A_s : Área de integração do sinal de RMN de ^1H para as metilas do padrão.

A_x : Área de integração do sinal de RMN de ^1H para os sítios do etanol a ser analisado.

$$C_x = C_s \frac{N_s A_x}{N_x A_s} \quad (2)$$

A partir do valor da concentração de etanol foi possível calcular a massa real utilizada na análise, e através das áreas de integração dos sinais de ^2H do padrão e de etanol, foi encontrado o valor das relações isotópicas $^2\text{H}/^1\text{H}$ dos méis analisados. É importante ressaltar a importância no cuidado em relação à integração dos sinais no espectro, cuja área integrada, em uma medida quantitativa deve cobrir 99% do sinal. O cálculo da relação isotópica então foi feito com base na equação (1), que se utiliza quando um padrão interno é usado, no caso o TMU.

$$\left(\frac{^2\text{H}}{^1\text{H}}\right)_i^A = \frac{I_i^A \cdot P^P \cdot m^P \cdot M^A}{I^P \cdot P_i^A \cdot m^A \cdot M^P} \left(\frac{^2\text{H}}{^1\text{H}}\right)^P \quad (1)$$

Para isso, utilizaram-se as seguintes condições:

$(^2\text{H}/^1\text{H})^{\text{P}}$: Relação isotópica do padrão (TMU) = 135 ppm;

I^{P} : Área de integração do sinal de RMN de ^2H do padrão = 1

P^{P} : Número de hidrogênios do padrão = 12

P^{A} : Número de hidrogênios do sítio analisado de etanol = 3 (metila); 2 (metileno);

m^{P} : massa do padrão = 0,098 g;

m^{A} : massa de etanol = varia de acordo com o valor obtido para cada amostra no cálculo anterior;

M^{A} : massa molar de etanol = 46,07 g.mol⁻¹;

M^{P} : massa molar do padrão = 116,16 g.mol⁻¹.

Observou-se que os valores das relações isotópicas encontrados para o sítio II (CH₂) do etanol seguiram o mesmo padrão, variando em torno de 128 ppm, isso porque os átomos de deutério que estão localizados no sítio II vêm predominantemente da água presente na etapa de fermentação não contribuindo para diferenciação da origem biossintética (MARTIN et al., 1983).

Na tabela 4.2, é possível notar os valores ($^2\text{H}/^1\text{H}$) obtidos para a metila do etanol (sítio III), que mostraram a origem biossintética de cada tipo de mel analisado. Todos os méis analisados seguiram a mesma tendência, próximos de 100 ppm. Comparando os resultados obtidos com dados relatados na literatura, esses valores condizem com plantas que fixam o CO₂ utilizando o mecanismo biossintético C₃, como pode ser visto na tabela 4.3. Com o objetivo de comparar esses dados obtidos com os de méis de abelhas da espécie *Apis mellifera*, foram adquiridas 7 amostras desses méis (AM-1 a 7) e calculados a partir do etanol o valor da relação isotópica destes. No entanto, os valores encontrados da relação isotópica inclusive nesses méis foi em torno de 100 ppm, com esses resultados não foi possível diferenciar os méis de abelhas de espécies diferentes. Em contrapartida esses resultados mostram que não houve adulteração nos méis com relação a adição de açúcar na alimentação das abelhas.

De acordo com LINDNER et al., (1996), o mel possui conteúdo isotópico próximo ao de açúcares produzidos por plantas que realizam o metabolismo através do ciclo C₃. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho estão condizentes com essas informações. Somente através da análise isotópica, não foi possível inferir a

respeito de adulterações, uma vez que as abelhas não demonstraram preferência por plantas de ciclos diferentes. Isso pode ser justificado pelo fato de plantas oriundas de climas tropicais úmidos, apresentarem na maioria das vezes absorção do CO₂ através do ciclo C₃ (BOOM, 2004), e isso causou a similaridade nos resultados obtidos, pois todos os méis analisados foram obtidos na região amazônica, onde a umidade é a principal característica da região.

Tabela 4.2. Relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ calculada para metila ($^2\text{H}/^1\text{H}$)_i dos etanóis obtidos da fermentação dos méis.

Amostra	Relação isotópica (ppm) ($^2\text{H}/^1\text{H}$) _i
MS-A	100,31 (±0,50)
MS-B	99,55 (±0,44)
MS-C	100,08 (±0,55)
MS-D	97,77 (±0,18)
MS-E	97,92 (±0,93)
MS-F	97,60 (±0,45)
MS-G	99,20 (±0,22)
MS-H	100,20 (±1,07)
MS-I	100,48 (±0,30)
MS-J	100,59 (±0,37)
MI-BR1	99,42 (±0,25)
MI-BR2	99,51 (±0,13)
MI-21	100,03 (±0,16)
MS-162c	100,75 (±0,18)
MS-162	100,25 (±1,07)
MS-BR1	97,72 (±0,12)
MS-BV	100,52 (±0,30)

Amostra	Relação isotópica (ppm) (² H/ ¹ H) _i
MI-05c	97,27 (±0,03)
MI-07	97,86 (±0,02)
AM-1	99,9 (±0,18)
AM-2	99,74 (±0,56)
AM-3	100,00 (±0,43)
AM-4	99,56 (±0,36)
AM-5	100,58 (±0,31)
AM-6	100,19 (±0,29)
AM-7	100,04 (±0,93)

Tabela 4.3. Valores típicos relatados na literatura para relação isotópica ²H/¹H

Material	Ciclo	² H/ ¹ H
Mosto de uva	C3	96,2 – 101,7 ^{II}
Açúcar de beterrada	C3	92,0 – 94,0 ^I
Açúcar de cana	C4	111,5 – 112,5 ^I
Agave (Tequila)	CAM	109,4 ^{III}

I- LINDNER et al., 1996; II- MARTIN et al., 1988; III- BAUER-CHRISTOPH et al., 2003

4.3 Identificação dos componentes majoritários dos méis.

Para o estudo da classificação dos méis por quimiometria foi necessário levar em consideração a importância de uma atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos de alguns constituintes presentes na matriz em questão. Para isso foram realizados experimentos de RMN 1D e 2D dos méis autênticos e comerciais, os quais forneceram a caracterização dos componentes responsáveis pela discriminação na análise quimiométrica.

Na figura 4.3, é mostrado um espectro de ¹H do mel *M. interrupta*, onde é possível notar a presença de carboidratos (açúcares) na região congestionada de 3,3-3,9 ppm. Também observam-se os dubletos em 5,22 ppm e 4,64 ppm dos

hidrogênios anoméricos da α e β - glicose, respectivamente. Além do tripleto em δ 3,23 ppm característico também da β -glicose. Essas e as demais atribuições foram realizadas através da análise de espectros 2D e comparação com a literatura (BOFFO, 2009b; ALVES-FILHO et al., 2012).

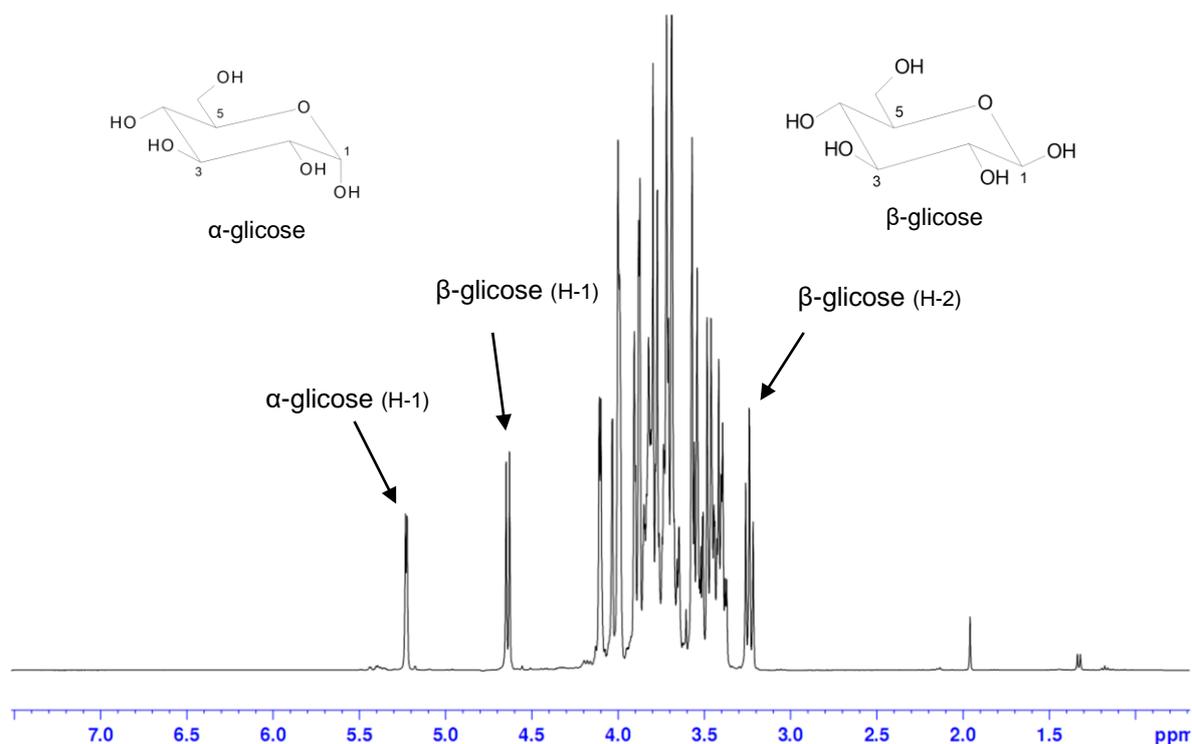


Figura 4.3. Espectro de ^1H do mel autêntico de *M. interrupta* (MI-05)

Na figura 4.4, observa-se o espectro de HSQC-TOCSY, que foi utilizado para atribuição dos sinais referentes aos açúcares, α -glicose, β -glicose e α -frutofuranose, além desses compostos também foram observados sinais característicos de β -frutofuranose, no entanto, como estão em uma região congestionada do espectro, não foi possível a atribuição completa de todos os hidrogênios desse composto. No mapa de correlação HSQC-TOCSY é possível notar os dubletos em 5,22 ppm e 4,64 ppm, dos hidrogênios anoméricos, mostrando correlação com os carbonos pertencentes ao mesmo sistema de *spin*. Os demais valores dos deslocamentos químicos dos açúcares identificados no mel foram atribuídos aliando-se essas informações às presentes nos espectros de COSY (figura 4.5) de HSQC (figura 4.6) e HMBC (figura 4.7), como pode ser observado na tabela 4.4.

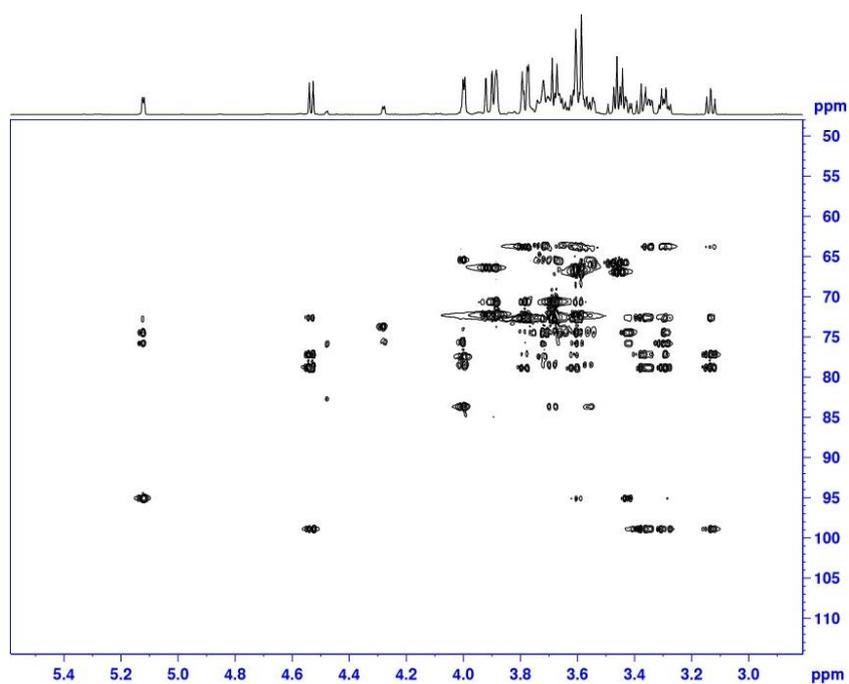


Figura 4.4. Ampliação do mapa de correlação HSQC-TOCSY de uma amostra de mel de abelha sem ferrão, mostrando as correlações dos hidrogênios anoméricos com os carbonos dentro do mesmo sistema de *spin*. ^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, 200 mg em 500 μL de D_2O .

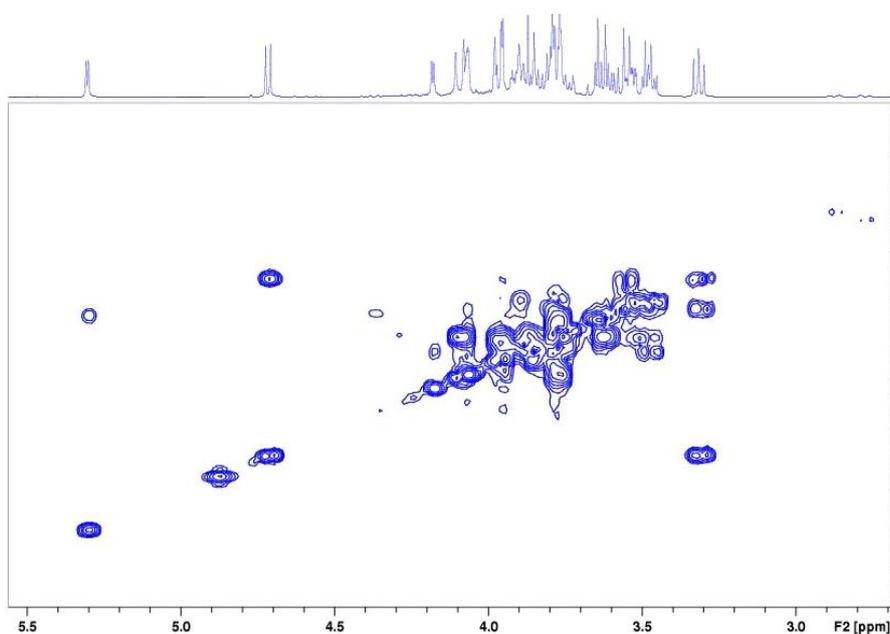


Figura 4.5. Mapa de correlação COSY ampliado de uma amostra de mel mostrando as correlações na região dos açúcares. ^1H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz, 200 mg em 500 μL de D_2O .

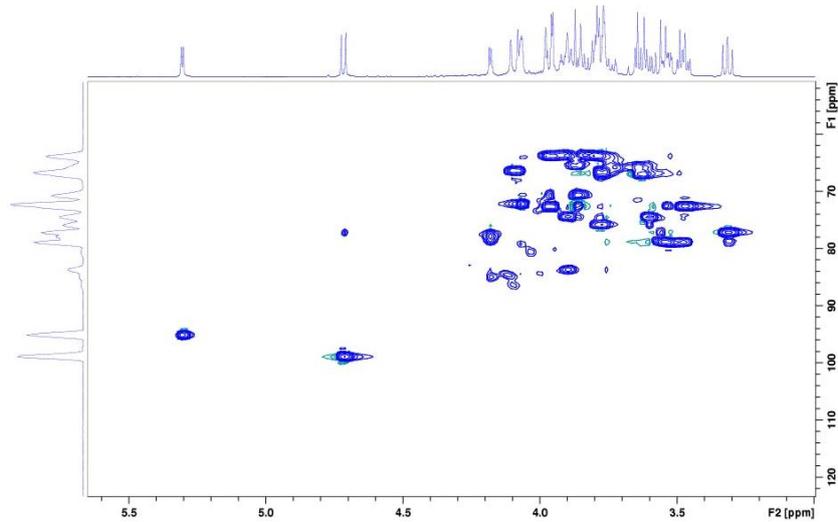


Figura 4.6. Mapa de correlação HSQC ampliado de uma amostra de mel mostrando as correlações na região dos açúcares. ^1H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz, 200 mg em 500 μL de D_2O .

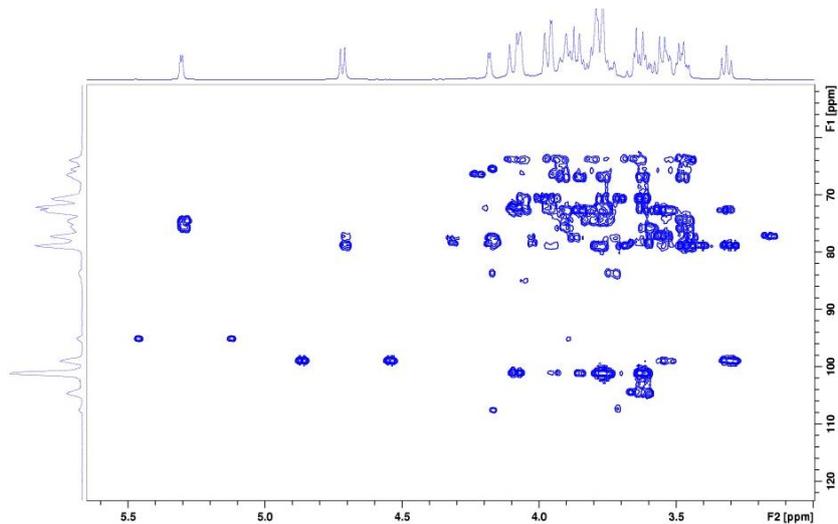


Figura 4.7. Mapa de correlação HMBC ampliado de uma amostra de mel mostrando as correlações na região dos açúcares. ^1H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz, 200 mg em 500 μL de D_2O .

Tabela 4.4. Dados espectroscópicos para os açúcares encontrados nos méis de abelha se ferrão (^1H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz, 200 mg em 500 μL de D_2O).

^1H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz, D_2O		BOFFO, 2009b		
H/C	δ_{H} (ppm) , J (Hz)	δ_{C} (ppm)*	δ_{H} (ppm) , J (Hz)	δ_{C} (ppm)*
α -glucose				
1	5,12 (<i>d</i> , 3,78)	95,1	5,22 (<i>d</i> , 3,70)	94,6
2	3,93-3,99 (<i>m</i>)	72,7	3,49-3,54	74,0
3	3,74-3,80 (<i>m</i>)	75,7	3,66-3,73	75,4
4	3,42-3,50 (<i>m</i>)	72,8	3,35-3,42	72,1
5	3,87-3,93 (<i>m</i>)	74,4	3,78-3,84	73,9
6a	3,76-3,82 (<i>m</i>)	63,6	3,67-3,73	63,3
6b	3,93-3,98 (<i>m</i>)		3,79-3,85	
β -glucose				
1	4,62 (<i>d</i> , 7,90)	99,0	4,63 (<i>d</i> , 8,00)	98,4
2	3,31 (<i>t</i> , 7,90)	77,2	3,23 (<i>dd</i> , 8,00; 9,20)	76,7
3	3,51-3,58 (<i>m</i>)	78,9	3,50-3,40 (<i>m</i>)	78,3
4	3,93-3,99 (<i>m</i>)	72,6	3,46-3,35 (<i>m</i>)	72,1
5	3,44-3,52 (<i>m</i>)	78,2	3,50-3,40 (<i>m</i>)	78,4
6a	3,80-3,85 (<i>m</i>)	63,9	3,77-3,72 (<i>m</i>)	63,4
6b	3,87-3,93 (<i>m</i>)		3,90-3,85 (<i>m</i>)	

A figura 4.8 apresenta o espectro de ^1H do mel de *M. interrupta* com ampliações nas regiões de aromáticos (8,00- 6,00 ppm) e 3,00-0,50 ppm. Nessa região é possível notar a presença dos aminoácidos fenilalanina (δ 7,28-7,44), em maior quantidade, e tirosina, observada como dubletos (sistema AA'XX') em 7,18 e 6,88 ppm, cujos sinais de carbono foram atribuídos através da análise de HSQC-TOSY (figura 4.9), HSQC e HMBC. Também na figura 4.8 é possível notar sinais característicos do aminoácido treonina (δ 1,30) e evidências de alanina (δ 1,46, *d*,

7,27 Hz), como esse último aparece em baixa concentração, não foi possível a atribuição dos demais deslocamentos dessa substância. A elucidação desses aminoácidos está mostrada na tabela 4.5, a qual foi realizada através dos espectros HSQC-TOCSY, HSQC e HMBC.

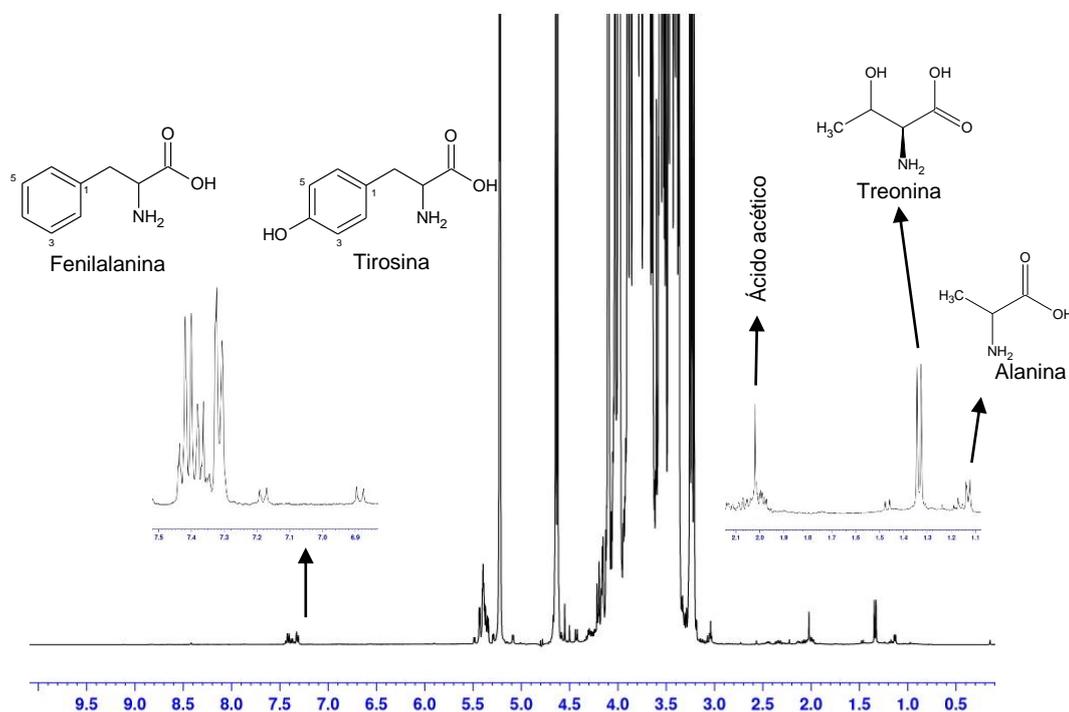


Figura 4.8. Espectro de ^1H e ampliações do mel autêntico de *M. interrupta*, mostrando os sinais característicos de aminoácidos.

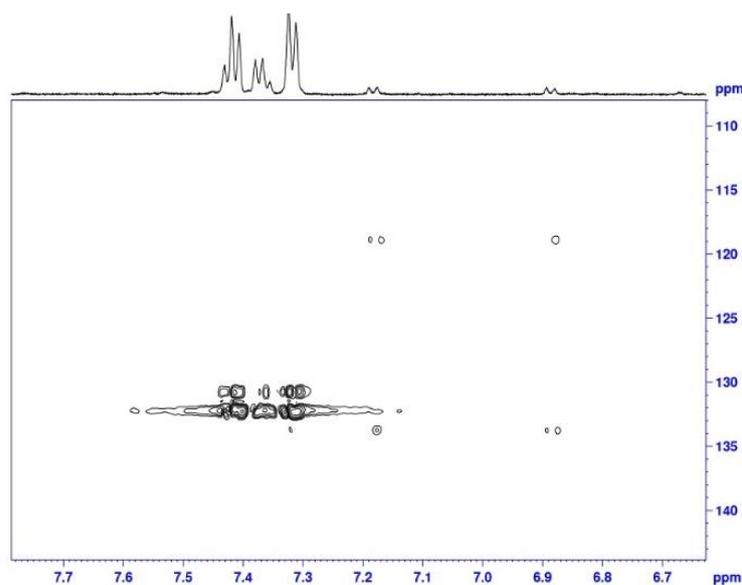


Figura 4.9. Ampliações do mapa de correlação HSQC-TOCSY mostrando as correlações dos aminoácidos fenilalanina e tirosina.

Tabela 4.5. Dados espectroscópicos para os aminoácidos encontrados nos méis de abelha se ferrão (^1H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz, 200 mg em 500 μL de D_2O).

^1H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz, D_2O			Literatura	
H/C	δ_{H} (ppm) , J (Hz)	δ_{C} (ppm)*	δ_{H} (ppm) , J (Hz)	δ_{C} (ppm)*
Fenilalanina				
2/6	7,31 (<i>m</i>)	132,1	7,31 (<i>d</i> , 8,4) ^I	132,1 ^I
3/5	7,41 (<i>m</i>)		7,41(<i>d</i> , 8,4) ^I	131,8 ^I
4	7,38 (<i>m</i>)	130,4	7,35-7,39 (<i>m</i>) ^I	130,4 ^I
Tirosina				
2/6	7,17 (<i>d</i> AA'XX', 8,77)	133,7	7,18 (<i>d</i> , 8,4) ^I	133,5 ^I
3/5	6,87 (<i>d</i> AA'XX', 8,77)	118,8	6,88 (<i>d</i> , 8,4) ^I	118,6 ^I
Treonina				
3	ND	69,5		68,7 ^{II}
4	1,30 (<i>d</i> , 6,40)	22,3	1,32 (<i>d</i> , 6,50) ^{II}	22,3 ^{II}

I- BOFFO, 2009b; II- OLIVEIRA, 2012; N.D. - não determinado

A figura 4.10 apresenta uma ampliação do espectro de ^1H do mel comercial (MS-A) que assim como a maioria dos méis comerciais apresentou evidências da presença da substância 5-hidróximetilfurfural (HMF), com a presença dos dubletos em δ 7,54 ppm e δ 6,66 ppm com constante de acoplamento em 3,62 Hz pertencentes aos hidrogênios do anel furano, H-3 e H-4, respectivamente. Há ainda a presença do sinal como singleto em δ 9,46 ppm, atribuído ao hidrogênio do aldeído (H-7) (BOFFO, 2009b). Esta substância é algumas vezes reportada como indicador de adulteração dos méis, mas que também pode ser formada pela exposição do mel a altas temperaturas e pelo armazenamento em condições inadequadas (SANZ et al., 2003). Alguns estudos apontam que HMF apresenta efeitos tóxicos e tumorais, no entanto, isso ainda é matéria para debates, pois estudos mais recentes sugerem que este não apresenta sérios riscos à saúde (SPANNO et al., 2006). Também nos espectros de méis comerciais foram identificados sinais referentes ao ácido cítrico como dubletos em δ 2,89 e δ 2,87 (15,37 Hz), confirmados pelos espectros 2D.

As demais atribuições dos deslocamentos químicos podem ser vistas na tabela 4.6, para isso foram utilizados dados dos experimentos de HSQC (figura 4.11) e HMBC.

Tabela 4.6. Dados espectroscópicos para o composto 5-hidróximetilfurfural (HMF) (^1H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz, 200 mg em 600 μL de D_2O).

H/C	δ_{H} (ppm) , J (Hz)	δ_{C} (ppm)*
2	-	151,7
3	7,54 (<i>d</i> , 3,62)	126,8
4	6,66 (<i>d</i> , 3,62)	110,8
5	-	161,5
6	ND	ND
7	9,53 (<i>s</i>)	180,4

N.D. - não determinado

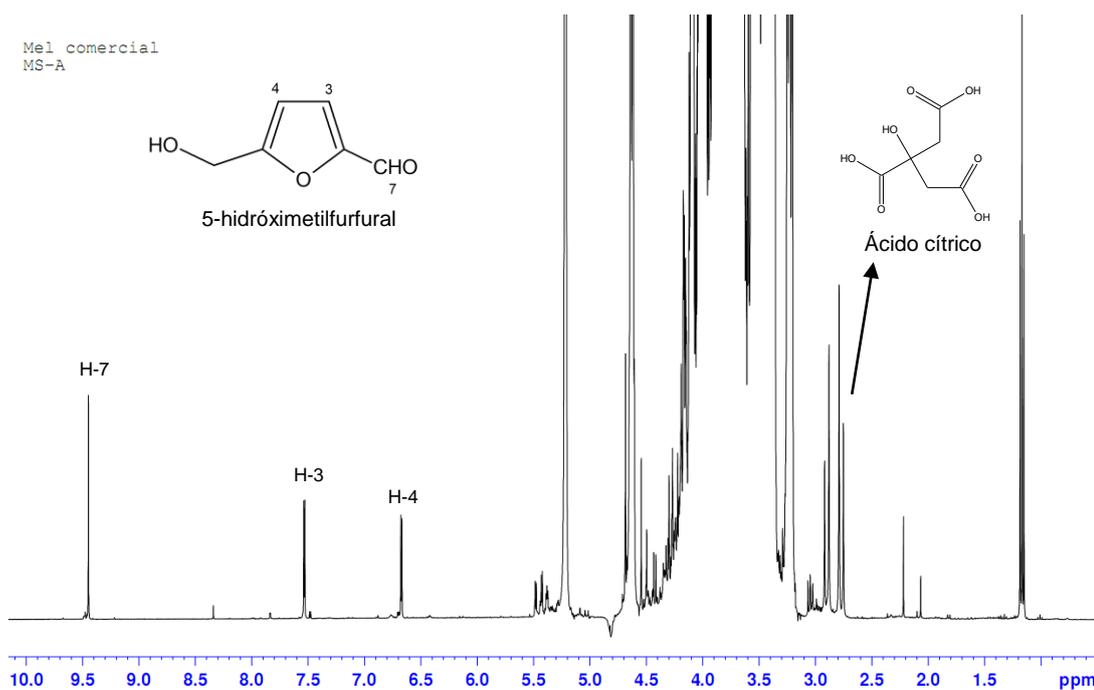


Figura 4.10. Expansão do espectro de RMN de ^1H do mel comercial MS-A

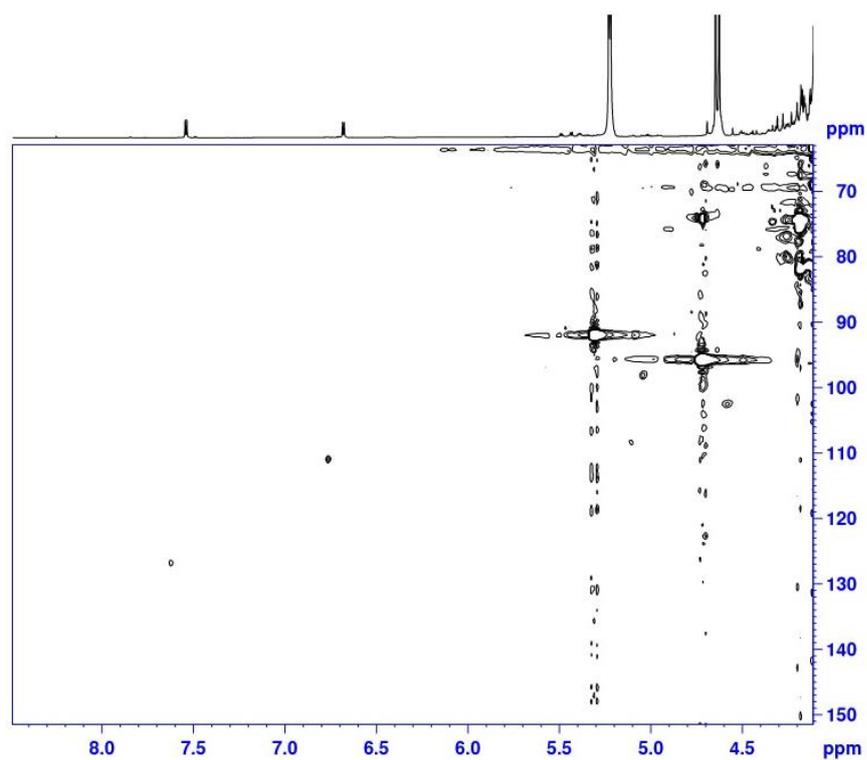


Figura 4.11. Expansão do mapa de correlação HSQC do mel comercial MS-A

4.4 Análise quimiométrica

Com o intuito de verificar possíveis diferenças na composição dos méis de *M. seminigra*, *M. interrupta* e comerciais, além da variação de sazonalidade e diferenças entre os méis comerciais e autênticos, análises de classificação de dados foram realizadas, para isso foram utilizados os espectros de RMN de ^1H desses méis.

A fim de obtermos uma visualização geral da classificação e agrupamento das amostras, iniciou-se a discriminação pela análise por componentes principais (PCA). Uma grande vantagem que a PCA oferece é a possibilidade de fazer a seleção das variáveis (regiões espectrais) mais importantes para discriminar os grupos de amostras. A informação de entrada para todos os métodos quimiométricos é fornecida através de uma tabela de dados, construída a partir dos espectros de RMN. Uma forma de determinar essas variáveis de entrada é utilizar os pontos usados na aquisição dos espectros, por exemplo, um espectro adquirido com 64K fornecerá 64K variáveis de entrada numa análise quimiométrica. Porém, quando se utiliza os pontos como dados de entrada, obtém-se um grande número de variáveis, podendo gerar muitas vezes problemas no manuseio de alguns programas computacionais, além de da necessidade de se usar muitos pontos para representar um único sinal no espectro. Outra dificuldade em utilizar os pontos como variáveis de entrada, é que um ponto não representará sempre o mesmo sinal em todas as medidas, isso porque os pontos são mais suscetíveis às variações nos deslocamentos químicos dos sinais nos espectros, causadas por diversos fatores, como concentração da amostra, temperatura e homogeneidade do campo magnético aplicado.

Neste sentido, o programa computacional AMIX[®] determina as variáveis dividindo o espectro em intervalos, chamados *buckets*, no qual o tamanho é configurado pelo analista. De forma resumida, ele calcula a média entre alguns pontos, reduzindo o número de variáveis. As larguras tipicamente utilizadas são entre 0,04 e 0,005 ppm (SPRAUL et al., 2009). Neste trabalho após análises de alguns intervalos, optou-se por 0,04 ppm, pois assim, garantimos a qualidade da resolução na discriminação sem utilizar informações desnecessárias.

Feito isso, o modelo da análise por componentes principais (PCA) foi construído com 10 componentes principais explicando um total de 94,6% de variância. Através da visualização gráfica da distribuição das amostras na nova dimensão gerada pela PC1 e PC3 (Figura 4.12), é possível observar a nítida discriminação entre as amostras adquiridas no comércio local, como sendo proveniente do mel Jandaíra

A partir dos resultados expostos anteriormente optou-se pela inclusão nas análises quimiométricas de méis de abelhas da espécie *Apis mellifera*, cujos méis são comumente encontrados no comércio, isso foi realizado com o objetivo de avaliar a origem dos méis comerciais adquiridos como de abelha sem ferrão, mas que nas análises por componentes principais não mostrou semelhança com as amostras autênticas. Desse modo, foram adquiridos e inseridos nas análises méis de *Apis mellifera* (abelha com ferrão), também da região norte. Inicialmente o gráfico das componentes principais foi construído com 9 PC's (figura 4.16), que explicou 98,3% da variância. Este modelo foi composto com os espectros completos, sendo excluídas somente as regiões de pré-saturação da água e do sinal de referência (TSP-d4). Esses resultados mostram claramente o agrupamento das amostras comerciais compradas como mel de abelha sem ferrão com as amostras comerciais de mel de *Apis mellifera*.

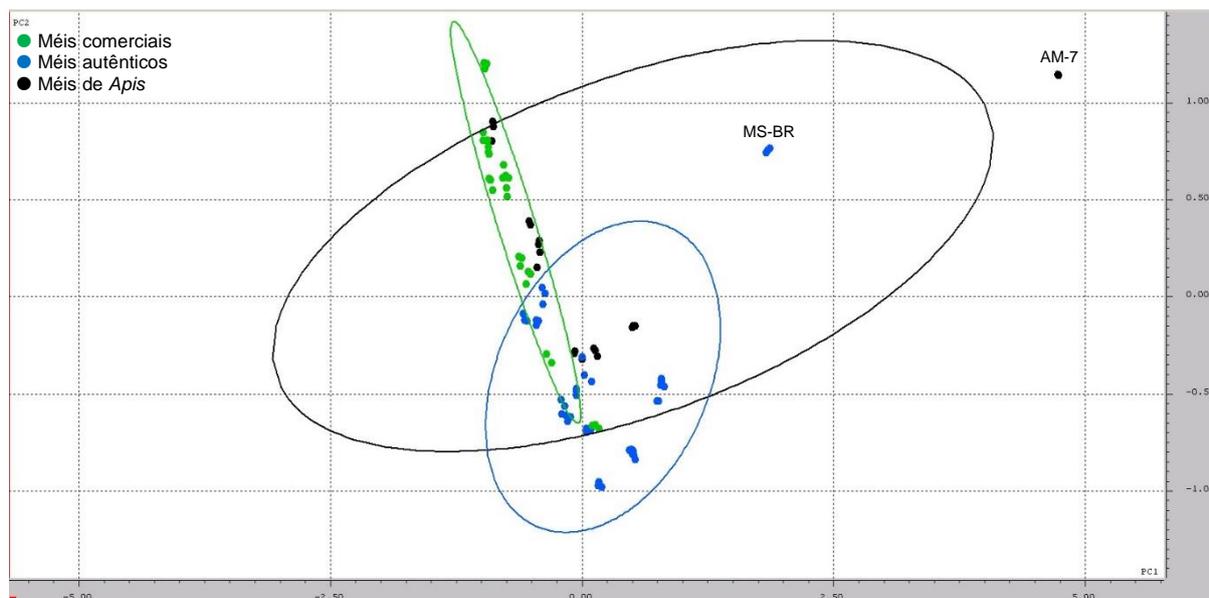


Figura 4.16. Gráfico de escores de PC1xPC2 dos espectros completos de RMN de ^1H dos méis autênticos (*M. seminigra* e *M. interrupta*), comerciais de abelhas sem ferrão e comerciais de *A. mellifera*. As porcentagens de informações obtidas em PC1 foram de 57,3% e em PC2 de 18,8%.

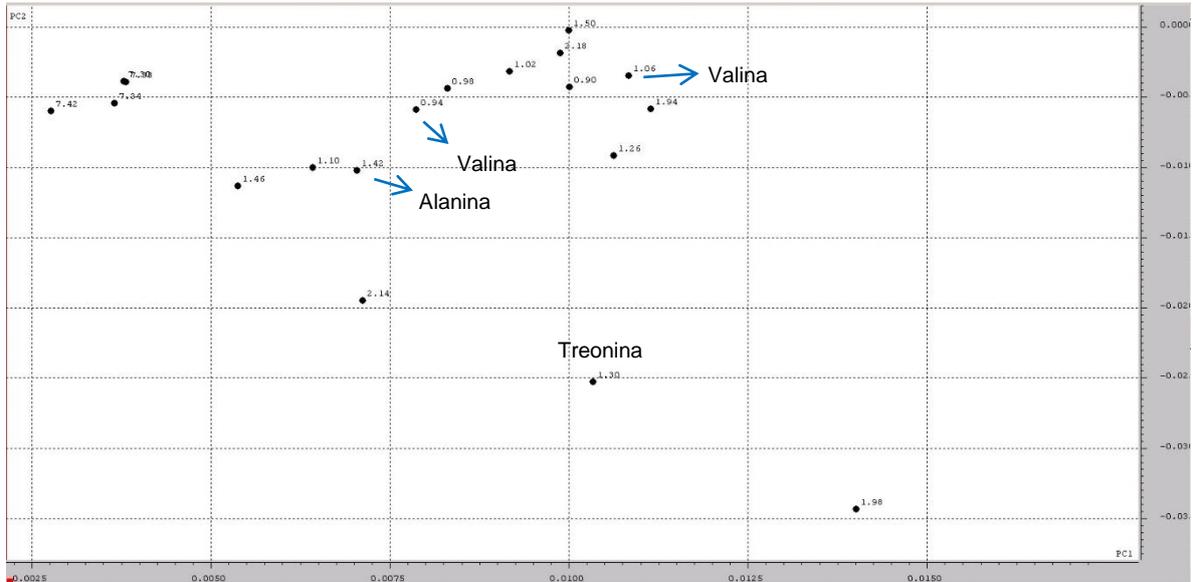


Figura 4.18. Ampliação do gráfico de pesos de PC1xPC2 dos espectros de RMN de ^1H dos méis autênticos (*M. seminigra* e *M. interrupta*), comerciais de abelhas sem ferrão e comerciais de *A. melifera*.

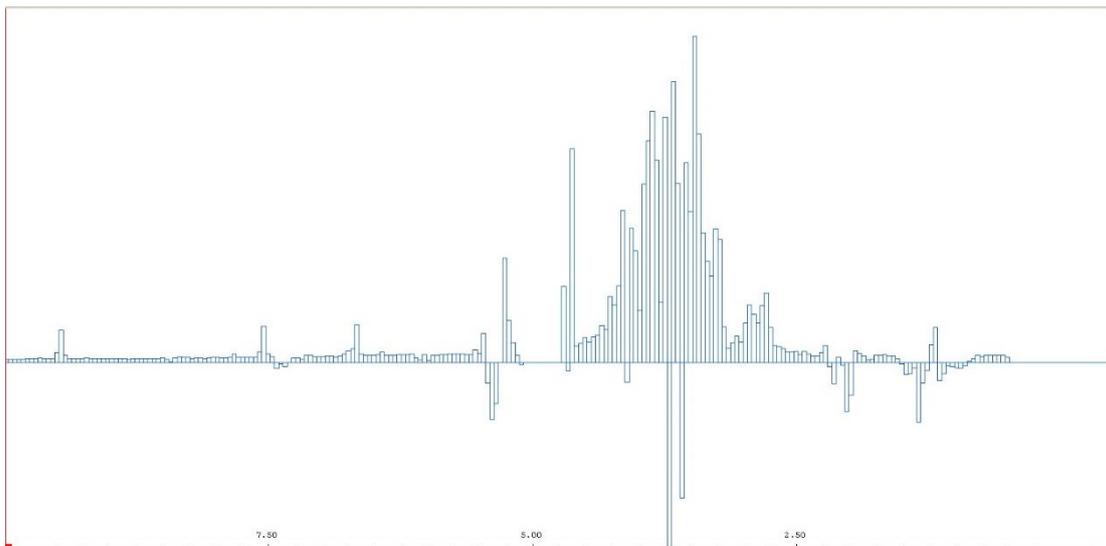


Figura 4.19. Gráfico mostrando a influência das variáveis em PC2 referente à discriminação observada na figura 4.16.

Como foi observado anteriormente no gráfico apresentado na figura 4.16, a região espectral referente aos açúcares mostra grande importância na discriminação dos méis. Sendo assim, no gráfico gerado pela PC2xPC3 (figura 4.20) observa-se a novamente a discriminação entre os méis autênticos e comerciais, além do agrupamento dos comerciais com os de *A. melifera*. As variáveis referentes a esta

separação podem ser observadas na figura 4.21, bem como é possível notar a diferença na quantidade de açúcar diretamente nos espectros dos méis na figura 4.22.

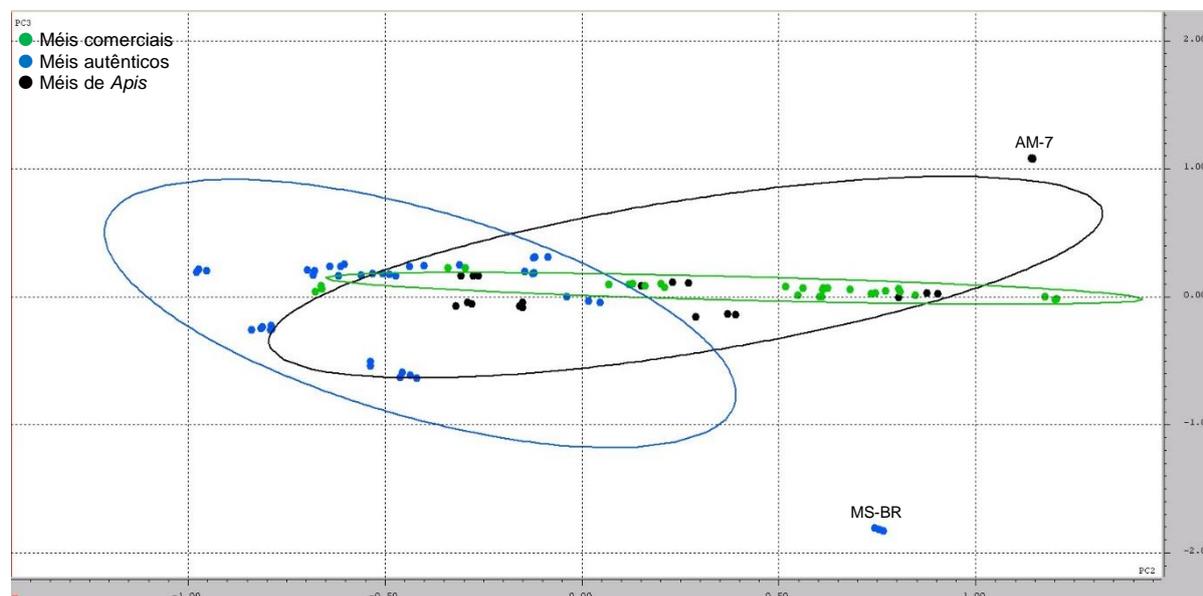


Figura 4.20. Gráfico de escores de PC2xPC3 dos espectros completos de RMN de ^1H dos méis autênticos (*M. seminigra* e *M. interrupta*), comerciais de abelhas sem ferrão e comerciais de *Apis melifera*. As porcentagens de informações obtidas em PC1 foram de 16,2% e em PC2 de 7,6%.

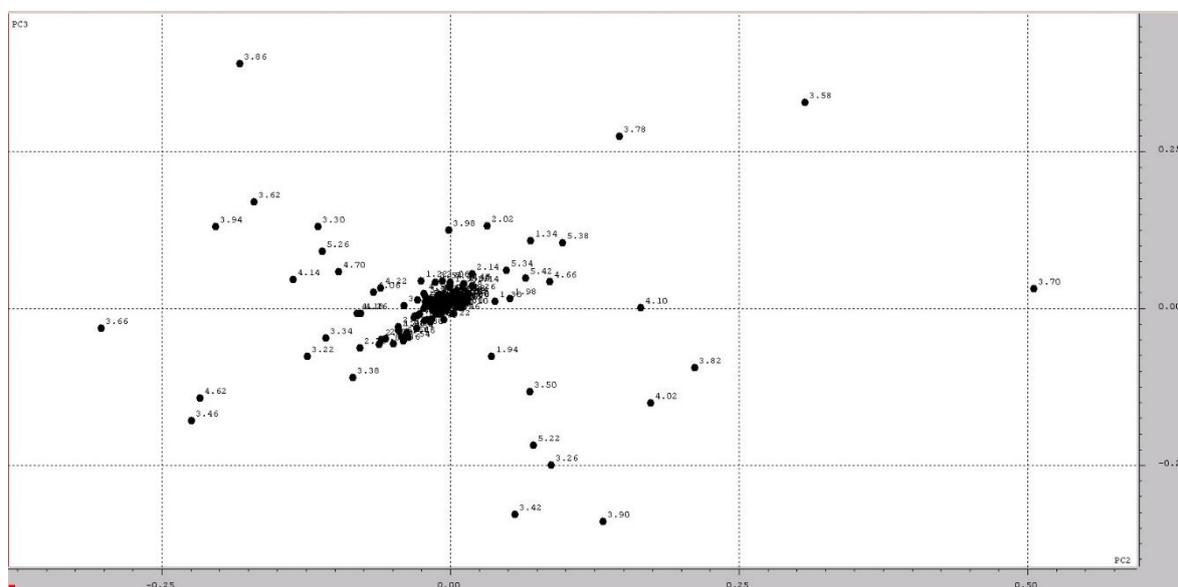


Figura 4.21. Gráfico de pesos de PC2xPC3 dos espectros de RMN de ^1H dos méis autênticos (*M. seminigra* e *M. interrupta*), comerciais de abelhas sem ferrão e comerciais de *A. melifera*.

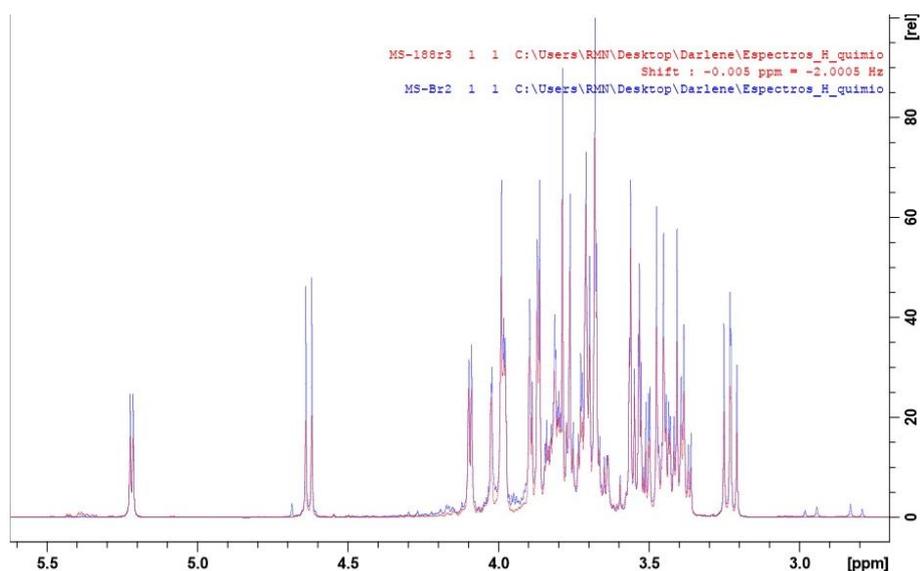


Figura 4.22. Gráfico dos espectros de um mel autêntico e um comercial, mostrando a diferença¹ na quantidade de açúcar presente nos mesmos (MS-188 em vermelho representa o mel de *Melipona seminigra* e MS-B em azul, um mel comercial).

Nos gráficos gerados tanto pela PC1xPC2 quanto pela PC2xPC3, observa-se a presença de duas amostras (AM-7 e MS-BR) que se comportaram de forma diferente das demais na amostragem, podendo ser classificadas como *outliers*. Em uma análise visual dos espectros desses méis, foi possível notar que AM-7 apresenta baixa concentração de HMF em relação às outras amostras que apresentam essa substância (figura 4.23). No caso da separação observada para MS-BR observou-se que isso ocorreu devido ao grande teor do aminoácido fenilalanina presente somente nos méis de abelha sem ferrão (figura 4.24).

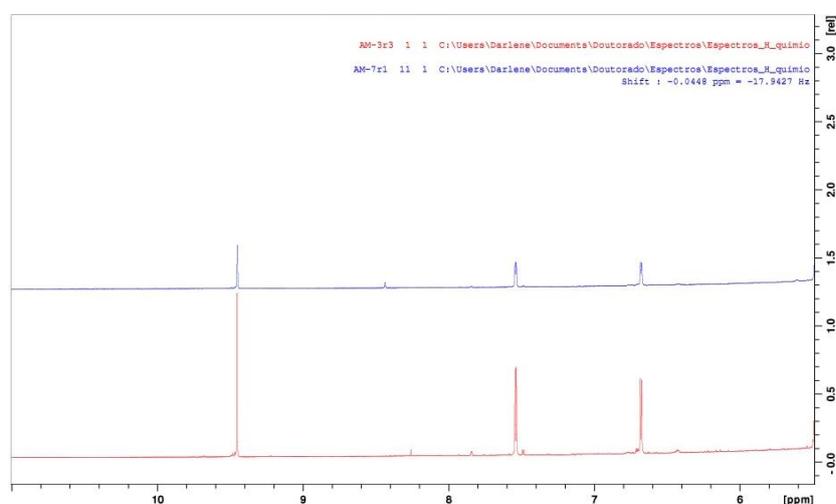


Figura 4.23. Gráfico dos espectros dos méis comerciais (AM-7 e AM-3), mostrando a diferença no teor de HMF presente.

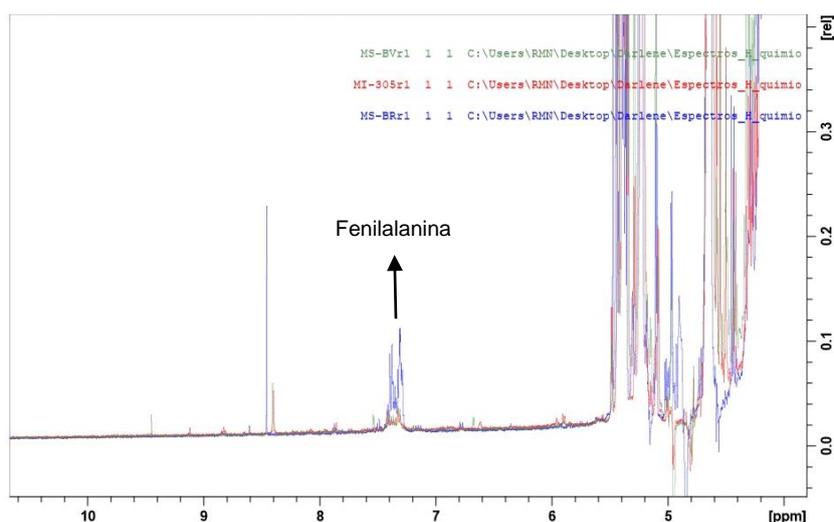


Figura 4.24. Gráfico dos espectros dos méis autênticos, mostrando a diferença no teor do aminoácido fenilalanina presente.

As análises por componentes principais da região dos aromáticos mostrou exatamente a mesma separação observada anteriormente, no entanto com um melhor agrupamento das amostras comerciais, como pode ser visto na figura 4.25. O gráfico de componentes principais foi construído utilizando-se 10 componentes principais, as quais forneceram 99,3% da variância explicada. É possível notar no gráfico de pesos (figura 4.26) que a discriminação ocorre novamente devido à presença do aldeído 5-hidroxi-metil-furfural (HMF) nos méis comerciais de abelhas sem ferrão e nos de *Apis mellifera*, ausente nos méis autênticos. Da mesma forma somente é possível notar a presença do aminoácido fenilalanina nos méis autênticos e ausentes nos méis comerciais, podendo essa ser uma forma de distinguir esses méis (figura 4.27). Também é importante observar apenas uma tendência dos méis autênticos em se agruparem, isso ocorre devido a variação da concentração de fenilalanina nesses méis, uma avaliação nos espectros de RMN ¹H mostrou esse resultado, de acordo com a figura 4.28.

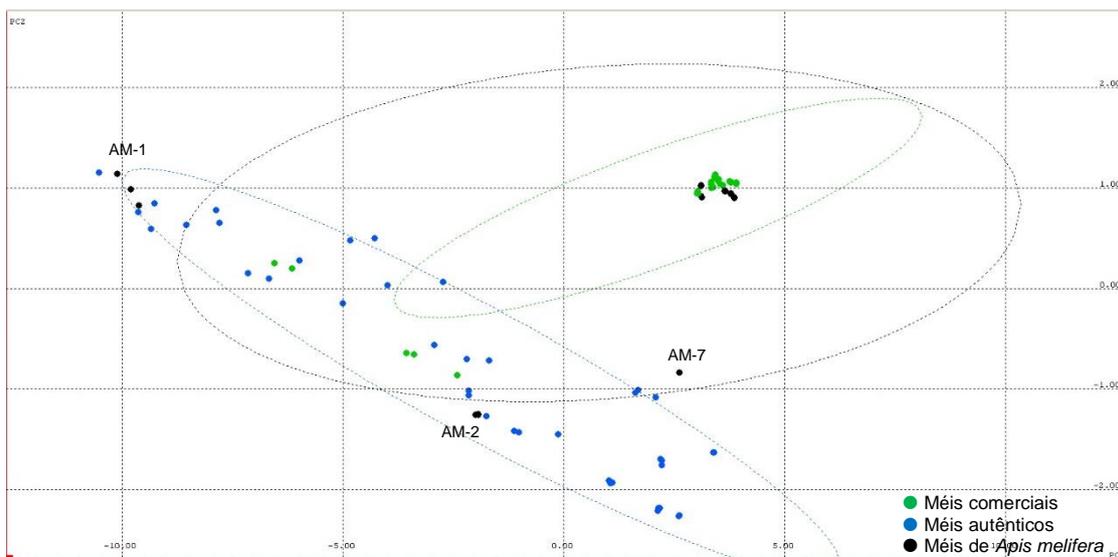


Figura 4.25. Gráfico de escores de PC1xPC2 da região de aromáticos dos espectros de RMN de ^1H dos méis autênticos (*M. seminigra* e *M. interrupta*), comerciais de abelhas sem ferrão e comerciais de *A. melifera*. PC1 descreve 89,2 % de variância do conjunto de dados e PC2 descreve 6,2%.

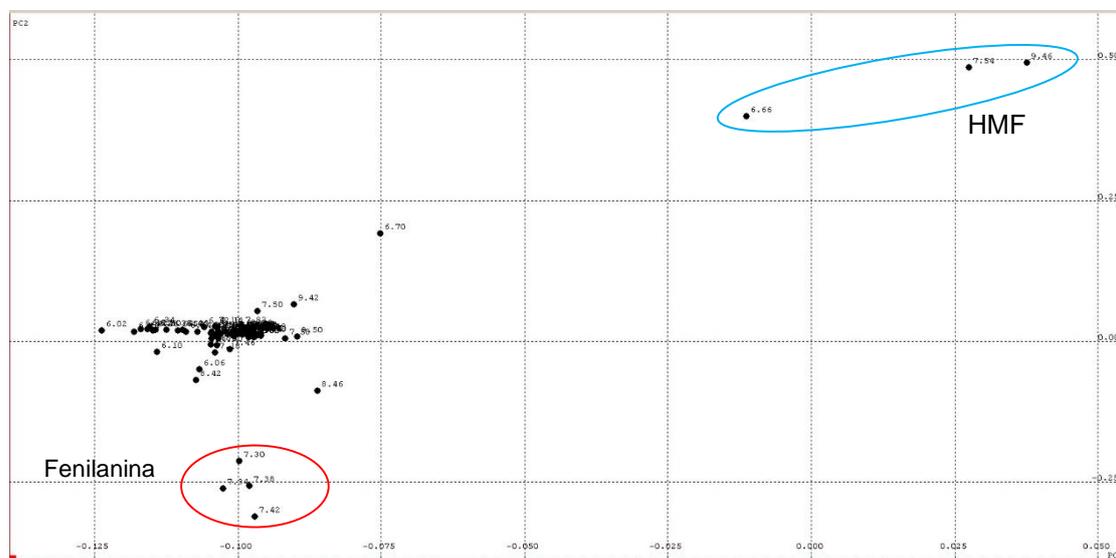


Figura 4.26. Gráfico de pesos de PC1xPC2 dos espectros de RMN de ^1H dos méis autênticos (*M. seminigra* e *M. interrupta*), comerciais de abelhas sem ferrão e comerciais de *A. melifera*.

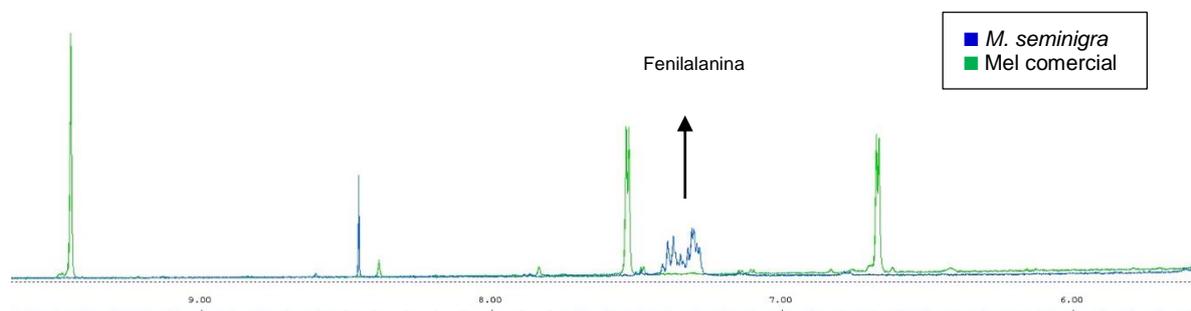


Figura 4.27. Representação gráfica de um espectro de mel autêntico de abelhas sem ferrão e um comercial.

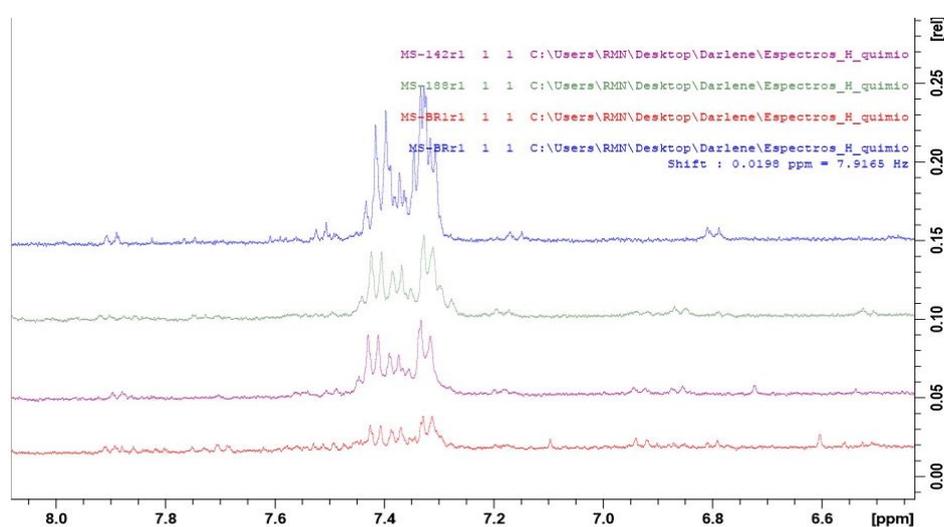


Figura 4.28. Representação gráfica de alguns espectros de méis autênticos de abelhas sem ferrão mostrando a variação no teor do aminoácido fenilalanina.

No gráfico gerado por componentes principais da figura 4.25 também observa-se a mesma tendência de separação da amostra AM-7, devido à baixa concentração de HMF, o que faz essa amostra se aproximar das amostras autênticas, que não apresentam HMF. O agrupamento observado para as amostras comerciais, ocorre como já foi citado anteriormente devido à presença de HMF, e essa substância é decorrente da decomposição de hexoses, isso ocorre quando o mel é exposto a temperatura elevadas, ou armazenado de forma inadequada. Nesse caso a quimiometria permitiu visualizar essa diferença entre méis recém coletados e méis coletados a algum tempo. E para nos certificarmos desta afirmação, os méis AM-1 e

AM-2, que não se agruparam aos demais méis comerciais de *Apis mellifera*, como pode ser visualizado em escores negativos de PC1, foram aquecidos a 50°C por 60h. Após esse período foram analisados e inseridos na análise quimiométrica com o objetivo de avaliarmos o seu comportamento.

O resultado dessa análise pode ser acompanhado na figura 4.29, mostrada abaixo. Como esperávamos, as amostras AM-1 e AM-2 que antes não apresentavam HMF, após o tempo de exposição ao calor, começou a produzir essa substância, cuja presença foi uma das principais responsáveis pela separação entre méis comerciais e autênticos. Logo, o agrupamento dessas amostras degradadas com os méis comerciais foi evidente. Neste caso, a quimiometria auxiliou na separação dos méis frescos (coincide com os méis de abelhas sem ferrão) e méis coletados a algum tempo (comerciais). A degradação desses méis pode ser observada no espectro de RMN ^1H dos méis antes e após a decomposição (figura 38), cuja variação na composição é evidente.

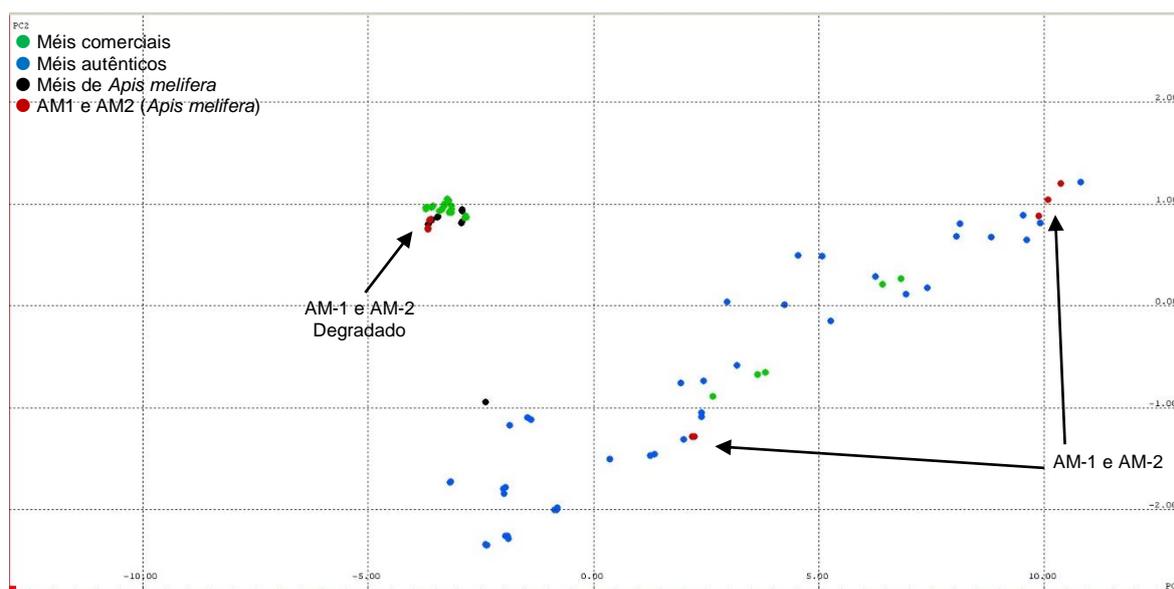


Figura 4.29. Gráfico de escores de PC1xPC2 da região de aromáticos dos espectros de RMN de ^1H dos méis autênticos (*M. seminigra* e *M. interrupta*), comerciais de abelhas sem ferrão, comerciais de *A. mellifera* e 2 comerciais degradados (AM1 e AM2). PC1 descreve 89,4 % de variância do conjunto de dados e PC2 descreve 6,1%, e 99,3% da variância explicada.

Foi realizada também a análise dos méis somente da região de 3,2 a 0,5 ppm, o gráfico das componentes principais foi construído com 10 PC'S explicando 94,2% da variância total. Nesse gráfico gerado (figura 4.30), observa-se uma certa tendência de separação novamente entre os méis autênticos e comerciais. Nos escores positivos de PC1 encontram-se as amostras de méis autênticos e 2 comerciais (MS-D e MS-E), essa discriminação ocorreu principalmente devido à presença dos sinais característicos da treonina (δ 1,34) presente somente nos méis autênticos (figura 4.31). Em escores negativos de PC1 observamos a predominância dos méis comerciais e também de algumas amostras de *Apis mellifera*, nesse caso a separação ocorreu pela presença do ácido cítrico (δ 3,00, *d*, 15, 6 Hz e δ 2,84, *d*, 15,6 Hz) somente nesses méis, ausente em méis de *Melipona*. Esse composto (ácido cítrico) encontrado somente nos méis comerciais de *Melipona* e *Apis* mostrou grande importância na separação entre os méis comerciais e autênticos, podendo ser considerado um potencial marcador para méis que não sejam de abelhas sem ferrão, uma vez que em nenhuma amostra de *Melipona* foi encontrada essa substância.

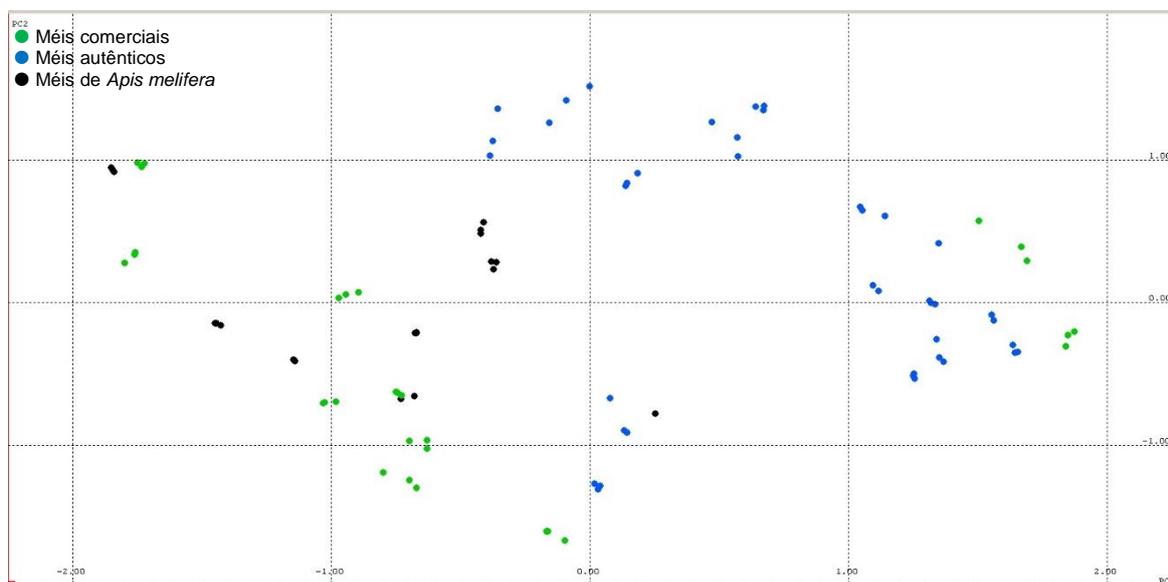


Figura 4.30. Gráfico de escores de PC1xPC2 da região de 3,2 a 0,5 ppm dos espectros de RMN de ^1H dos méis autênticos (*M. seminigra* e *M. interrupta*), comerciais de abelhas sem ferrão e comerciais de *A. mellifera*. PC1 descreve 27,4 % de variância do conjunto de dados e PC2 descreve 14,6%.

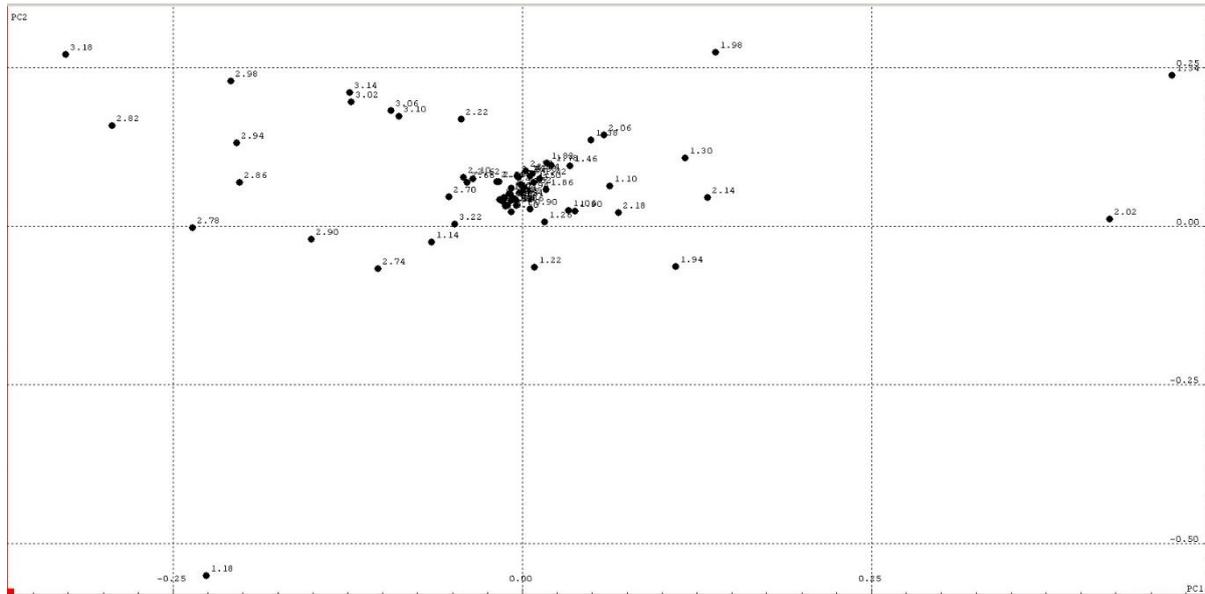


Figura 4.31. Gráfico de pesos de PC1xPC2 da região de 3,2 a 0,5 ppm dos espectros de RMN de ^1H dos méis autênticos (*M. seminigra* e *M. interrupta*), comerciais de abelhas sem ferrão e comerciais de *A. mellifera*.

Em todas as análises realizadas comparando os méis autênticos e comerciais, somente dois méis comerciais de abelhas sem ferrão (MS-D e MS-E) mostraram semelhança e se agruparam aos méis autênticos de abelhas sem ferrão, coletados no meliponário do INPA. Enfim, todos os resultados obtidos com a quimiometria nos mostram que estão sendo comercializados méis de *A. mellifera* como sendo de abelhas sem ferrão, isso ocorre pois a produção de mel por abelhas *A. mellifera* é muito superior aos de abelhas sem ferrão e o valor deste último cerca de 10 vezes maior.

Foram realizadas outras análises na tentativa de visualizar diferenças entre as duas espécies estudadas (*M. seminigra* e *M. interrupta*), no entanto os resultados não mostraram uma separação entre os méis das espécies em questão. Na figura 4.32 é possível notar os gráficos por componentes principais construído com 3 PC's e 95,7 % de variância explicada. Este fato pode ser justificado pelo fato das caixas de criação das abelhas estarem alojadas no mesmo ambiente, ou seja, as plantas visitadas pelas duas espécies de abelhas provavelmente são as mesmas, o que pode ter gerado essa similaridade na composição dos méis. Também não foi observada discriminação entre as espécies por estações climáticas, pois a amostragem para cada período (seco e chuvoso) não foi suficiente para fornecer as

informações necessárias para a separação. Esse problema na aquisição das amostras ocorreu devido as abelhas sem ferrão apresentarem a característica de produzir pouco mel, o que impossibilitou a coleta de um número maior de amostras, uma vez que a maioria das colmeias apresentava quantidade de mel suficiente apenas para alimentação das próprias abelhas.

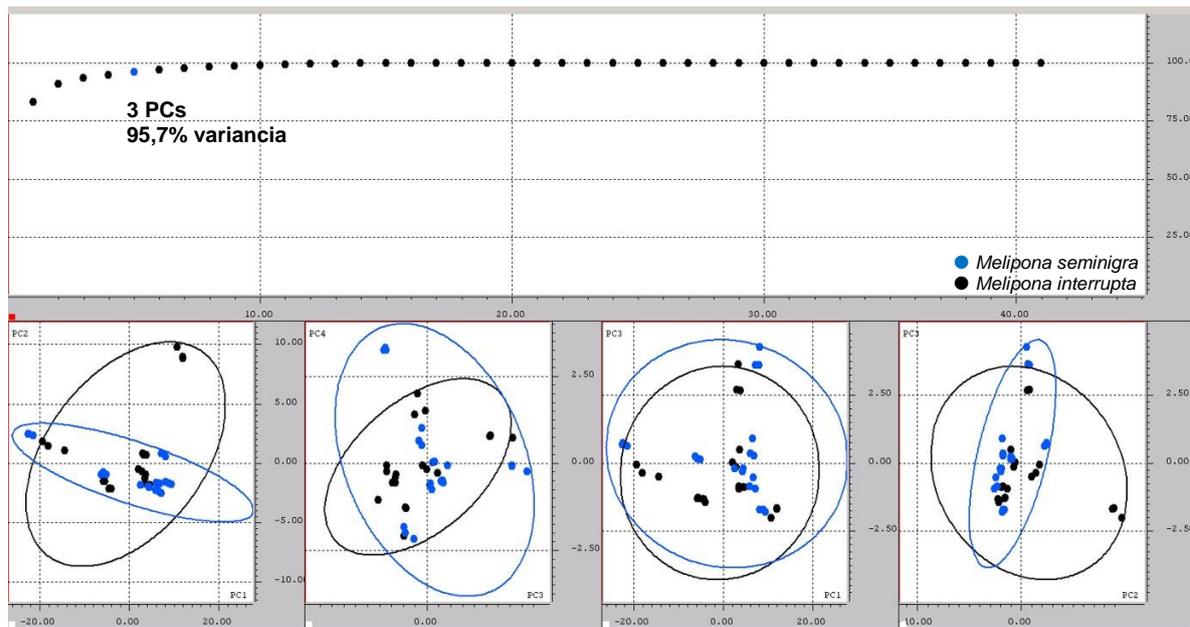


Figura 4.32. Gráficos da variância explicada e de escores dos espectros de RMN de ^1H dos méis autênticos (*M. seminigra* e *M. interrupta*).

4.5 Análise dos constituintes minoritários dos méis por LC-SPE/NMR

4.5.1 Análise dos méis por LC-SPE utilizando partição líquido-líquido como pré-tratamento

O mel é um produto natural cuja maior parte da sua composição é de carboidratos. Logo, para as análises dos seus constituintes minoritários, optou-se pelo uso de duas técnicas de pré-tratamento, com intuito de retirar os açúcares interferentes. A primeira técnica utilizada foi uma partição líquido-líquido, que a princípio apresentou um bom resultado, como pode ser observado nas figuras 4.33 e 4.34, que mostram os cromatogramas obtidos da fração CH_2Cl_2 e AcOEt.

Dessa forma, para a análise dos constituintes minoritários dos méis, foram selecionados os méis MS-BR (MS-BR e MS-BR1) (*Melipona seminigra*) e MI-05 (*Melipona interrupta*), que após a partição líquido-líquido, foram analisados e forneceram os resultados que serão mostrados a seguir.

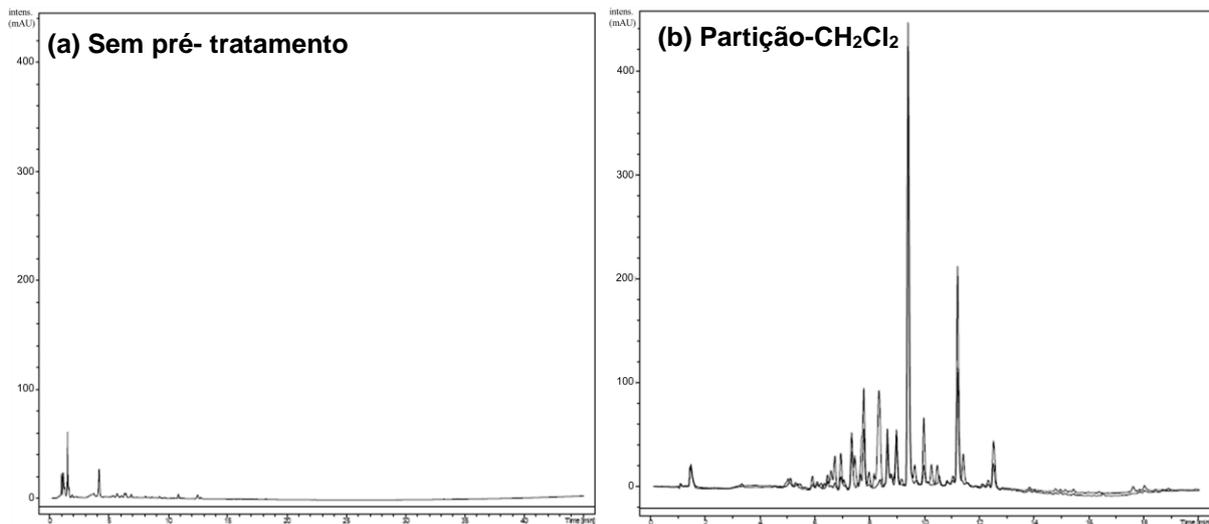


Figura 4.33. Cromatogramas ($\lambda = 254$ e 230 nm) obtidos do mel de *M. seminigra* (MS-BR), com eluição gradiente 5-95% de ACN em 50 min, volume de injeção $30 \mu\text{L}$ e vazão de 1 mL/min . (a) 200 mg/mL e (b) 18 mg/mL , dissolvidos em acetonitrila: água (50:50).

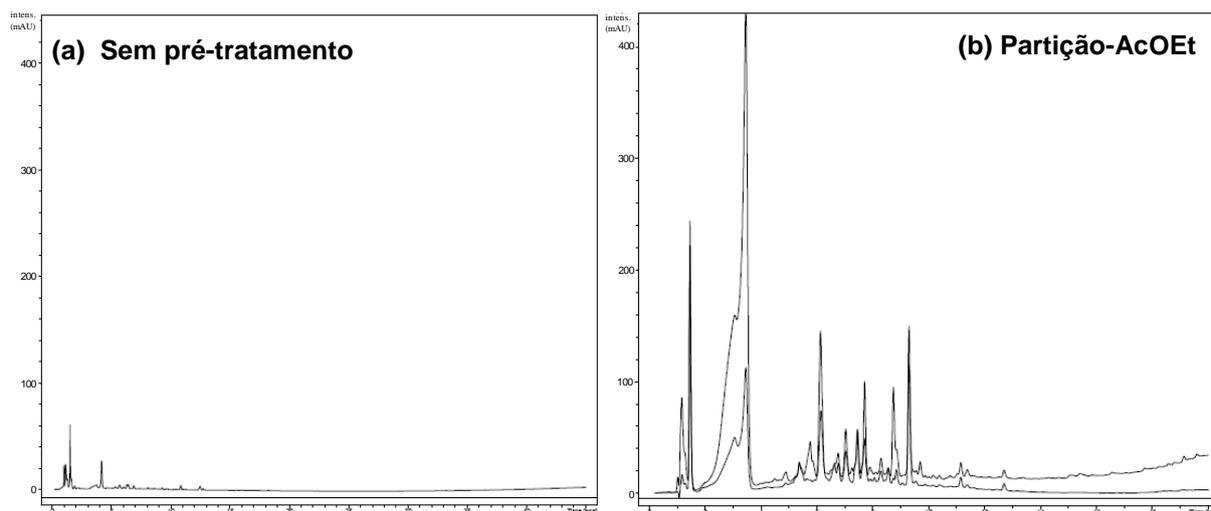


Figura 4.34. Cromatogramas ($\lambda = 254$ e 230 nm) obtidos do mel de *M. seminigra* (MS-BR), com eluição gradiente 5-95% de ACN em 50 min, volume de injeção $30 \mu\text{L}$ e vazão de 1 mL/min . (a) 200 mg/mL e (b) 20 mg/mL , dissolvidos em acetonitrila: água.

4.5.1.1 Análise da Fase CH_2Cl_2 de *Melipona seminigra* (MS-BRD)

Para uma avaliação inicial da fração obtida em diclorometano de MS-BRD, foi realizada uma análise exploratória do perfil cromatográfico dos compostos presentes (figura 4.35). Inicialmente optou-se pelo uso de metanol como modificador orgânico, com gradiente linear: 5-100% de MeOH em 60 min, 100% por mais 5 min; 100-5% em 5 min (retorno do gradiente). A vazão utilizada foi de $0,8 \text{ mL/min}$ e volume de injeção da amostra de $20 \mu\text{L}$. No entanto, o cromatograma obtido em metanol não apresentou boa resolução dos picos (figura 4.36). Sendo assim, optou-se por avaliar acetonitrila como modificador, na busca de um melhor resultado, cujo cromatograma obtido pode ser visualizado na figura 44.

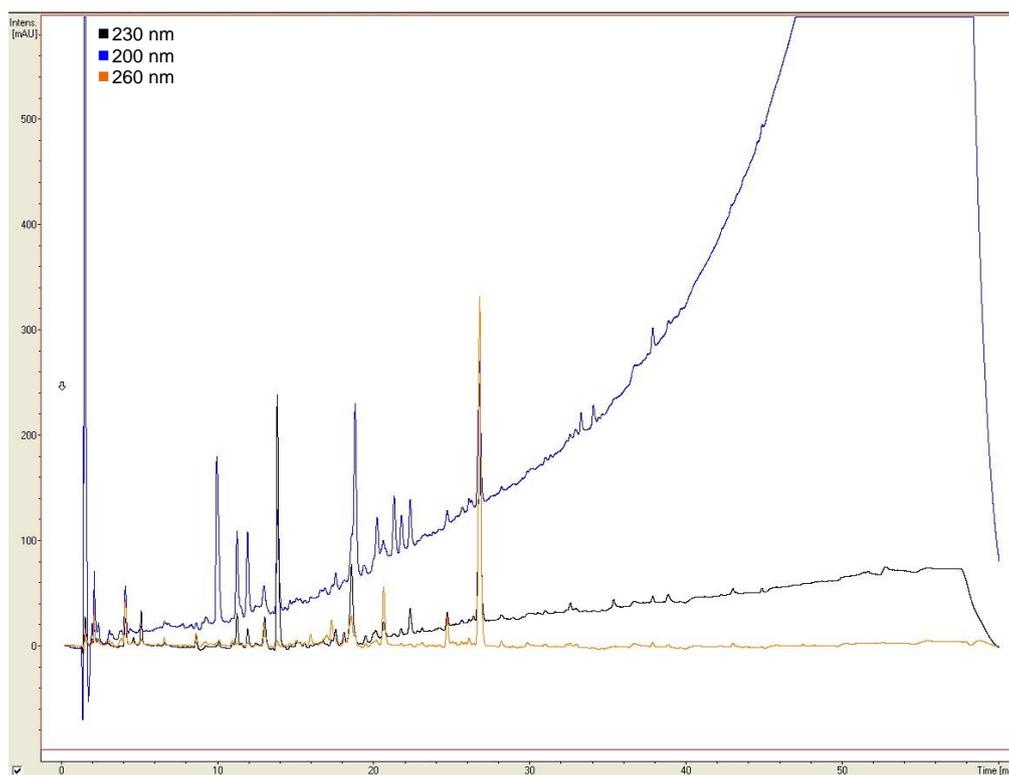


Figura 4.35. Representação gráfica do cromatograma obtido em metanol do extrato diclorometano do mel de *Melipona seminigra* (MS-BRD).

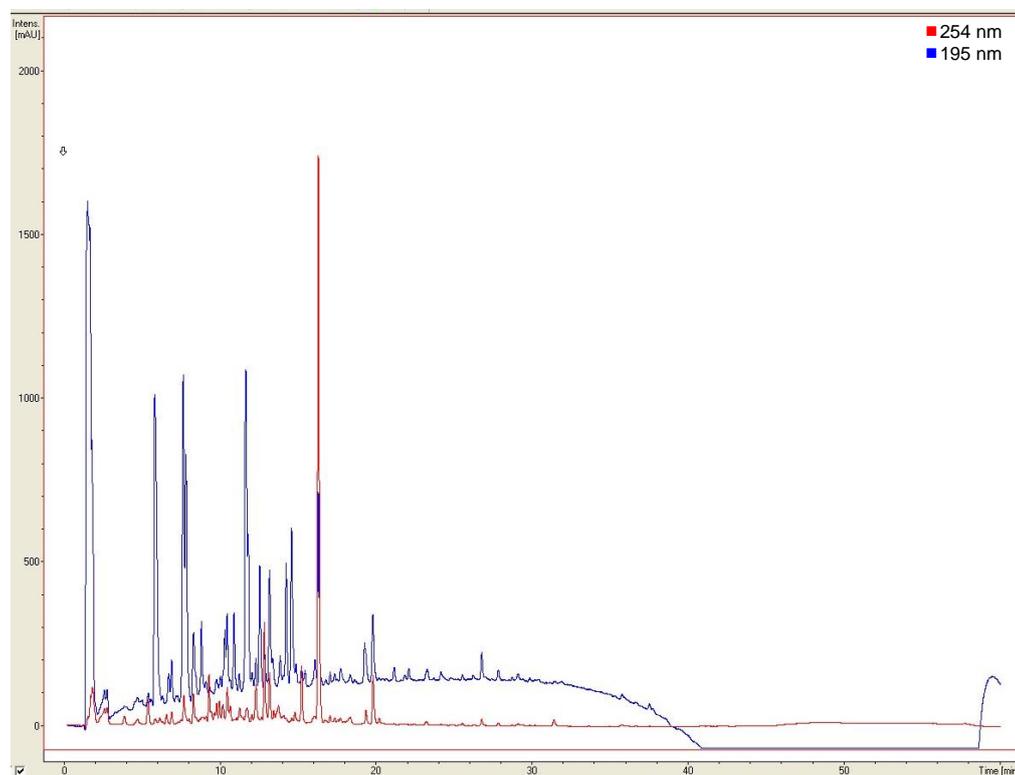


Figura 4.36. Representação gráfica do cromatograma obtido em acetonitrila do extrato diclorometano do mel de *Melipona seminigra* (MS-BRD).

A partir dos resultados obtidos na análise exploratória da fração MS-BRD usando acetonitrila como modificador orgânico (figura 4.36), pôde-se planejar a otimização dos parâmetros na tentativa de adsorver os picos de interesse que aparecem com baixo fator de retenção (k) no cromatograma.

Primeiramente foi realizada uma tentativa de adsorção das bandas cromatográficas de interesse utilizando a fase estacionária, *General Phase (HysphereTM-resin)*, com 30 corridas consecutivas. A otimização do método cromatográfico levou à obtenção do cromatograma representado na figura 45, realizado nas seguintes condições: volume de injeção 30 μ L, vazão 0,8 mL/min, eluente A (H₂O mili-Q, 0,05% de TFA) e eluente B (ACN, 0,05% de TFA). Neste cromatograma (figura 4.37) é possível identificar pelo menos cinco bandas cromatográficas com resolução e intensidade de absorção suficientes para tentativa de adsorção por SPE utilizando o modo de operação *Threshold*. Essas bandas cromatográficas são: MS-BRD1 (tr= 9,1 min), MS-BRD2 (tr= 13,8 min), MS-BRD3 (tr= 17,2 min), MS-BRD4 (17,7 min) e MS-BRD5 (tr= 20,7 min).

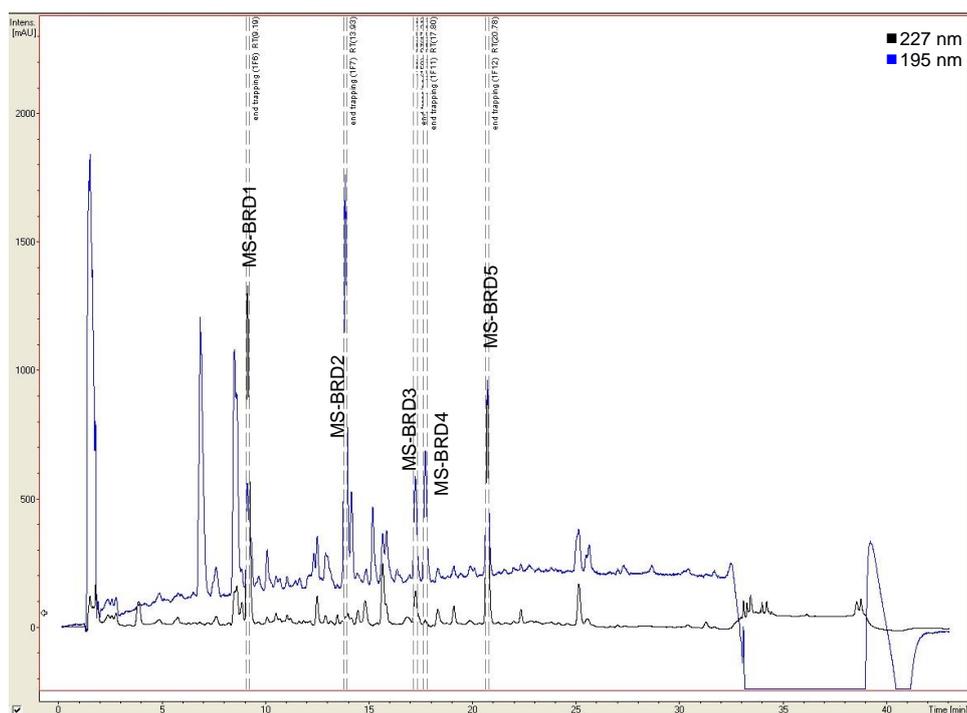


Figura 4.37. Representação gráfica do cromatograma otimizado de MS-BRD e picos selecionados para retenção nos cartuchos de *SPE General Phase (GP)*.

Para todos os picos adsorvidos nessa fração foram realizados experimentos de RMN ¹H para avaliação da retenção no cartucho e determinação inicial da estrutura. A partir desses resultados, observou-se que apenas os picos MS-

BRD2 e MS-BRD5 (tabela 4.7) ficaram retidos nos cartuchos, sendo então submetidos a experimentos de RMN 2D para completa determinação estrutural.

Diante desse resultado optou-se pela utilização de outra fase estacionária nos cartuchos de SPE, na tentativa de adsorver melhor os compostos presentes na fração MS-BRD. Sendo assim, a fase estacionária utilizada foi a *HysphereTM-resin Strong Hydrophobic* (SH) e as amostras MS-BRD6 (tr= 8,4 min), MS-BRD7 (tr= 10,4 min), MS-BRD8 (tr= 15,1 min), MS-BRD9 (tr= 16,8 min), MS-BRD10 (tr= 17,0 min) e MS-BRD11 (tr= 21,4 min) (figura 4.38) foram encaminhadas para análise por RMN. Das seis amostras analisadas, apenas a fração MS-BRD6 não apresentou retenção, indicando que esta ainda não é a fase estacionária ideal para retenção desses analitos. Na tabela 4.7, são descritos todos os compostos isolados e identificados nesta fração.

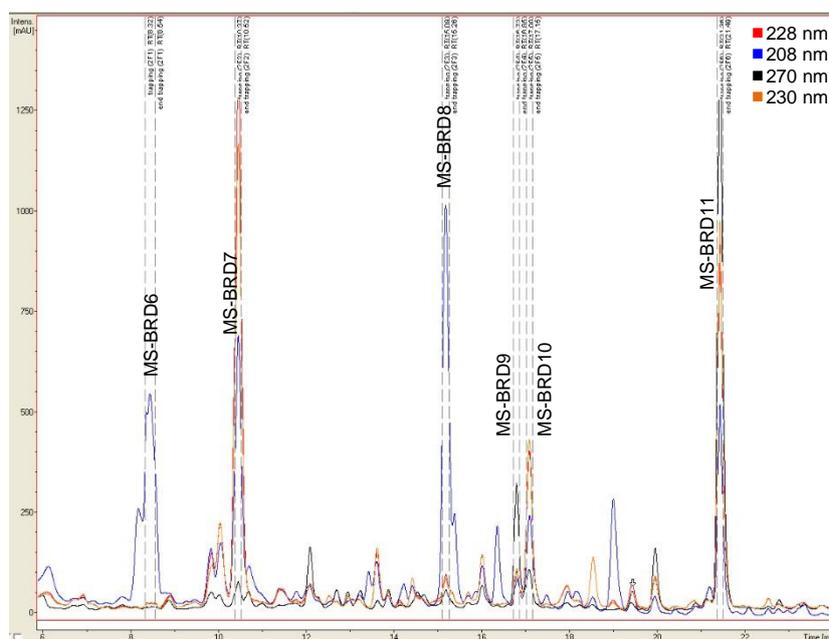
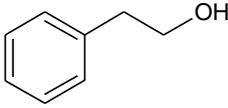
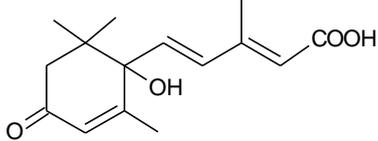
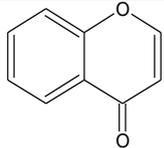
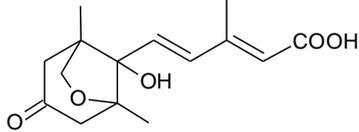
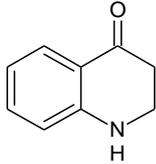


Figura 4.38. Representação gráfica do cromatograma otimizado de MS-BRD e picos selecionados para retenção nos cartuchos de *SPE Strong Hydrophobic*

Tabela 4.7. Estruturas das substâncias identificadas na fase CH₂Cl₂ de MS-BRD.

Fração	Estrutura
MS-BRD2	 Álcool fenético
MS-BRD5	 Ácido abscísico
MS-BRD7	 4H-1-benzopirano-4-ona
MS-BRD8	Álcool fenético (=MS-BRD2)
MS-BRD9	 Ácido faseico
MS-BRD10	 2,3-dihidro-1H-quinolin-4-ona
MS-BRD11	Ácido abscísico (=MS-BRD5)

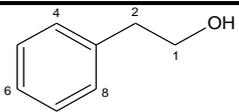
a) Análise do composto presente no pico MS-BRD2 (álcool fenetílico)

O composto presente no pico MS-BRD2 (200 µg) foi eluído do cartucho de SPE com metanol-*d*4 (250 µL) e sua estrutura foi determinada com base nos dados de RMN de ¹H (tabela 4.8) e técnicas bidimensionais COSY (figura 4.40), HSQC (figura 4.41) e HMBC (figura 4.42).

No espectro de RMN de ¹H (figura 3.39) do composto MS-BRD2, observam-se sinais característicos de um anel aromático monosubstituído. A presença de dois duplo dubletos acoplando em 13,8 Hz, cada um integrando para um, mostra a presença de um grupo metileno que correlaciona no HSQC (figura 4.41) com o sinal em 42,0 ppm. Esse mesmo hidrogênio em δ 2,86 apresenta correlação no HMBC com os carbonos em 73,7 ppm e 139,6 ppm, evidenciando a presença de uma hidroxila no carbono vizinho a lado e um carbono do anel aromático do outro lado. Esses dados então foram compatíveis com a estrutura do álcool fenetílico.

Apesar de muito simples, este álcool primário ocorre amplamente na natureza, podendo ser encontrado em uma variedade de óleos essenciais. Além de apresentar um aroma característico de rosa e mel, possui propriedades bactericidas (CORRE et al., 1990), além de ser considerado conservante e antisséptico (OWSTON E LOUGH, 1981). É importante ressaltar que essas características que o composto apresenta, torna-se extremamente importante para proteção das colmeias.

Tabela 4.8. Dados espectroscópicos para o composto presente em MS-BRD2 (álcool fenetílico) (¹H 600 MHz, ¹³C 150 MHz, 200 µg em 250 µL de MeOD).



H/C	δ _H (ppm) , J (Hz)	δ _C (ppm)*	COSY	HMBC
1	4,25 (<i>tt</i>)	73,7	H-2	-
2a	3,11 (<i>dd</i> , 13,80 e 3,20)	42,0	H-2b	C4
2b	2,86 (<i>dd</i> , 13,80 e 7,90)	42,0	H-2a	C1, C3, C4
3	-	139,6	-	-
4/8	7,26- 7,29 (<i>m</i>)	130,5	-	C2, C6, C8
5/7	7,21-7,25 (<i>m</i>)	129,1	-	C7, C3, C4
6	7,13-7,17 (<i>m</i>)	127,2	-	-

*Dados extraídos do mapa de correlação HSQC.

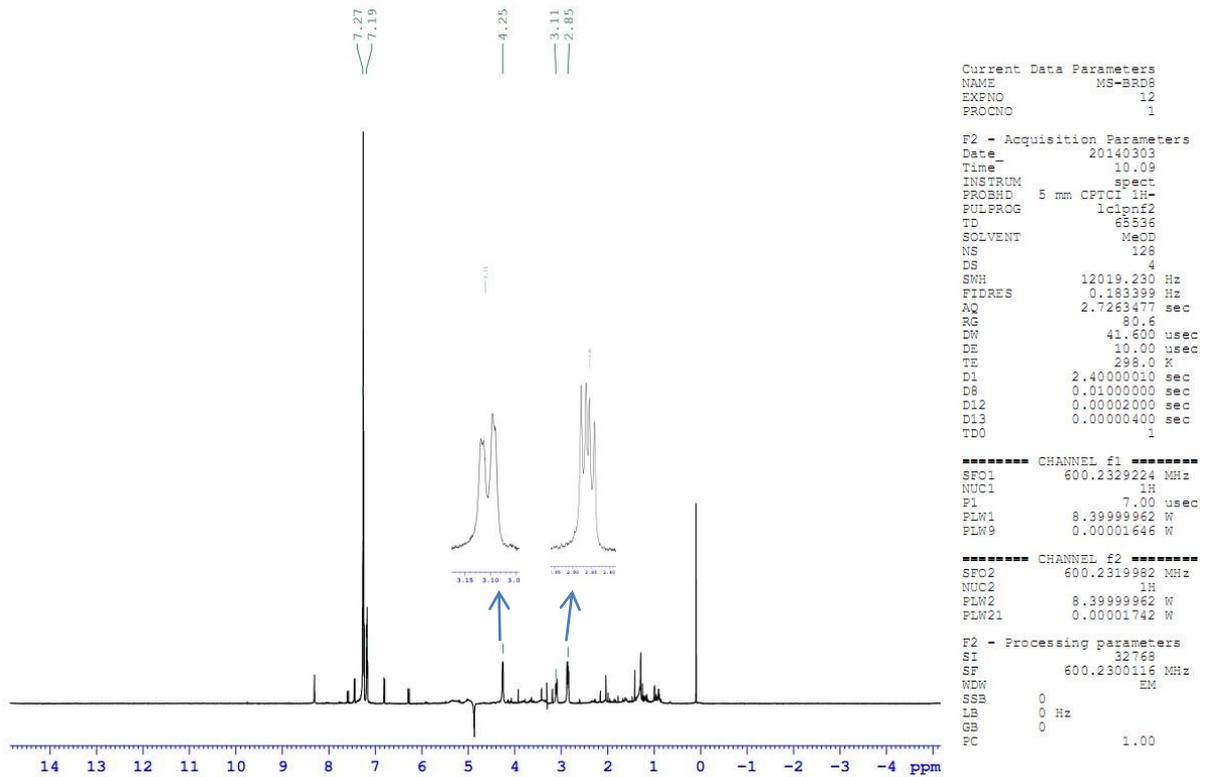


Figura 4.39. Espectro de RMN de ¹H do álcool fenético. Sequência de pulsos com dupla pré-saturação: lc1pnf2 (nomenclatura Bruker).

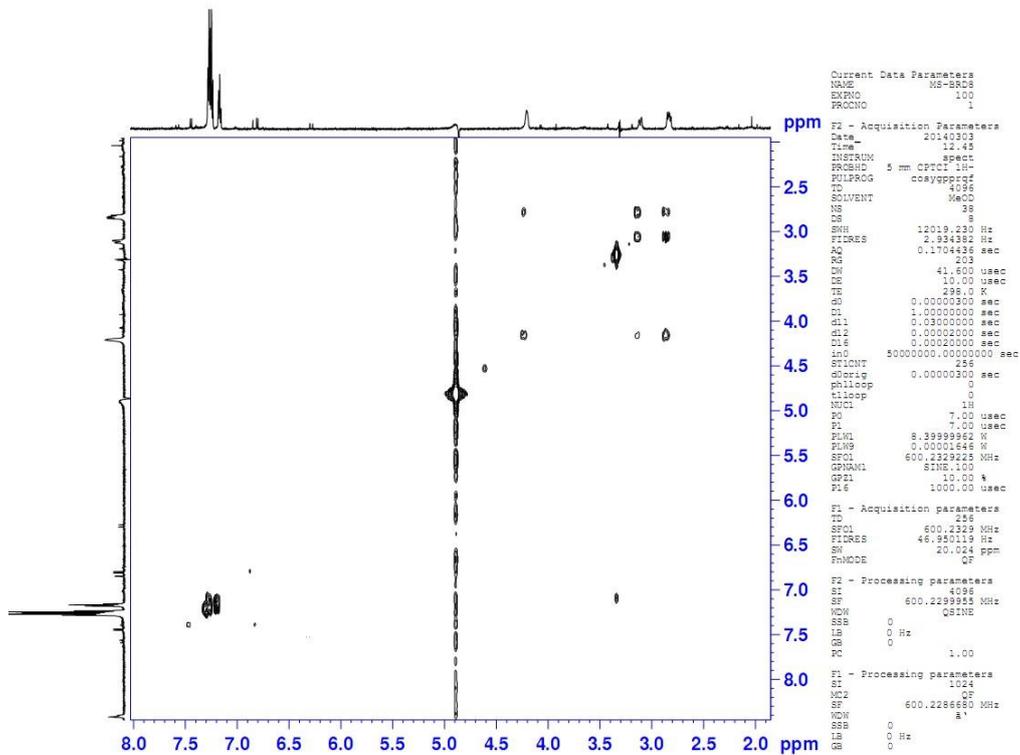


Figura 4.40. Mapa de correlação COSY do álcool fenético.

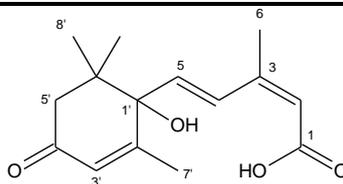
b) Análise do composto presente no pico MS-BRD5 (ácido *trans*, *cis*-abscísico).

A fração identificada como MS-BRD5 foi eluída do cartucho com metanol-d4 e analisada por RMN, onde foram obtidos os espectros de ^1H (figura 4.43), COSY (figura 4.44), HSQC (figura 4.45) e HMBC (figura 4.46). O espectro de RMN de ^1H (tabela 4.9) foi obtido utilizando a sequência de pulsos de dupla pré-saturação, denominada lc1pnf2 (nomenclatura Bruker).

De acordo com a análise do espectro de RMN de ^1H , observou-se a presença de um ciclo de 6 átomos com substituições características de um ácido previamente relatado em méis de abelhas sem ferrão, o ácido abscísico, (DA SILVA et al., 2013, SILVA et al., 2013). No espectro de ^1H (figura 4.43) observa-se a presença de quatro metilas (δ 1,07, δ 1,03, δ 1,93 e δ 2,04). Dessas, δ 1,07 e δ 1,03 apresentam as mesmas correlações no HMBC, deixando em evidência que ambas estariam ligadas ao mesmo carbono. Ainda no HMBC é possível notar que a metila em δ 1,93 apresenta correlação a J_2 com o carbono em δ 166,0 e a J_3 com δ 127,5. Este último ligado ao hidrogênio em δ 5,92, que apresenta correlação com a carbonila em δ 199,0 e com o carbono metilênicos δ 50,5. Os valores de deslocamentos químicos de H-4 (7,78 ppm) e H-6 (2,04 ppm) quando comparados com a literatura (FERRERES et al., 1996), evidenciam o sistema *cis* entre as ligações 2-3. Todas essas informações e as apresentadas na tabela 4.14, levaram à conclusão que de fato o composto obtido em MS-BRD5 trata-se do ácido *trans*,*cis*-abscísico.

É importante destacar que esse ácido, é na verdade um hormônio vegetal, que pode estar relacionado à germinação, ao crescimento e ao estresse hídrico da planta a partir do qual o mel foi recolhido. Por exemplo, sob condições de estresse quando o solo está secando e o potencial hídrico das folhas está afetado, o ácido abscísico normalmente acumulado nas raízes é transportado para a parte aérea, onde ele atua nas atividades meristemáticas e ajuda a planta a lidar com a situação de estresse (JIANG & HARTUNG, 2008).

Tabela 4.14. Dados espectroscópicos para o composto presente em MS-BRD5 (ácido *trans, cis*-abscísico) (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, 200 μg em 250 μL de MeOD).



H/C	δ_{H} (ppm) , J (Hz)	δ_{C} (ppm)*	COSY	HMBC
1	-	169,2		-
2	5,75 (<i>sl</i>)	119,2	H-3	C1, C4, C6
3	-	150,9		-
4	7,78 (<i>d</i> ,16,1)	129,3	H-5'	C1', C2, C3, C5, C6
5	6,25 (<i>d</i> ,16,1)	137,9		C1', C2', C6', C3, C4
6	2,04 (<i>d</i> , 1,2)	21,1		C2, C3, C4
1'	-	80,5		-
2'	-	166,2		-
3'	5,91-5,93 (<i>m</i>)	127,4	H-7'	C1', C5', C7'
4'	-	200,9		-
5a'	2,54 (<i>d</i> , 16,6)	50,5		C1', C4', C6', C8'
5b'	2,19 (<i>d</i> , 16,6)	50,5		C1', C3', C4', C6', C8'
6'	-	42,6		-
7'	1,93 (<i>d</i> , 1,3)	19,5		C1', C2', C3'
8'	1,07 (<i>s</i>)	23,3		C1', C5', C6', C9'
9'	1,03 (<i>s</i>)	24,5		C1', C5', C6', C8'

*Dados extraídos do mapa de correlação HSQC. *sl*- singlete largo

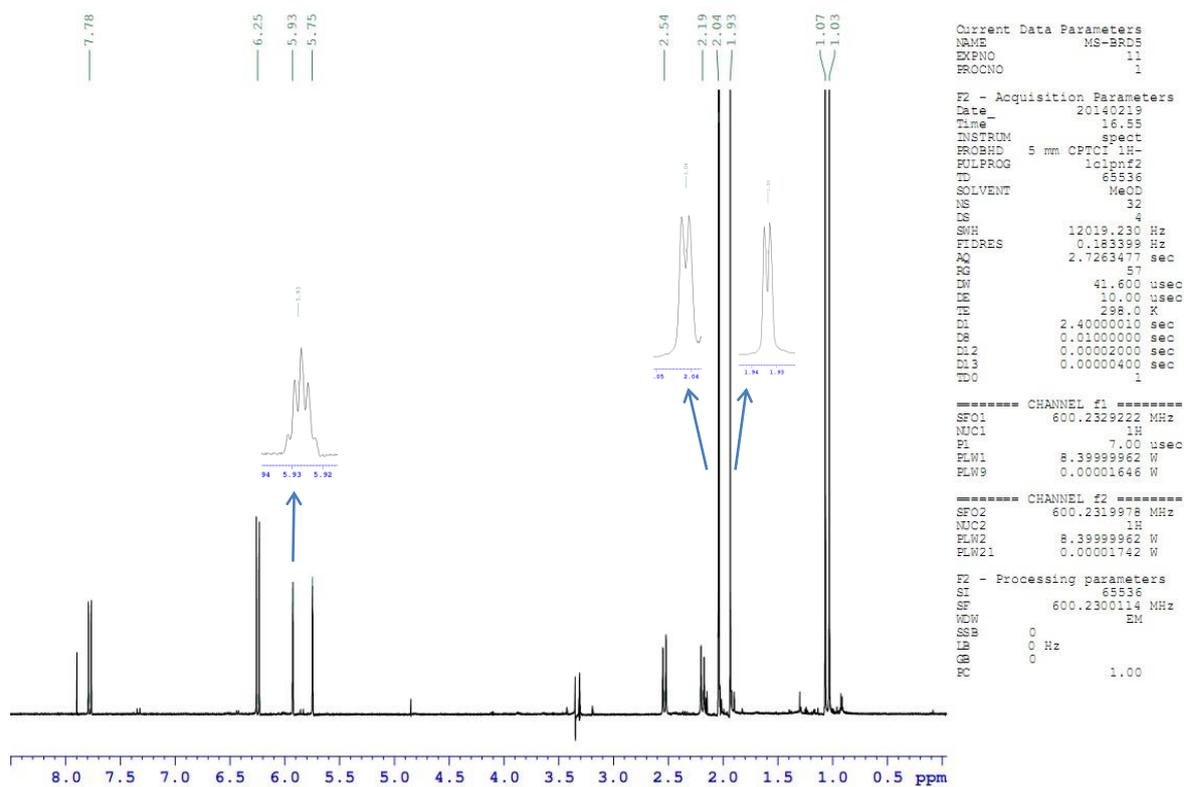


Figura 4.43. Espectro de RMN de ^1H do ácido *trans, cis*-abscísico.

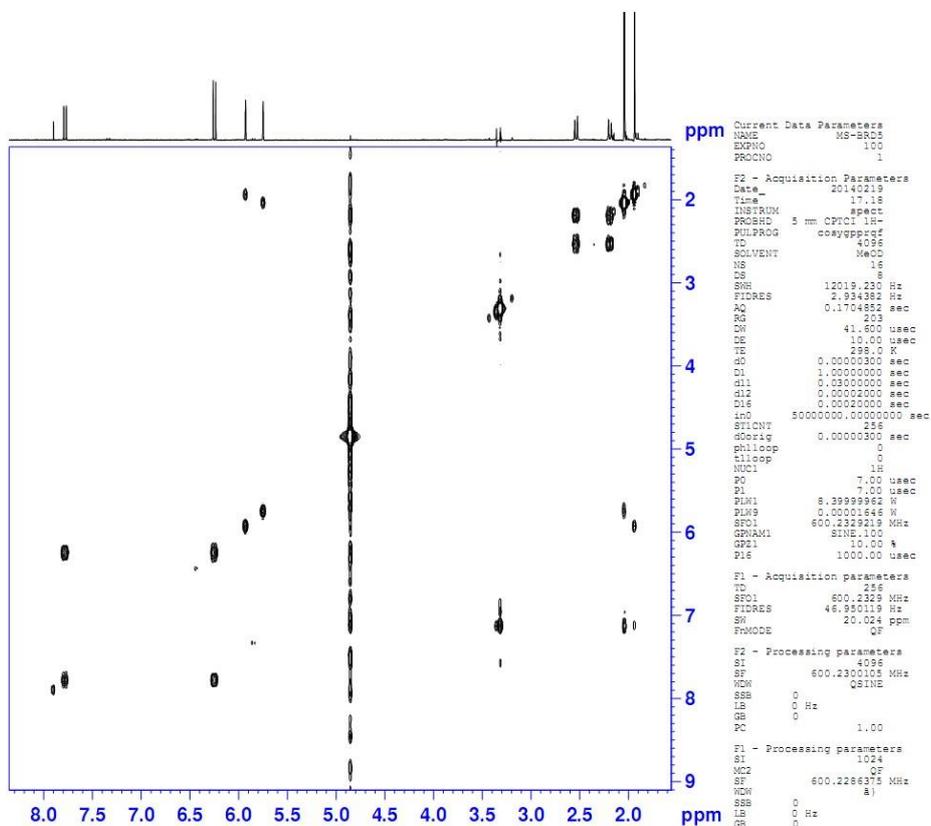


Figura 4.44. Mapa de correlação COSY do ácido *trans, cis*-abscísico.

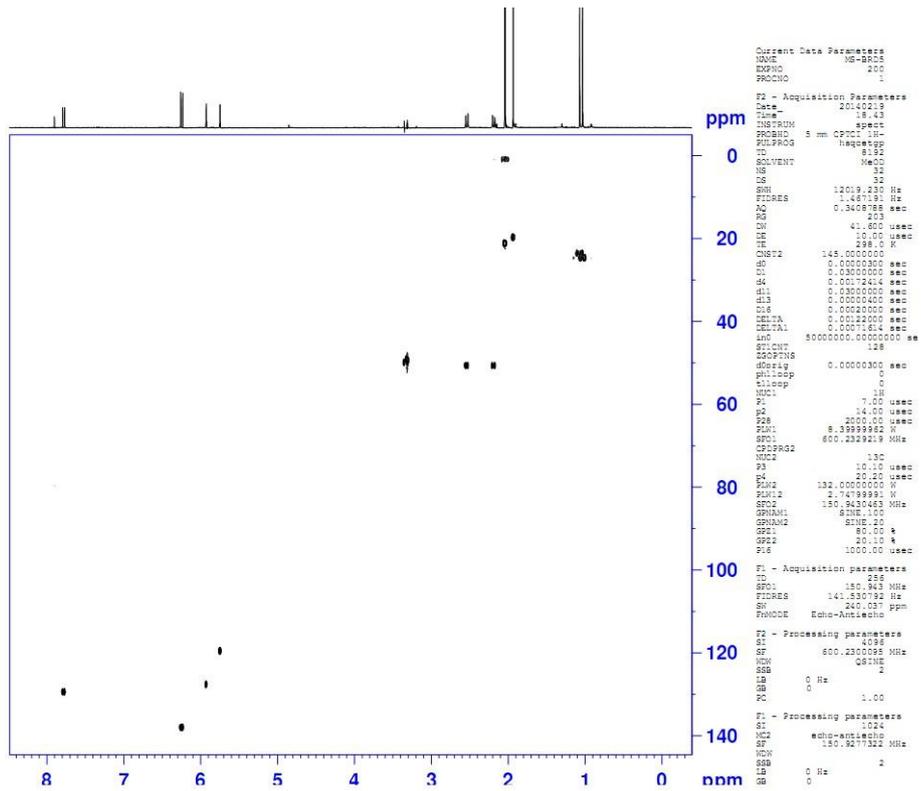


Figura 4.45. Mapa de correlação HSQC do ácido *trans, cis*-abscísico.

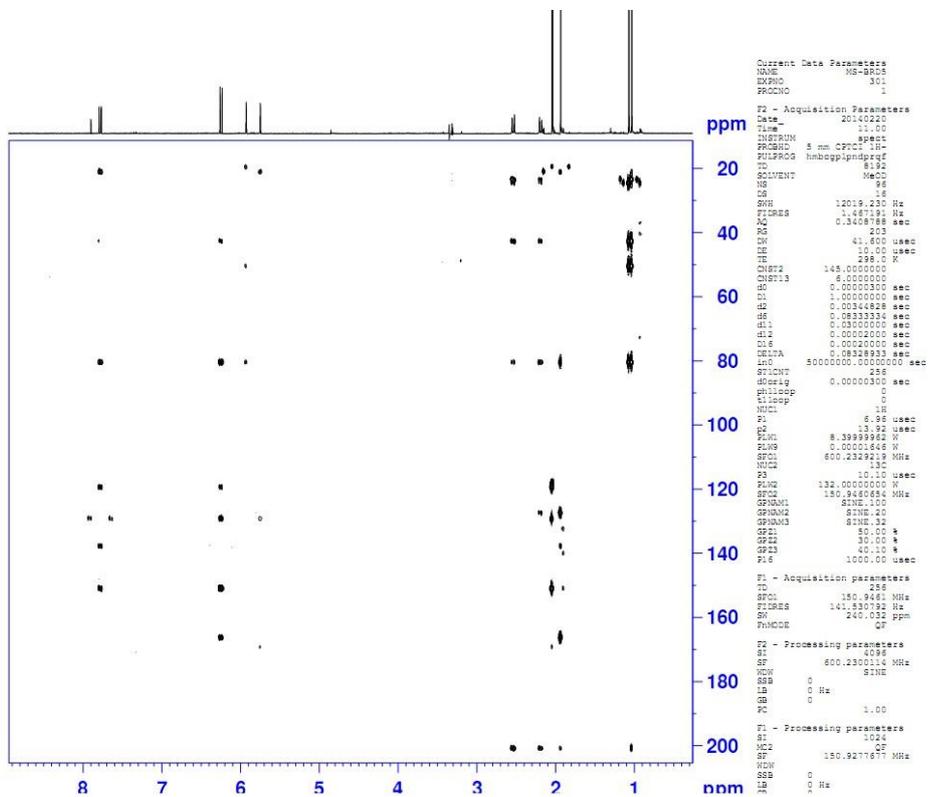
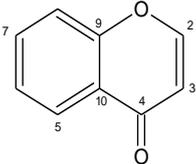


Figura 4.46. Mapa de correlação HMBC do ácido *trans, cis*-abscísico.

c) Análise do composto presente no pico MS-BRD7 (4H-1-benzopiran-4-ona).

O composto majoritário presente na fração MS-BRD7, foi identificado através da análise dos dados de RMN dos espectros de ^1H (tabela 4.10), COSY (figura 4.48), HSQC (figura 4.49) e HBMC (figura 4.50). É possível observar no espectro de RMN de ^1H (figura 4.47) a presença de um par de dubletos acoplando com constante de 7,5 Hz, evidenciando a presença de hidrogênios com configuração Z. Também verifica-se a presença de sinais de hidrogênios aromáticos, na faixa de δ 8,27 - δ 7,61. Essas informações aliadas aos dados obtidos nos experimentos 2D, levou à identificação da cromona 4H-1-benzopiran-4-ona, relatada a primeira vez em méis.

Tabela 4.10. Dados espectroscópicos para o composto majoritário presente em MS-BRD7 (4H-1-benzopiran-4-ona) (600/ 150 MHz, 200 μg em 250 μL de MeOD).



H/C	δ_{H} (ppm) , J (Hz)	δ_{C} (ppm)*	COSY	HMBC
2	8,02 (<i>d</i> ,7,5)	141,7	H-3	C3, C4
3	6,40 (<i>d</i> ,7,5)	109,5	-	C2, C10
4	-	180,0	-	-
5	8,25- 8,28 (<i>m</i>)	126,1	H-6	C4, C7, C9
6	7,43- 7,48 (<i>m</i>)	125,5	H-7	C8, C10
7	7,72-7,77 (<i>m</i>)	133,6	-	C5
8	7,60- 7,63 (<i>m</i>)	119,4	-	C6
9	-	141,5	-	-
10	-	126,3	-	-

*Dados extraídos do mapa de correlação HSQC.

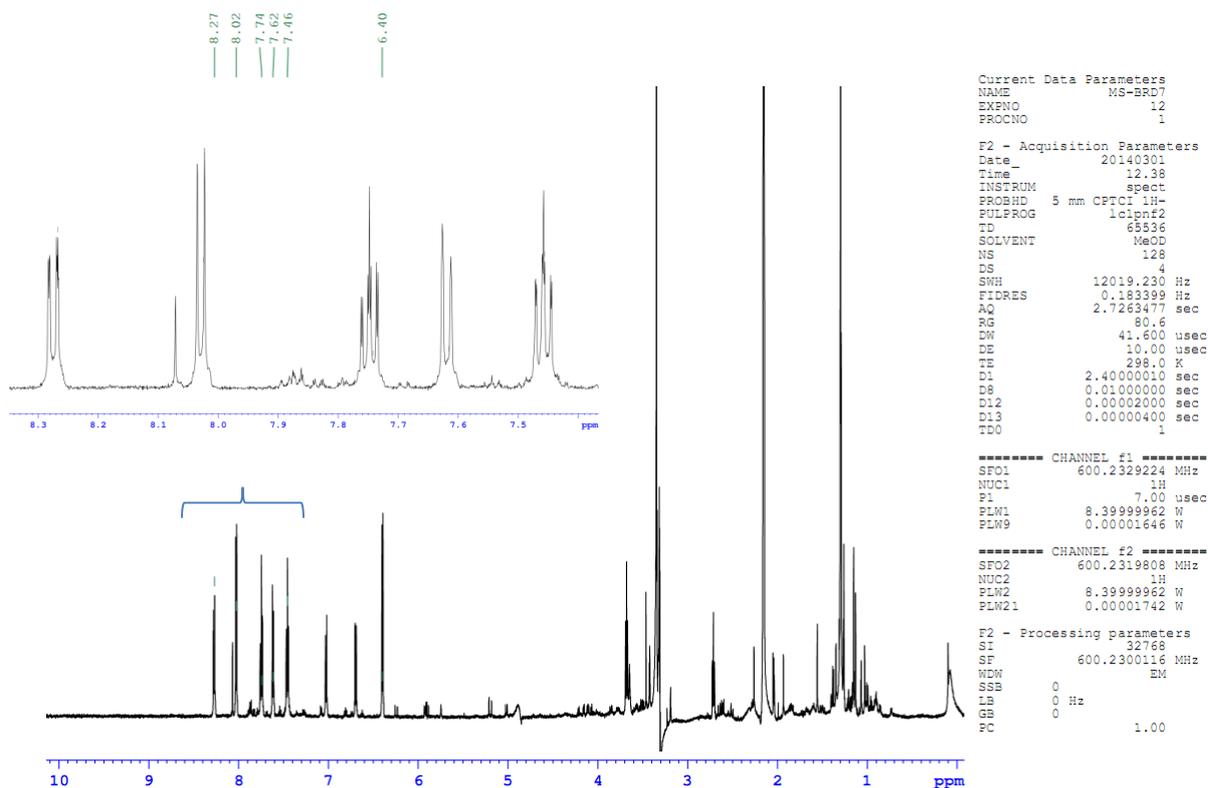


Figura 4.47. Espectro de RMN de ^1H de 4H-1-benzopirran-4-ona. Dados obtidos utilizando a sequência de pulsos com dupla pré-saturação: lc1pnf2 (nomenclatura Bruker).

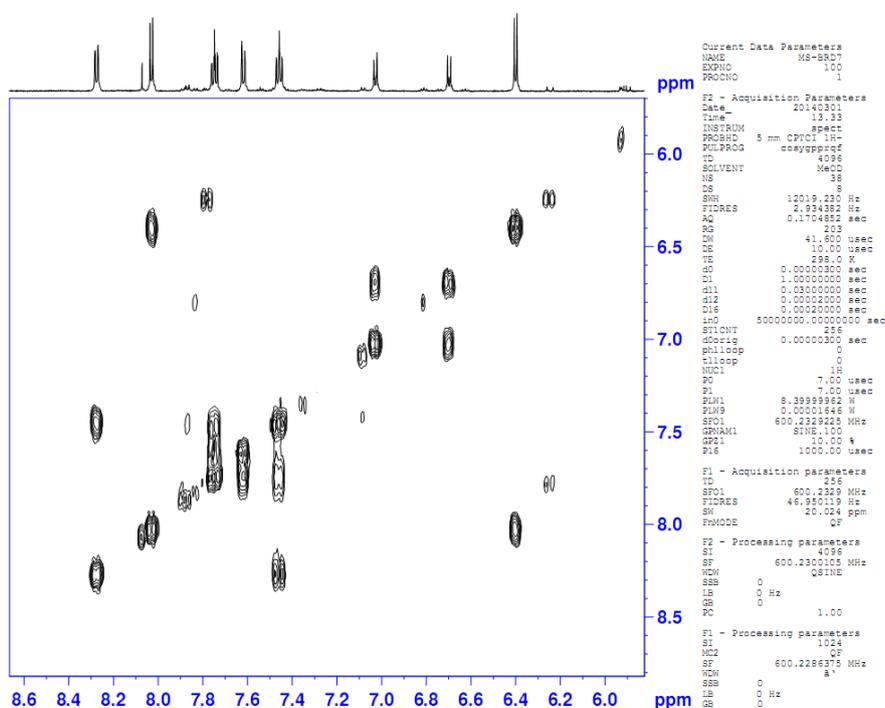


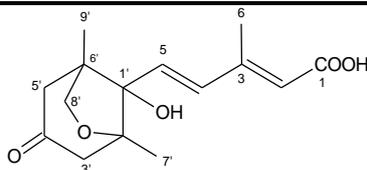
Figura 4.48. Mapa de correlação COSY do composto majoritário da fração MS-BRD7 (4H-1-benzopirran-4-ona).

d) Análise do composto presente no pico MS-BRD9 (ácido faseico).

A fração identificada como MS-BRD9 foi eluída do cartucho com metanol-d4 e submetida à análise por RMN. Foram obtidos os espectros de ^1H (figura 4.51), COSY (figura 4.52), HSQC (figura 4.53) e HMBC (figura 4.54). No espectro de RMN de ^1H (tabela 4.11) observou deslocamentos químicos e multiplicidades semelhantes aos obtidos para o ácido abscísico. No entanto, a presença de três grupos metilênicos indicou a presença de um biciclo na estrutura. Os hidrogênios δ 3,94 e δ 3,66 atribuídos à posição 8', mostram correlação no HMBC com os carbonos C1', C2', C6', C5' e C9', comprovando a sua posição no biciclo.

Esses dados aliados aos dados obtidos dos experimentos 2D, levaram à identificação do composto denominado ácido faseico. Tal como o ácido abscísico, o ácido faseico é conhecido por apresentar atividades reguladoras do crescimento de plantas, mas em uma magnitude menor, cerca de 1% da atividade do ácido abscísico (MACMILLAN e PRYCE, 1969). Este é o primeiro relato de ácido faseico em mel.

Tabela 4.11. Dados espectroscópicos para o composto presente em MS-BRD9 (ácido faseico) (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, 200 μg em 250 μL de MeOD).



H/C	δ_{H} (ppm) , J (Hz)	δ_{C} (ppm)*	COSY	HMBC
1	-	174,2	-	-
2	5,80 (<i>s/l</i>)	120,8	H-6	C1
3	-	149,6	-	-
4	8,07 (<i>d</i> ,16,0)	133,0	H-5	C2', C2, C3
5	6,42 (<i>d</i> ,16,0)	132,7	-	C2', C3, C4
6	2,05 (<i>s/l</i>)	20,9	-	C2, C3, C4
1'	-	87,7	-	-
2'	-	82,7	-	-
3a'	2,81 (<i>d</i> , 17,8)	53,9	H-7'	C1', C4'
3b'	2,47 (<i>dd</i> , 17,8 e 2,8)	53,9	-	C2', C4', C5'
4'	-	210,8	-	-
5a'	2,71 (<i>dd</i> , 18,0 e 2,8)	53,1	-	C6'
5b'	2,38 (<i>dd</i> , 18,0 e 2,8)	53,1	-	C2', C4', C6'
6'	-	49,3	-	-
7'	1,21 (<i>s</i>)	19,3	-	C1', C2', C4'
8a'	3,94 (<i>d</i> , 7,6)	78,5	H-5a'	C5', C6', C9'
8b'	3,66 (<i>d</i> , 7,6)	78,5	-	C1', C2', C5', C6'
9'	1,01 (<i>s</i>)	15,5	-	C2', C4', C8'

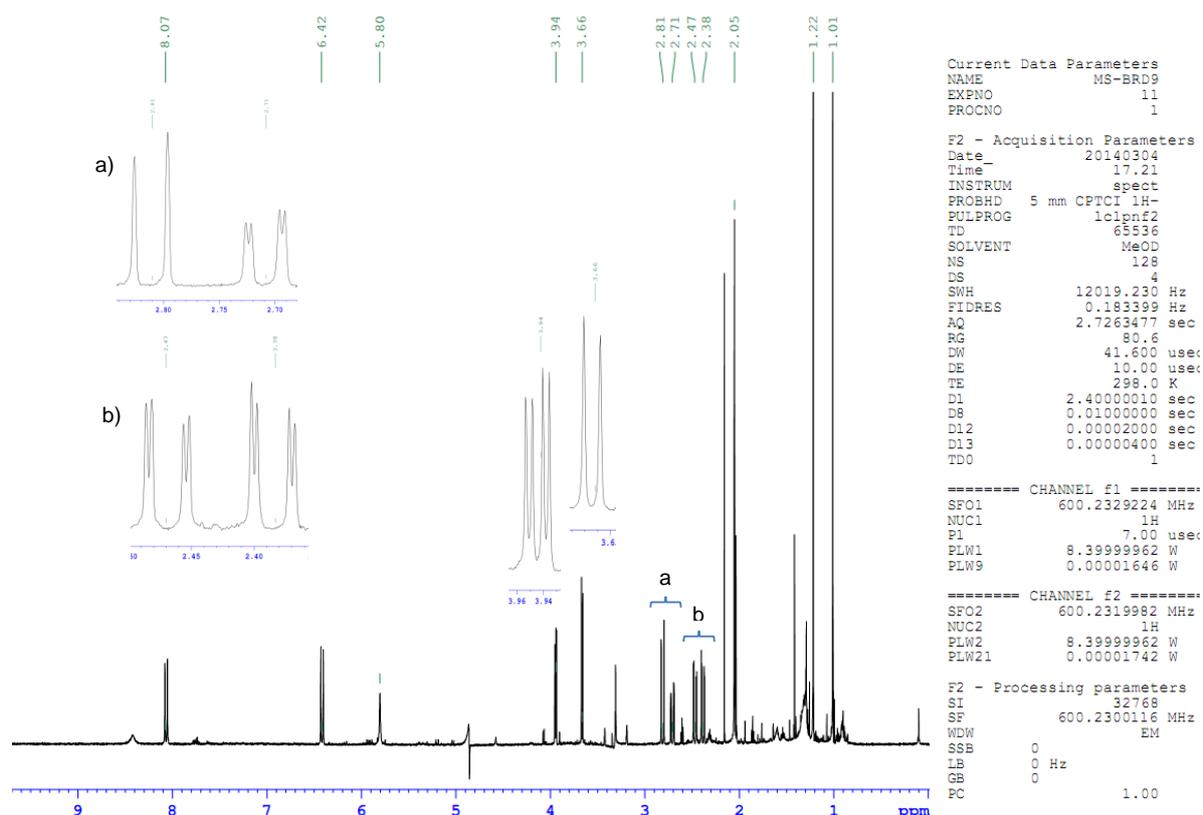


Figura 4.51. Espectro de RMN de ¹H e expansões do ácido faseico. Dados obtidos utilizando a sequência de pulsos com dupla pré-saturação: lc1pnf2 (nomenclatura Bruker).

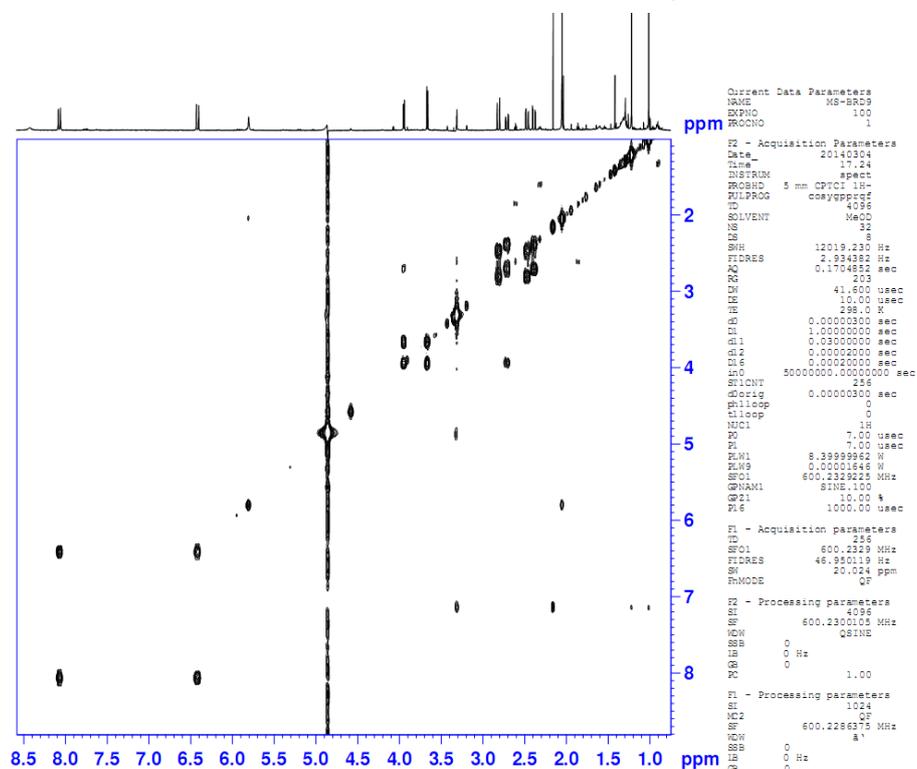


Figura 4.52. Mapa de correlação COSY do ácido faseico

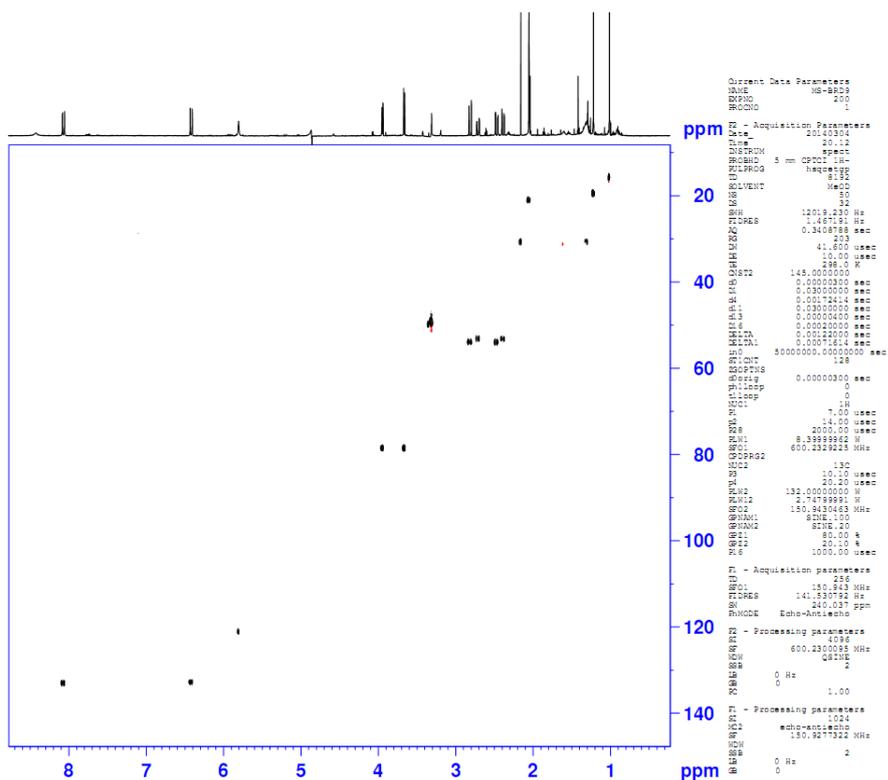


Figura 4.53. Mapa de correlação HSQC do ácido faseico.

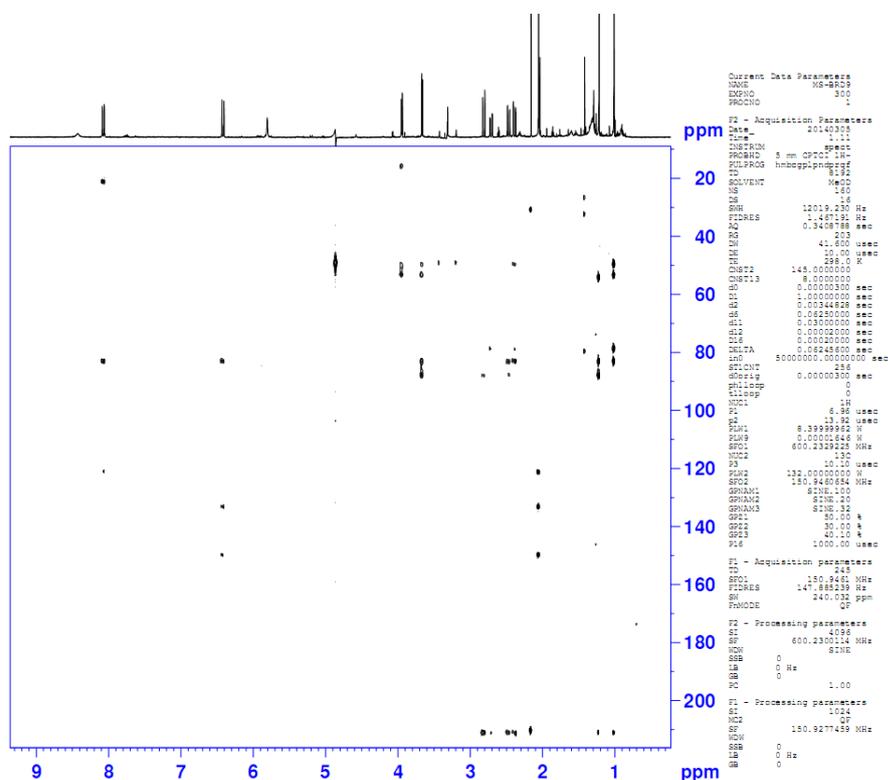


Figura 4.54. Mapa de correlação HMBC do ácido faseico.

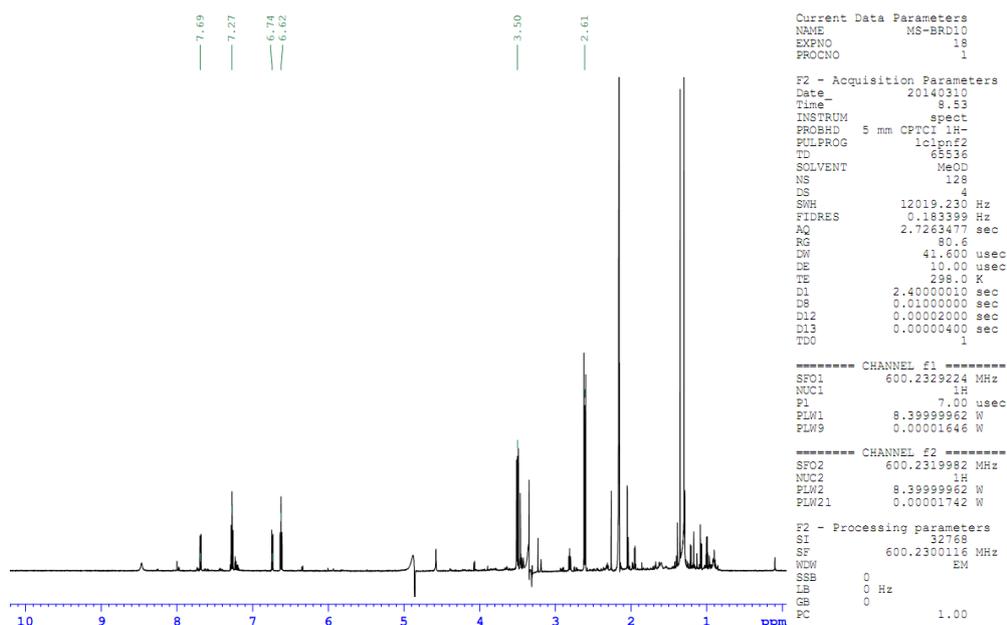
e) Análise do composto presente no pico MS-BRD10 (2,3-dihidro-1H-quinolin-4-ona).

A fração MS-BRD10 foi extraída do cartucho de SPE utilizando-se metanol-d4 e posteriormente submetida à análise por RMN através dos dados obtidos nos espectros de ^1H (figura 4.55), COSY (figura 4.56), HSQC (figura 4.57) e HMBC (figura 4.58). O espectro de RMN de ^1H (tabela 4.12) foi adquirido utilizando a sequência de pulsos de dupla pré-saturação, denominada lc1pnf2 (nomenclatura Bruker). Na figura 63 é possível notar a presença de dois multipletos (δ 3,50 e δ 2,61) integrando para 2H, cada, além de sinais característicos de hidrogênios aromáticos, cujos deslocamentos foram compatíveis com o alcaloide quinolínico, 2,3-dihidro-1H-quinolin-4-ona. Os demais dados espectroscópicos podem ser visualizados na tabela a seguir. É interessante ressaltar que esta substância ainda não havia sido relatada em méis.

Tabela 4.12. Dados espectroscópicos para o composto presente em MS-BRD10 (2,3-dihidro-1H-quinolin-4-ona) (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, 100 μg em 250 μL de MeOD).

H/C	δ_{H} (ppm) , J (Hz)	δ_{C} (ppm)*	COSY	HMBC
2	3,48-3,51 (<i>m</i>)	42,6	H-3	C3, C4, C9
3	2,59-2,62 (<i>m</i>)	38,6	-	C2, C4
4	-	196,0	-	-
5	7,69 (<i>d</i> , 8,0 e 1,6)	128,0	H-6	C7, C9
6	6,60-6,64 (<i>m</i>)	117,8	H-7	C8, C10
7	7,25-7,29 (<i>m</i>)	136,4	-	C5, C9
8	6,74 (<i>d</i> , 8,4 e 1,0)	117,1	-	C6, C10
9	-	154,8	-	-
10	-	119,2	-	-

*Dados extraídos do mapa de correlação HSQC.



q'1

Figura 4.55. Espectro de RMN de ^1H do composto majoritário da fração MS-BRD10 (2,3-dihidro-1H-quinolin-4-ona). Dados obtidos utilizando a sequência de pulsos com dupla pré-saturação: lc1pnf2 (nomenclatura Bruker)

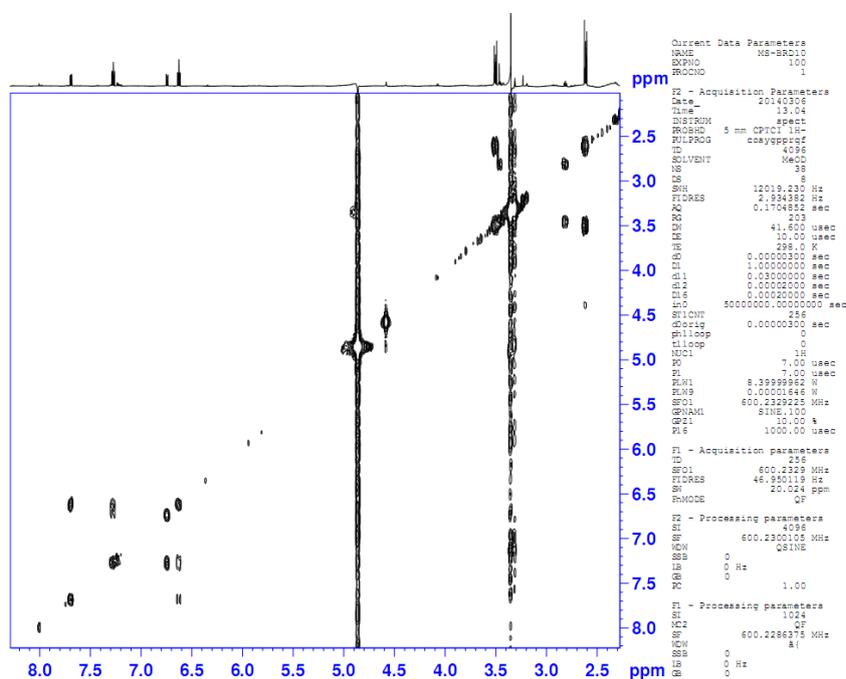


Figura 4.56. Mapa de correlação COSY do composto majoritário da fração MS-BRD10 (2,3-dihidro-1H-quinolin-4-ona).

4.5.1.2 Análise da fase acetato de etila de *Melipona seminigra* (MS-BRA)

Inicialmente a fração obtida em acetato de etila (MS-BRA) foi avaliada através de uma corrida cromatográfica exploratória, utilizando metanol como modificador orgânico. Cujas condições foram: gradiente linear: 5-100% de MeOH em 60 min, 100% por mais 5 min; 100-5% em 5 min (retorno do gradiente); vazão de 0,8 mL/min e volume de injeção da amostra de 20 μ L. No entanto, com base nos resultados obtidos observou-se que não houve uma boa separação com resolução de linha base, com a qual fosse possível selecionar os picos para serem adsorvidos nos cartuchos de SPE. Por sua vez os resultados obtidos quando se utilizou acetonitrila como modificador orgânico (figura 4.59), mostraram melhores condições para seleção dos picos cromatográficos.

A partir destes resultados, foi possível desenvolver um método que melhor atendesse a necessidade de seleção dos picos com menores fatores de retenção (k). Na figura 4.60 é possível notar os picos que foram selecionados, MS-BRA1, MS-BRA2, MS-BRA3, MS-BRA4 e MS-BRA5. Todas as frações obtidas foram inicialmente analisadas por RMN 1 H. Com esse resultado, observou-se que apenas MS-BRA1 não apresentou retenção no cartucho de SPE e as demais frações através dos dados de RMN 2D e comparação com as substâncias previamente identificadas na fase diclorometano, forneceram as mesmas substâncias relatadas na fase diclorometano, as quais são mostradas na tabela 4.13.

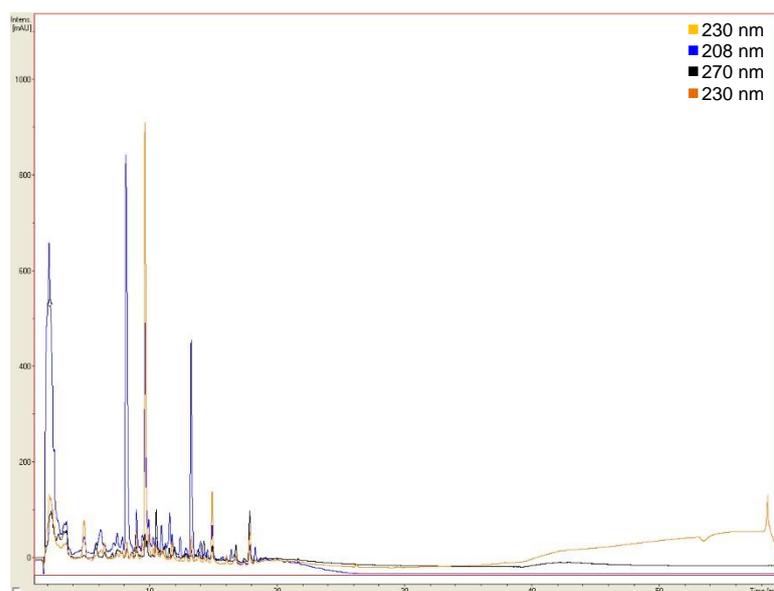


Figura 4.59. Cromatograma obtido em acetonitrila como modificador orgânico do extrato acetato de etila do mel de *Melipona seminigra* (MS-BRA).

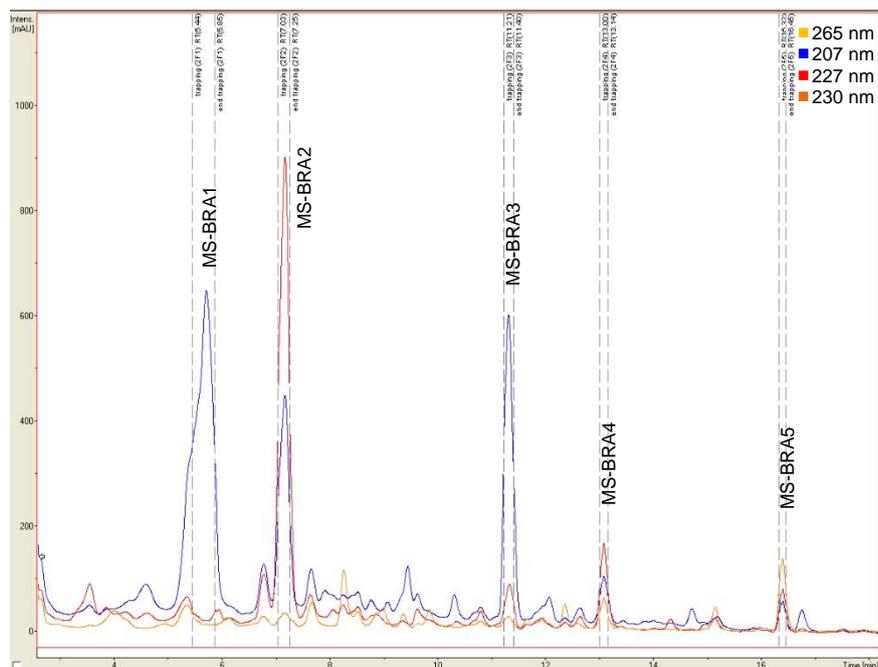
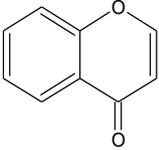
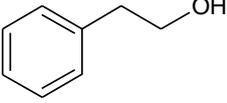
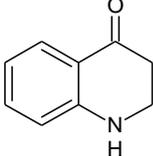
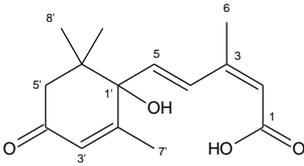


Figura 4.60. Representação gráfica do cromatograma otimizado de MS-BRA e picos selecionados para retenção nos cartuchos de SPE (*HysphereTM-resin Strong Hydrophobic* (SH)). Condições cromatográficas: eluição gradiente - 0-20 min 10-43% acetonitrila (0,05% TFA) (B), 20-22 min 43-100% (B), 22-27 min permanece em 100% para limpeza da coluna e de 27-29 min o retorno do gradiente para 10% (B) com mais cinco minutos para condicionamento da condição inicial. O volume de injeção foi de 40 μ L e a vazão de 0,8 mL/min. 30 corridas consecutivas.

Tabela 4.13. Estruturas das substâncias identificadas na fase acetato de etila de *Melipona seminigra* (MS-BRA).

Fração	Estrutura
MS-BRA2	 <p>4H-1-benzopiran-4-ona</p>
MS-BRA3	 <p>Álcool fenetílico</p>
MS-BRA4	 <p>2,3-dihidro-1H-quinolin-4-ona</p>
MS-BRA5	 <p>Ácido <i>trans, cis</i>-abscísico</p>

4.5.1.3 Análise da Fase CH₂Cl₂ de *Melipona interrupta* (MI-05)

Para uma análise exploratória (figura 4.61) desta fração (MI-05D), foi utilizado modo reverso de eluição, fase móvel constituída da mistura metanol/água (MeOH:H₂O), em gradiente linear: 5-100% de MeOH em 60 min, permanecendo em 100% por mais 5 min; 100-5% em 5 min (retorno do gradiente), com vazão de 0,8 mL/min e volume de injeção da amostra de 20 µL. A partir desses resultados pode-se planejar uma corrida cromatográfica no qual os picos com fatores de retenção (k) maiores fossem selecionados para retenção nos cartuchos (figura 4.62). Além disso, optou-se por adicionar ácido trifluoracético (TFA) (0,05%) nas fases móveis de todas as análises, a fim de diminuir ionização não suprimida, responsável pelo alargamento dos picos cromatográficos. Foram realizadas 30 corridas cromatográficas consecutivas na tentativa de adsorver os compostos presentes nos picos MI-05D1 (tr= 5,9 min), MI-05D2 (tr= 6,2 min), MI-05D3 (tr= 6,9 min), MI-05D4 (tr= 7,3 min) e MI-05D5 (tr= 8,0 min). As frações foram adsorvidas em cartuchos de fase estacionária *General Phase (HysphereTM – resin)*.

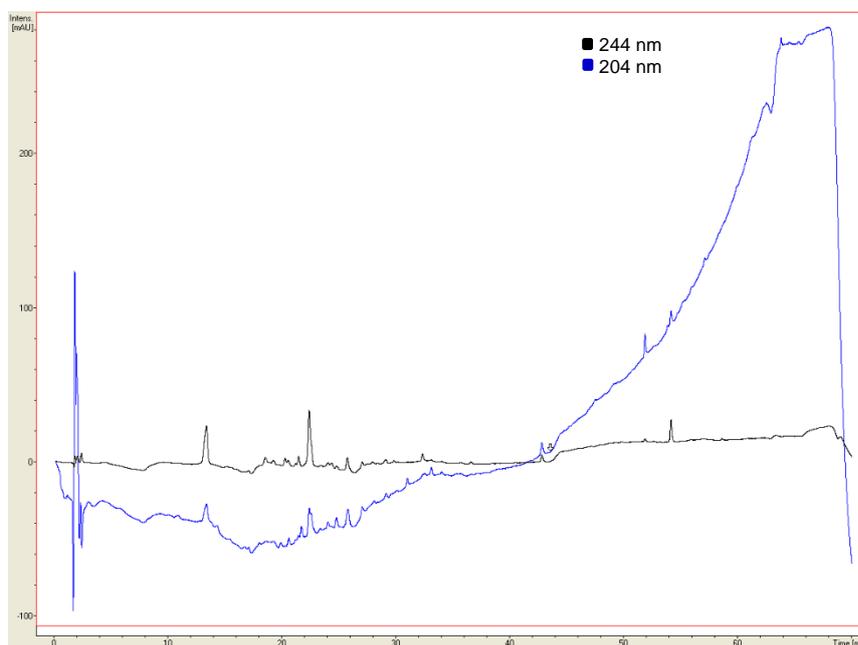


Figura 4.61. Representação gráfica do cromatograma obtido em Metanol do extrato diclorometano do mel de *Melipona interrupta* (MI-05D).

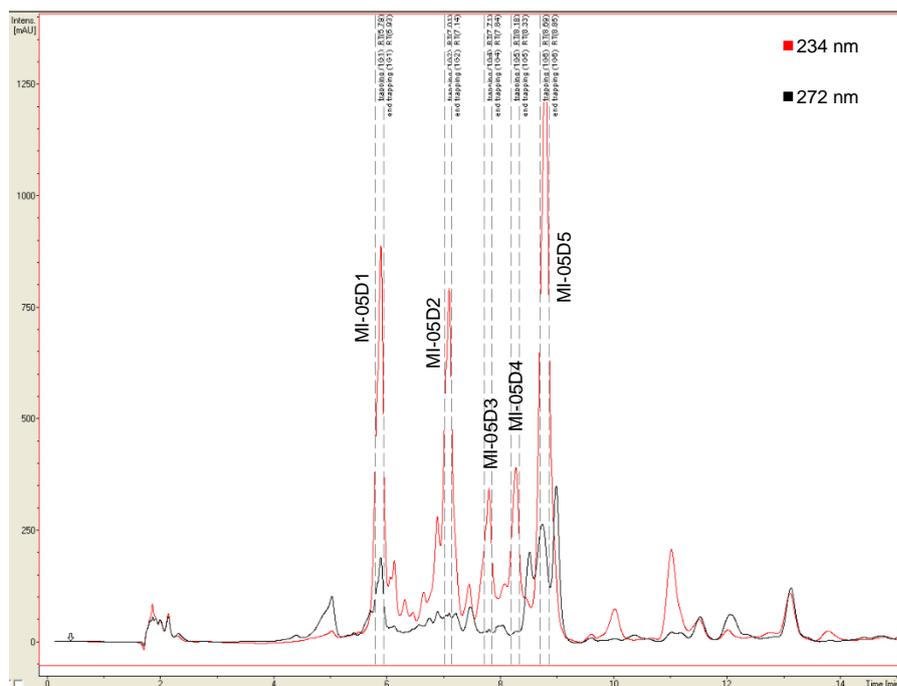


Figura 4.62. Representação gráfica do cromatograma otimizado de MI-05D e picos selecionados para retenção nos cartuchos de SPE (*HysphereTM – General Phase*). A eluição desta corrida foi realizada através do seguinte gradiente: 0-3 min 5-25% acetonitrila (0,05% TFA) (B), 3-15 min 25-30% (B), 15-18 min 30-100% (B), 18-23 min permanece em 100% para limpeza da coluna e de 23-28 min o retorno do gradiente com mais cinco minutos para condicionamento da condição inicial. O volume de injeção foi de 30 μ L e a vazão de 0,8 mL/min.

Através da análise dos dados de RMN 1D e 2D, foi possível determinar a estrutura dos compostos obtidos dos picos MI-05D1 (a), MI-05D3, MI-05D4 e MI-05D5 (b). Desses 5 picos selecionados para adsorção, somente MI-05D2 não ficou retido. Os compostos MI-05D3 e MI-05D4 tratam-se de compostos que foram isolados também posteriormente quando utilizamos cartuchos HLB para fazer a limpeza do açúcar presente nos méis. Sendo assim, para uma maior praticidade, a determinação estrutural desses compostos será tratado mais a frente, pois a qualidade dos espectros está superior e assim mais fácil de visualizar e analisar.

a) Análise do composto presente no pico MI-05D1

O composto obtido do pico MI-05D1 foi eluído do cartucho de SPE com acetonitrila-*d*3 e os dados analisados através dos experimentos de RMN de ^1H , COSY, HSQC e HMBC. No espectro de ^1H (figura 4.63) é possível observar um multipletto em δ 5,81 integrando para 1, característico de uma ligação dupla, também pode ser visualizado dois sinais em δ 0,98 e 1,05 como singletos, para 3H cada, essas

duas metilas mostram correlação no HMBC (figura 4.65) com um sinal em δ 199,0, característico de carbonila. Ainda no espectro de ^1H nota-se a presença de um dubleto em δ 2,67, que integra para 1H, e no mapa de correlação HSQC (figura 4.64) esse sinal juntamente com um outro dubleto (δ 2,05), cujo sinal foi suprimido devido a pré-saturação do solvente, mostram correlação à J_3 com o carbono carbinólico em δ 78,8, atribuído a posição 4. Com base nessas informações e as demais atribuições realizadas (tabela 4.14) foi identificado no pico MI-05D1, um monoterpênóide, relatado recentemente na literatura a primeira em flores de *Xanthoceras sorbifolia* (ZHAO et al., 2013). Portanto, em mel esse é o primeiro relato.

Tabela 4.14. Dados espectroscópicos para o composto presente em MI-05D1 (xanthoceronona A) (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, 200 μg em 250 μL de CD_3CN).

H/C	δ_{H} (ppm) , J (Hz)	δ_{C} (ppm)*	COSY	HMBC
1	-	199,0	-	-
2	5,80- 5,81 (<i>m</i>)	128,2	H-10	
3	-	165,9	-	
4	-	78,8	-	
5	-	41,3	-	
6a	2,67 (<i>d</i> , 17,0)	50,9	H-6b	C-1
6b	2,05 (<i>d</i> , 17,0)		H-6a	C-1, C-4
7a	3,69 (<i>dd</i> , 11,3 e 5,3)	66,0	H-7b	C-3, C-5
7b	3,64 (<i>dd</i> , 11,3 e 5,3)		H-7a	C-5
8	1,05 (<i>s</i>)	24,5		C-1, C-4, C-5, C-9, C-6
9	0,98 (<i>s</i>)	25,3		C-4, C-5, C-8, C-6
10	1,96 (<i>s</i>)	20,6		C-4, C-2, C-3

*Dados extraídos do mapa de correlação HSQC.

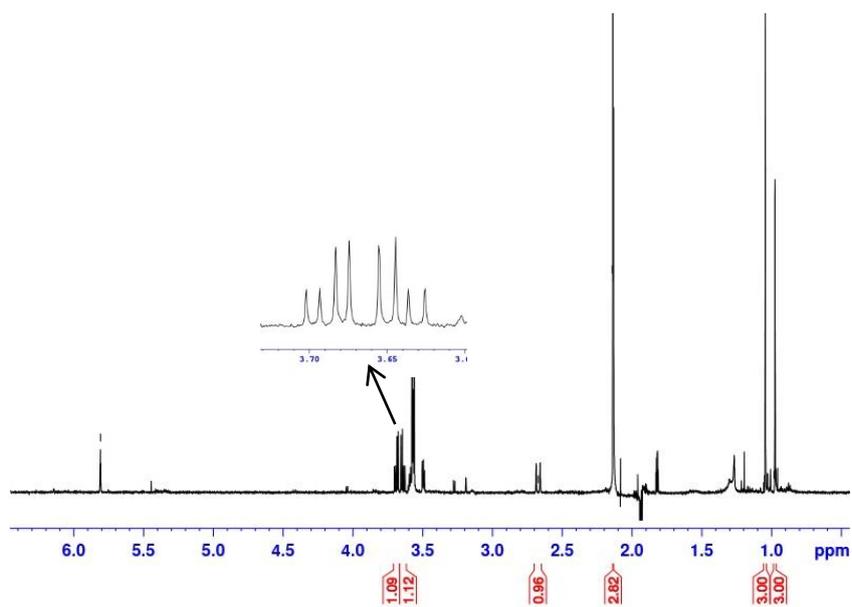


Figura 4.63. Espectro de RMN de ^1H do composto majoritário da fração MI-05D1 (xanthocerona A). Dados obtidos utilizando a sequência de pulsos com dupla pré-saturação: lc1pnf2 (nomenclatura Bruker).

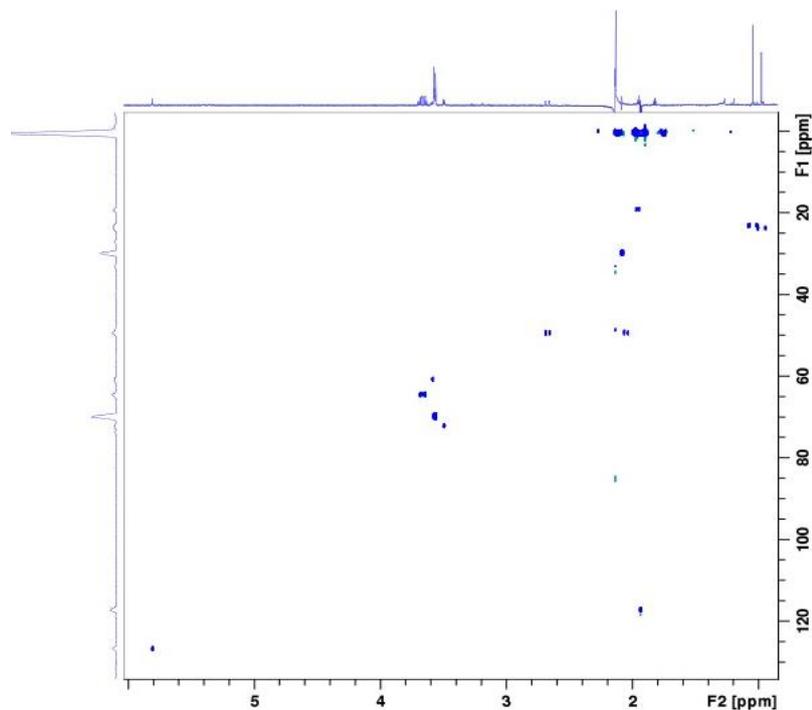


Figura 4.64. Ampliação do mapa de correlação HSQC da xanthocerona A.

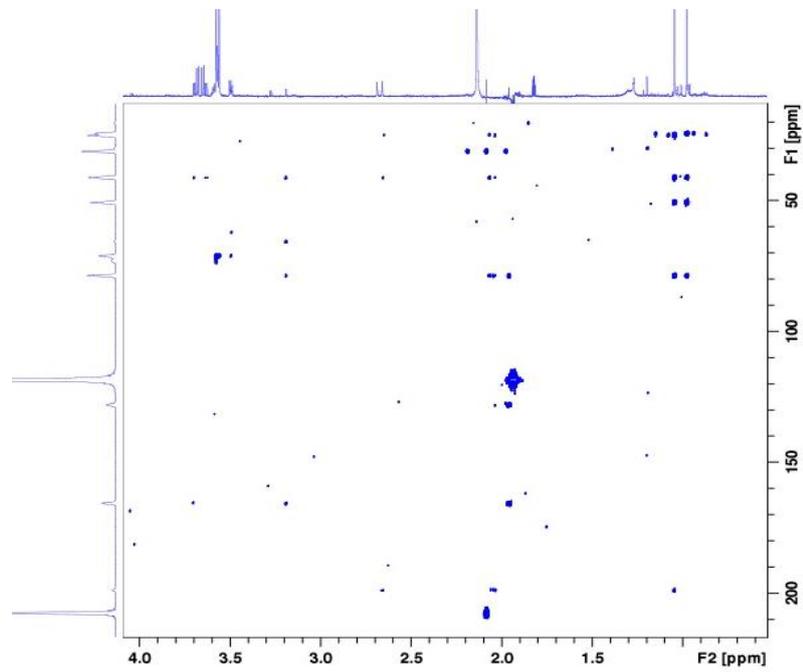
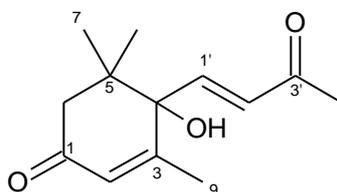


Figura 4.65. Ampliação do mapa de correlação HMBC da xanthoceroa A.

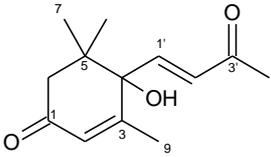
b) Análise do composto presente no pico MI-05D5

A fração obtida do pico cromatográfico denominado MI-05D5 foi extraída do cartucho de SPE com acetonitrila- d_3 e posteriormente submetida à análise por RMN através dos dados obtidos nos espectros de ^1H (figura 4.66), COSY (figura 4.67), HSQC (figura 4.68) e HMBC (figura 4.69). A análise do espectro de RMN de ^1H (tabela 20) obtido, mostrou evidências de duas substâncias presentes na banda. Uma das quais apresentou novamente a presença de um quintupletto em δ 5,86, integrando para 1H, cuja correlação no HSQC ocorre com um sinal em δ 126,9 e no HMBC com δ 78,9, um carbono carbinólico quaternário e com δ 17,8, de uma metila. É possível visualizar também a presença de duas metilas em δ 1,02 e δ 0,97 e dois dubletos com $J = 16,9$ Hz, característicos de um grupo CH_2 . As correlações desses sinais podem ser observadas na tabela 4.15. As informações presentes no espectro de ^1H aliadas aos mapas de correlação, mostraram a presença de uma cetona α , β -insaturada. Os hidrogênios olefínicos desse grupo apresentam constante de acoplamento de 16,0 Hz, o que evidenciou a presença de um sistema de ligação dupla *E*. Com base nessas informações e outras correlações observadas mostradas na tabela 4.15, pôde-se inferir a respeito da estrutura como dehidrovomifoliol.



Dehidrovomifoliol

Ainda no espectro de RMN ^1H da figura 4.66 é possível notar a presença de outra substância em menor concentração. Sinais característicos de anel aromático 1,3,4 substituído foram observados em δ 7,63 (*dd*, 8,5 e 1,7 Hz), δ 7,50 (*d*, 1,7 Hz) e δ 6,98 (*d*, 8,5 Hz). No HMBC o hidrogênio δ 7,50 apresentou correlação com uma carboxila em δ 166,5. Além desses sinais também é notável a presença de duas metoxilas em δ 3,86 e δ 3,84. Esses sinais aliados aos demais valores de deslocamentos químicos e correlações (tabela 4.16) indicaram a presença da substância conhecida como ácido verátrico, um derivado do veratrol, que é uma substância conhecida por atrair insetos.

Tabela 4.15. Dados espectroscópicos para o composto majoritário presente em MI-05D5 (dehidrovomifoliol) (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, 300 μg em 250 μL de CD_3CN).


H/C	δ_{H} (ppm) , J (Hz)	δ_{C} (ppm)*	COSY	HMBC
1	-	196,9	-	-
2	5,86 (<i>quint</i> , 1,45)	126,9	H-9	C-4, C-9
3	-	161,0	-	
4	-	78,9	-	
5	-	41,0	-	
6a	2,53 (<i>d</i> , 17,00)	49,0	H-8	C-8, C-5, C-4, C-1
6b	2,21 (<i>d</i> , 17,00)			C-8, C-5, C-4, C-1, C-2
7	0,97 (<i>s</i>)	23,6		C-8, C-5, C-4, C-6, C-1
8	1,02 (<i>s</i>)	22,3	H-6a	C-7, C-5, C-6, C-4
9	1,83 (<i>d</i> , 1,45)	17,8	H-2	C-4, C-2, C-1', C-3
1'	6,86 (<i>d</i> , 16,0)	145,9	H-2'	C-3', C-3, C-2', C-4
2'	6,31 (<i>d</i> , 16,0)	130,7		C-4, C-1', C-3'
3'	-	197,9		
4'	2,24 (<i>s</i>)	26,7		C-2', C-3', C-1'

*Dados extraídos do mapa de correlação HSQC. *quint*- quintupletto; *d*- dupletto; *s*- singletto

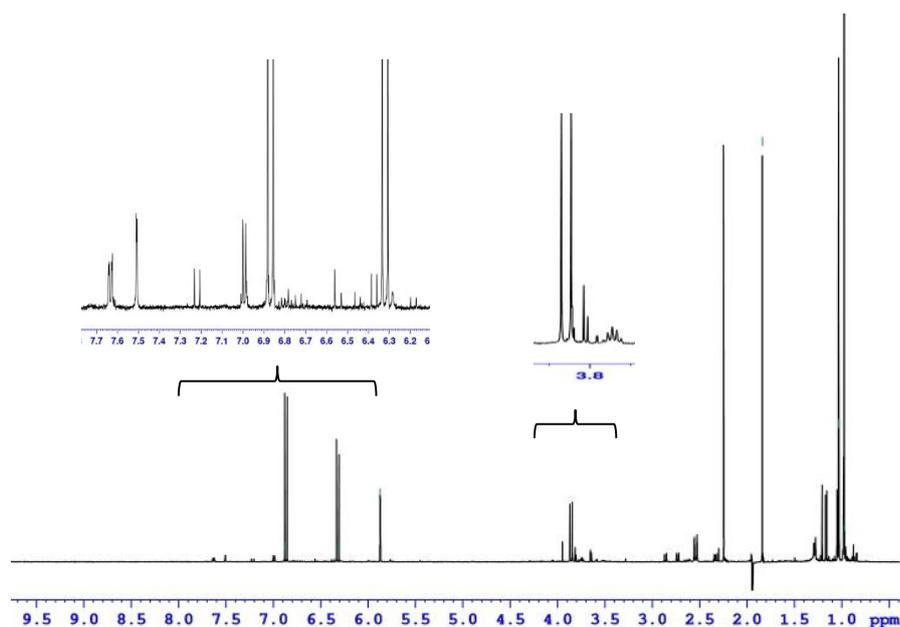


Figura 4.66. Espectro de RMN de ^1H e expansões do dehidrovomifoliol. Dados obtidos utilizando a sequência de pulsos com dupla pré-saturação: lc1pnf2 (nomenclatura Bruker), número de promediações 64.

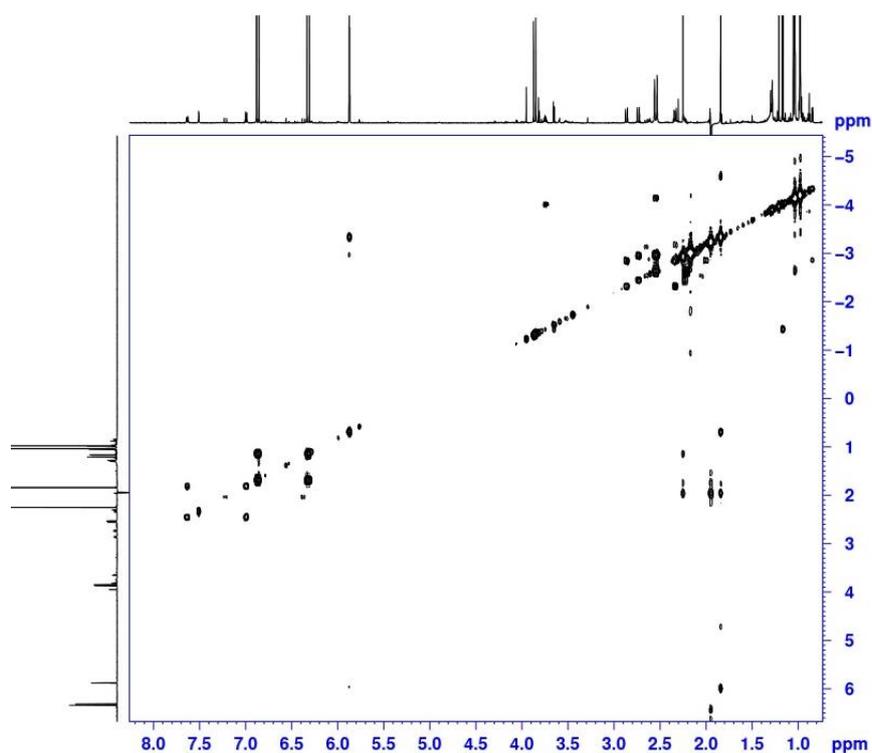


Figura 4.67. Mapa de correlação COSY do composto majoritário dehidrovomifoliol.

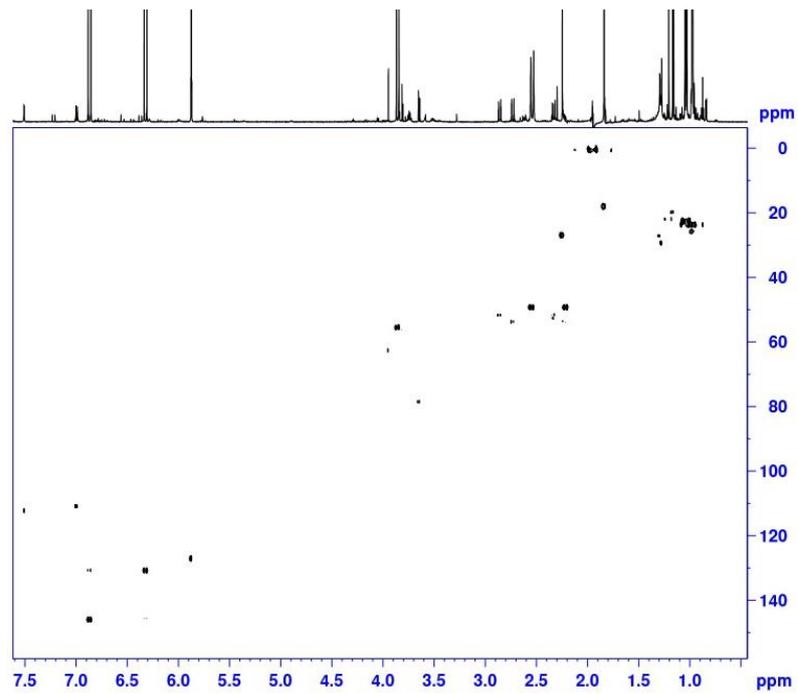


Figura 4.68. Mapa de correlação HSQC do composto majoritário dehidrovomifoliol.

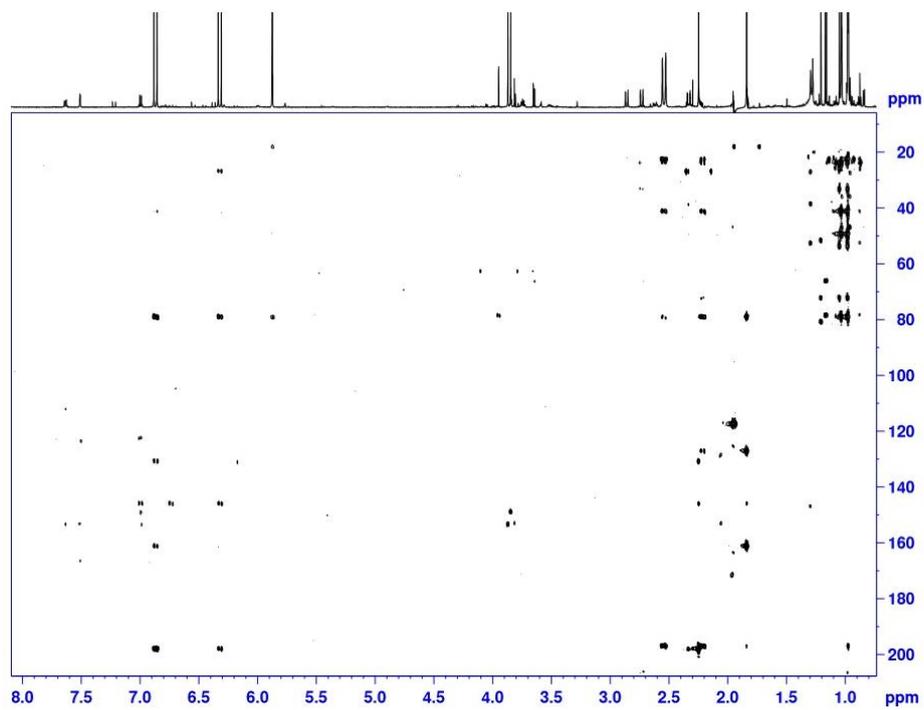


Figura 4.69. Mapa de correlação HMBC do composto majoritário dehidrovomifoliol.

Tabela 4.16. Dados espectroscópicos para o composto minoritário presente em MI-05D5 (ácido verátrico) (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, 300 μg em 250 μL de CD_3CN).

The chemical structure shows a benzene ring with a carboxylic acid group at position 1 and two methoxy groups at positions 3 and 4. The carbon atoms are numbered: 1 (carboxyl carbon), 2 (ortho to 1), 3 (ortho to 1, meta to 2), 4 (ortho to 1, meta to 3), 5 (ortho to 1, meta to 4), and 1' (methoxy methyl carbon). The methoxy groups are at positions 3 and 4.

H/C	δ_{H} (ppm) , J (Hz)	δ_{C} (ppm)*	COSY	HMBC
1	-	122,3	-	-
2	7,50 (<i>d</i> , 1,7)	112,1	-	C-6, C-4, C-1', C-1
3	-	148,8	-	-
4	-	153,2	-	-
5	6,98 (<i>d</i> , 8,5)	110,7	H-6	C-1, C-3, C-4
6	7,63 (<i>dd</i> , 8,5 e 1,7)	123,5	H-5	C-2, C-4
1'	-	166,5	-	-
3-OMe	3,84 (<i>s</i>)	55,3	-	C-3
4-OMe	3,86 (<i>s</i>)	55,4	-	C-4

*Dados extraídos dos mapas de correlação HSQC e HMBC. *d*- duplete; *dd*- duplo duplete; *s*- singleto

4.5.1.4 Análise da Fase AcOEt de MI-05

Inicialmente, a fração acetato (MI-05A) foi submetida a uma análise exploratória (figura 4.70), através de uma corrida cromatográfica em modo reverso de eluição, utilizando a mistura metanol/água (MeOH:H₂O) como fase móvel; gradiente linear: 5-100% de MeOH em 60 min, permanecendo em 100% por mais 5 min para limpeza da coluna e o retorno do gradiente em mais 5 min 100-5%, com vazão de 0,8 mL/min e volume de injeção da amostra de 20 µL.

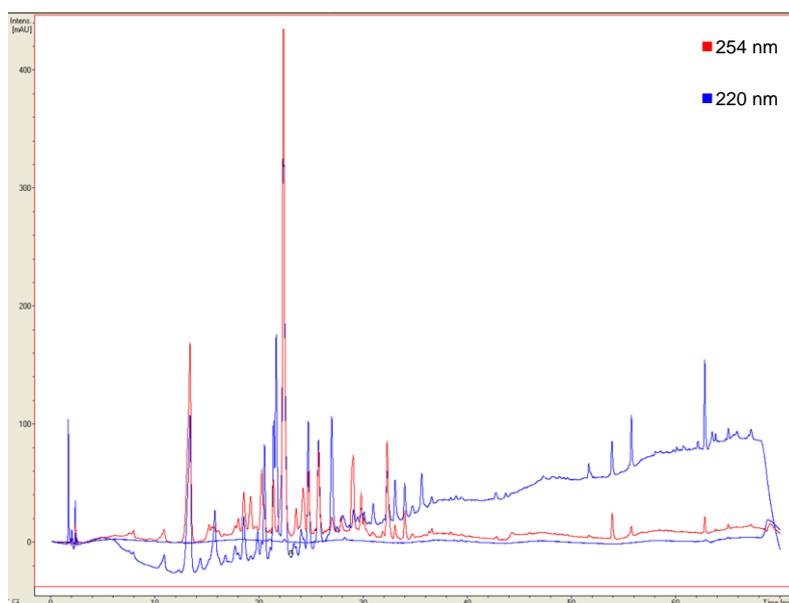


Figura 4.70. Representação gráfica do cromatograma obtido em metanol do extrato acetato de etila do mel de *Melipona interrupta* (MI-05A).

A partir deste resultado, foram realizados testes na tentativa de adsorver os picos cromatográficos com menores fatores de retenção (k) em cartuchos de fase estacionária *General Phase- GP* (HysphereTM-resin), com 30 corridas consecutivas, no entanto não houve retenção dos compostos nessa fase estacionária. Como não dispúnhamos de uma boa quantidade dessa fração para realizarmos outros testes de retenção nos cartuchos de *SPE*, decidiu-se otimizar uma corrida (figura 4.71) para tentar adsorver os compostos com maiores tempos de retenção (k), pois são os menos polares, e mais facilmente adsorvidos pela fase estacionária *General Phase* (HysphereTM-resin). Sendo assim, o método desenvolvido para separação desses compostos foi desenvolvido da seguinte forma: volume de injeção 30 µL, vazão de 0,8 mL/min, eluente A (H₂O mili Q, 0,05% de TFA), eluente B (metanol, 0,05% de TFA). A limpeza da coluna foi realizada com 100 % de B por 5 minutos seguido pelo retorno do gradiente em mais 5 min (100-5% de B), após esse intervalo a coluna foi

condicionada por 5 min, totalizando 35 minutos por corrida. Na figura 79 é possível observar os picos em destaque que foram selecionados para retenção em cartuchos de fase estacionária GP, MI-05A1 ($t_r = 8,2$ min), MI-05A2 ($t_r = 10,6$ min), MI-05A3 ($t_r = 28,1$ min) e MI-05A4 ($t_r = 28,3$ min). Dos 4 compostos obtidos nessa fração, MI-05A2 não apresentou retenção suficiente no cartucho para análise por RMN e MI-05A1 trata-se do monoterpênóide xanthocerona A, isolado na fração diclorometano. Um dos problemas ocasionados quando se utiliza extração líquido-líquido é o risco de contaminação da amostra, e uma das fontes de contaminação na maioria das vezes é o próprio solvente utilizado na extração. E isso foi o que provavelmente aconteceu com essa fração oriunda desse tipo de tratamento, pois nos picos MI-05A3 e MI-05A4 foi identificada uma mistura de ftalatos. As estruturas desses compostos são mostradas a seguir.

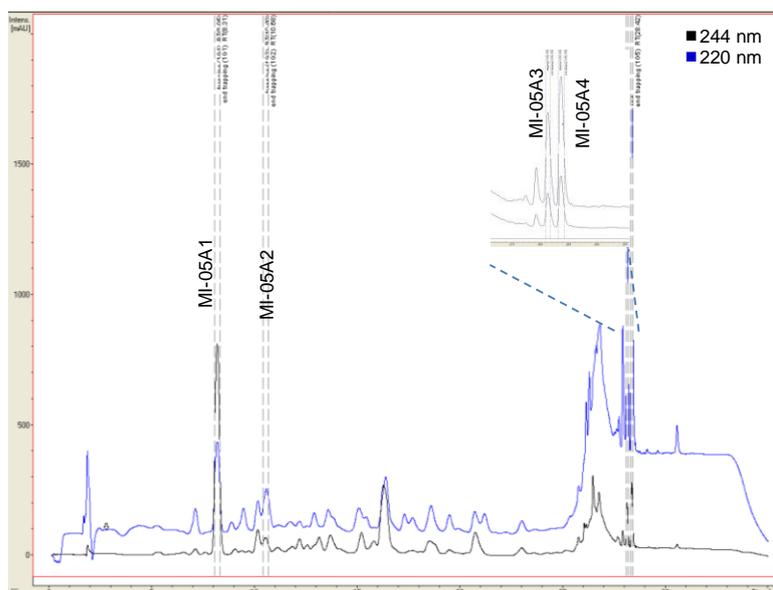
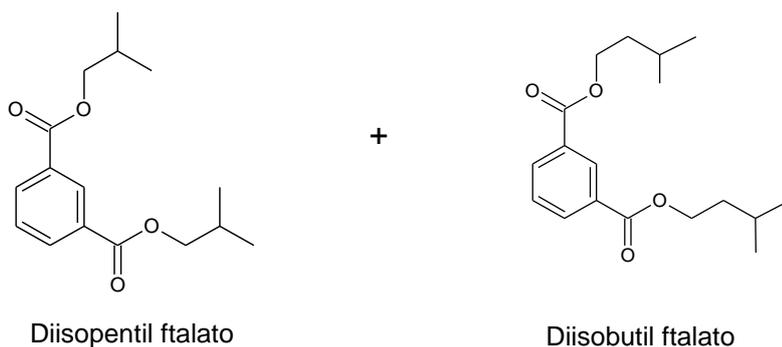
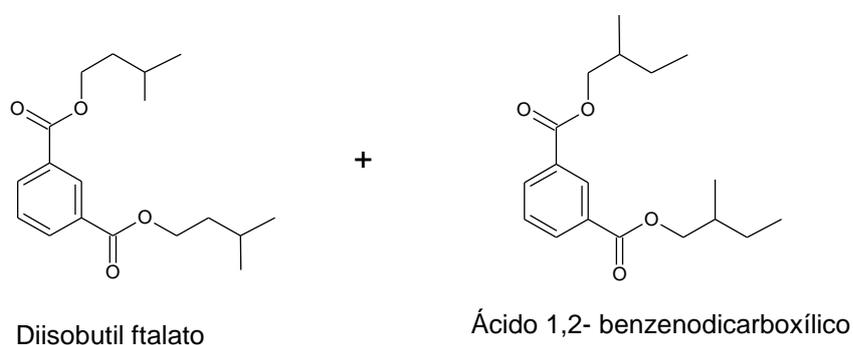


Figura 4.71. Representação gráfica do cromatograma otimizado de MI-05A e picos selecionados para retenção nos cartuchos de SPE.

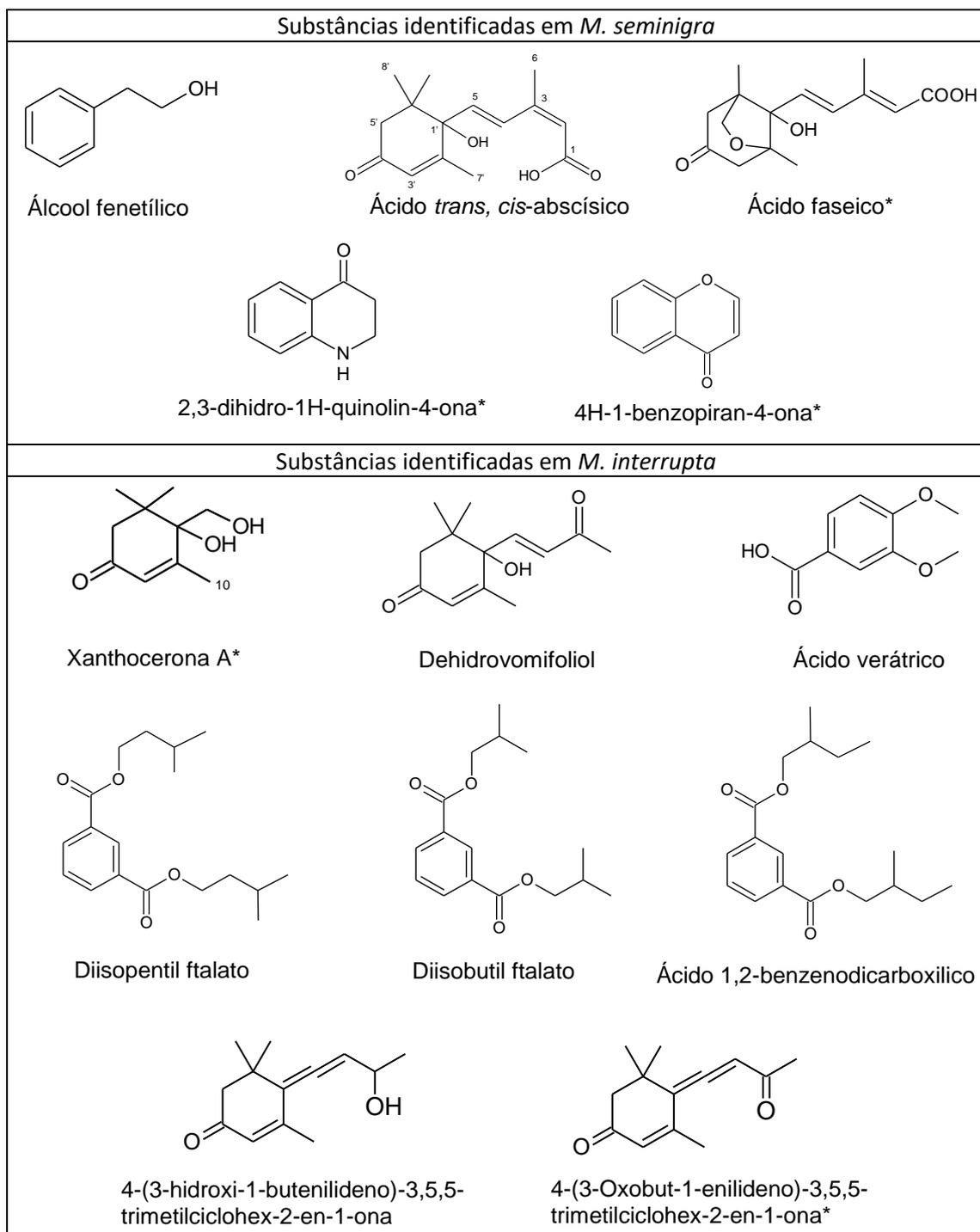
MI-05A3



MI-05A4



Na figura 4.72 são mostradas de forma resumida todas as substâncias identificadas nos méis de *M. seminigra* e *M. interrupta* das frações obtidas do pré-tratamento utilizando partição líquido-líquido. Ressalta-se que o grupo de ftalatos identificados no mel de *M. interrupta* foi considerado contaminação oriunda do processo de limpeza do mel. Das 10 substâncias identificadas nesse processo, 5 ainda não foram relatadas em méis, são ácido faseico; 2,3-dihidro-1H-quinolin-4ona; 4H-1-benzopiran-4-ona, xanthoceron A e 4-(3-Oxobut-1-enilideno)-3,5,5-trimetilciclohex-2-en-1-ona



* Não reportadas em méis anteriormente.

Figura 4.72. Resumo das substâncias identificadas nos méis de *Melipona*.

4.5.2. Análise dos méis utilizando extração em fase sólida (SPE) como pré-tratamento.

4.5.2.1 Desenvolvimento do método e avaliação da taxa de recuperação.

Com o objetivo de retirar os açúcares presente nos méis, foi realizada a limpeza da amostra utilizando a Extração em Fase Sólida (SPE), como foi especificado anteriormente na metodologia. Desse modo, optou-se a princípio pela utilização da fase estacionária HLB e dois modos de extração, em meio ácido (figura 4.73) e em meio básico (figura 4.74), para avaliar a diferença de compostos retidos nos cartuchos bem como uma avaliação qualitativa a respeito da recuperação desses compostos.

Na figura 4.73, podemos observar o cromatograma obtido da fração em meio ácido do mel de *Melipona interrupta* (MI-BR), denominado de MI-BRa. Este resultado corresponde a massa de 50g de mel como material de partida. Inicialmente foi testado apenas 5g de mel, no entanto os picos cromatográficos não apresentaram intensidades suficientes para serem retidos pelo LC-SPE ou LC-BPSU. Então, o processo de limpeza por extração em fase sólida (SPE) foi realizado 10 vezes, sendo que para cada cartucho foi utilizada a massa de 5g de mel, conforme descrito na metodologia.

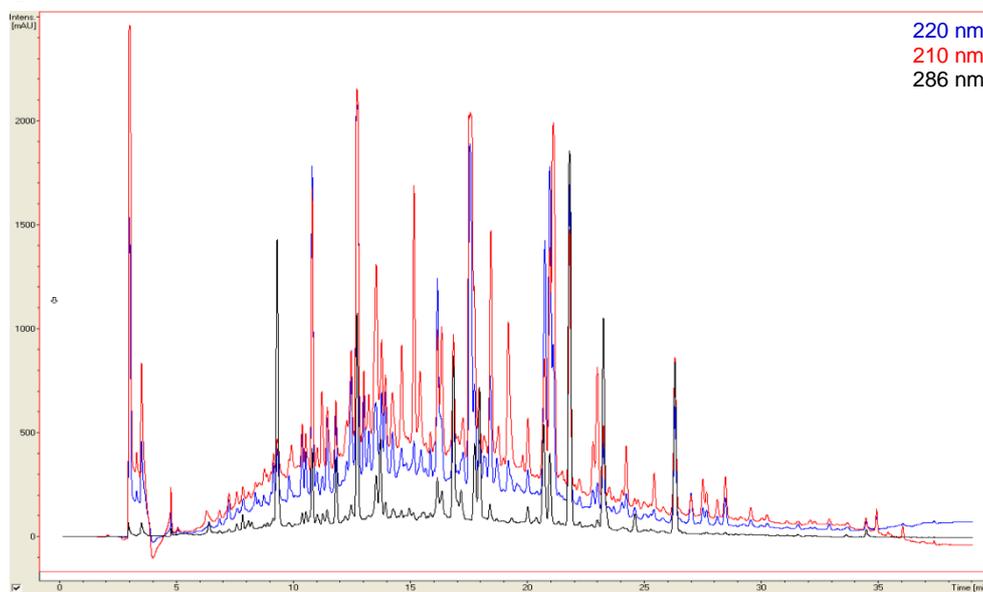


Figura 4.73. Representação gráfica do cromatograma obtido da extração em fase sólida (SPE) de MI-BRa, em meio ácido. A eluição desta corrida foi realizada através do gradiente: 0-22,5 min 5-48% acetonitrila (0,05% TFA) (B), 22,5-26 min 100% (B), permanece em 100% por mais 5 min para limpeza da coluna e de 31-34 min o retorno do gradiente com mais cinco minutos para condicionamento da condição inicial. O volume de injeção foi de 20 μ L e a vazão de 0,8 mL/min.

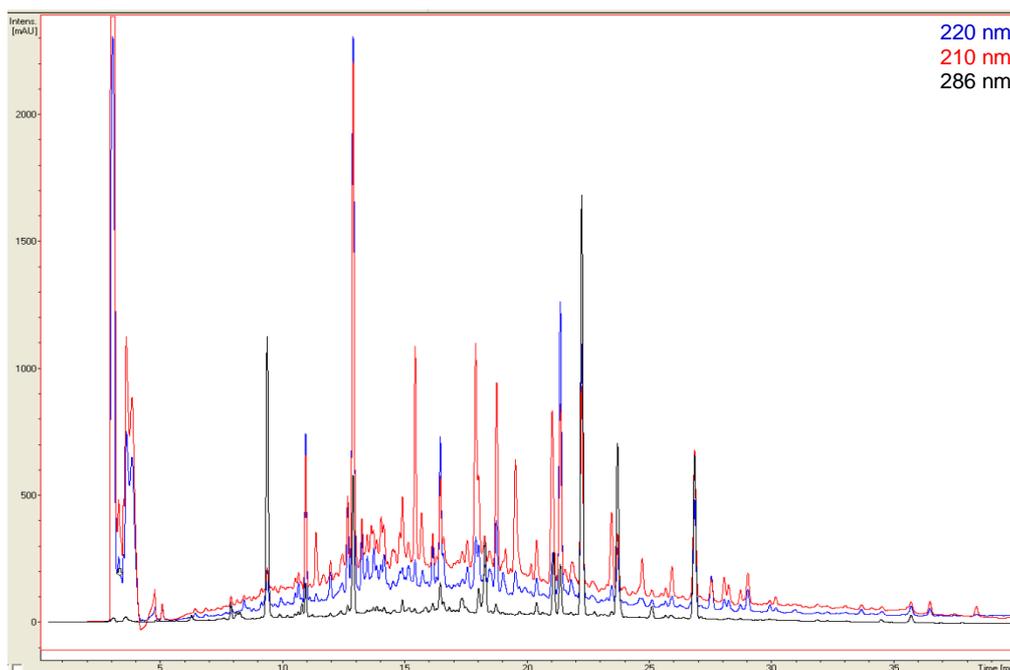


Figura 4.74. Representação gráfica do cromatograma obtido da extração em fase sólida (SPE) de MI-BR, em meio básico. Foram usadas as mesmas condições cromatográficas da fração em meio ácido.

O que se pode observar através da análise dos cromatogramas obtidos em meio ácido (figura 4.73) e em meio básico (4.74) é que os compostos obtidos na extração básica foram essencialmente os mesmos obtidos em meio ácido. Também é possível notar através de uma análise qualitativa que a extração em meio ácido apresentou maior número de compostos retidos além das intensidades dos picos cromatográficos que foram maiores, ou seja, os compostos presentes nos méis apresentaram maior retenção nos cartuchos de SPE quando em condições ácidas, isso pode ser justificado pela composição dos méis, que na maioria das vezes é de compostos ácidos. Sendo assim, esse foi o modo de extração selecionado para separar os açúcares dos méis.

Após avaliação do modo de extração, em meio ácido, foram realizados testes com outro tipo de fase estacionária, a XAD-2, cuja principal característica é separar açúcar dos compostos de interesse. No entanto, a partir de uma avaliação qualitativa não foi observada diferença nos compostos retidos nesse tipo de material, apenas uma melhor recuperação dos compostos foi observada quando utilizado o cartucho HLB Oasis.

4.5.2.2 Avaliação da taxa de Recuperação da Extração em Fase Sólida (SPE).

Após seleção da fase estacionária do cartucho (HLB) a ser utilizado e o método (ácido), optou-se por fazer uma análise quantitativa da taxa de recuperação da metodologia escolhida, com o objetivo de avaliar possíveis perdas de compostos de interesse durante o pré-tratamento. Dessa forma, foi selecionado um padrão interno cujo tempo de retenção fosse similar aos compostos presentes na fração em estudo, a naringina. Na figura 4.75 é mostrado a ampliação do pico cromatográfico correspondente ao padrão interno e a integral calculada pelo programa. Após os cálculos levando em consideração a área da integral do pico do padrão interno quando a matriz foi fortificada antes do pré-tratamento e somente do padrão interno, o resultado obtido para a taxa de recuperação foi satisfatório de 96%.

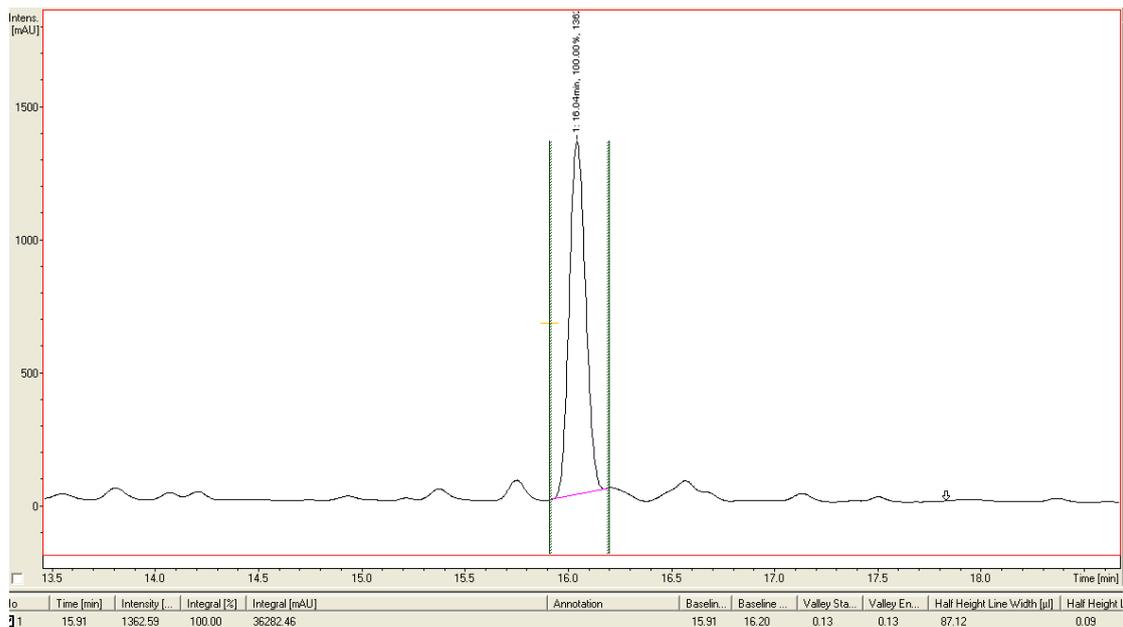


Figura 4.75. Representação gráfica do cromatograma ampliado da fração MI-BRa tratada em SPE (HLB) meio ácido e fortificada com o padrão interno (naringina - 40 µg/mL).

4.5.2.3. Análise dos compostos através do LC-SPE

A partir do cromatograma obtido da fração MI-BRa, como mostrado na figura 4.73 (pág. 109), foram selecionados então 20 picos cromatográficos que apresentavam boa resolução e intensidade para retenção em SPE. A fase estacionária selecionada foi GP e o modo de operação para seleção dos picos foi *threshold*. Optou-se pela realização deste trabalho em duas etapas, a primeira consistiu na seleção e retenção dos picos com absorção de comprimento de onda de 220 e 286 nm, como mostrado na figura 4.76 (MI-Bra1-11). Na segunda etapa apresentada na figura 4.77, selecionou-se os picos com absorção em 210 nm (MI-Bra12-20).

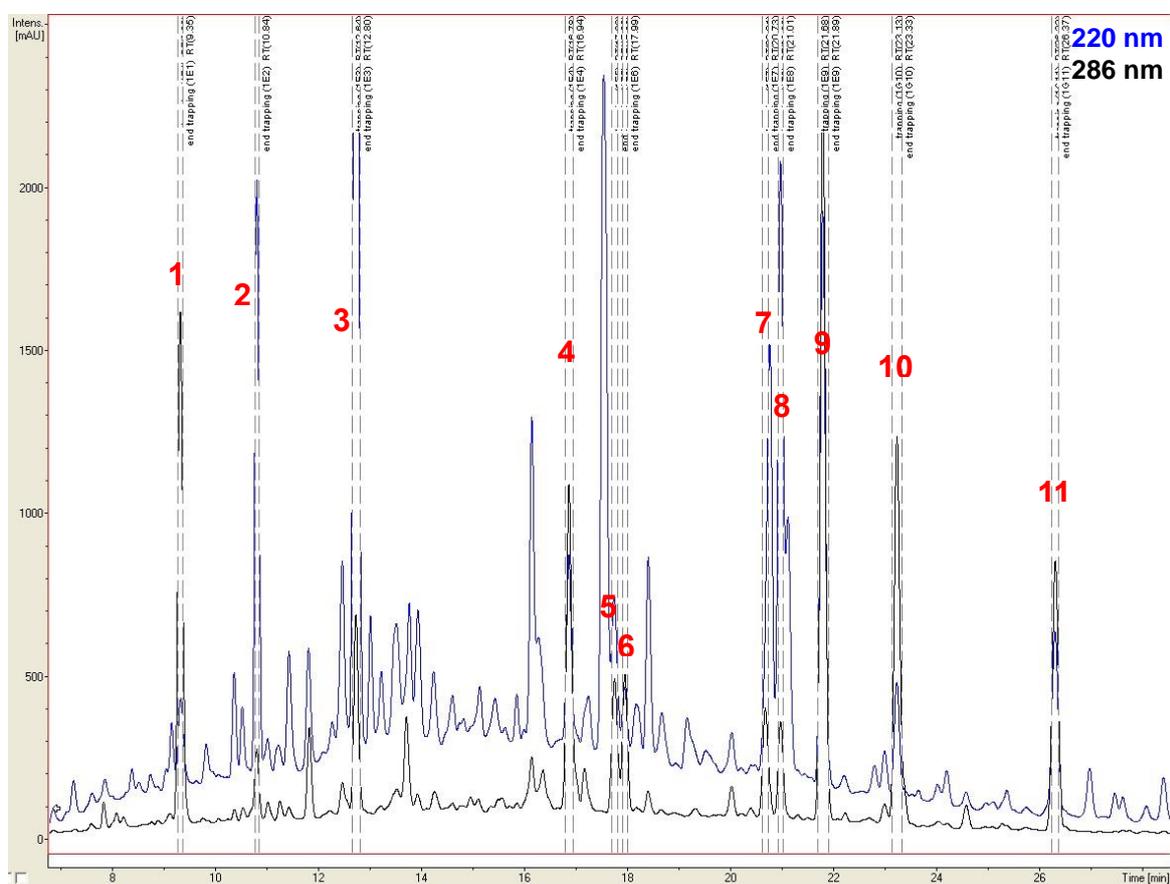


Figura 4.76. Representação gráfica do cromatograma obtido da extração em fase sólida (SPE) de MI-BRa, em meio ácido e picos selecionados para retenção em GP.

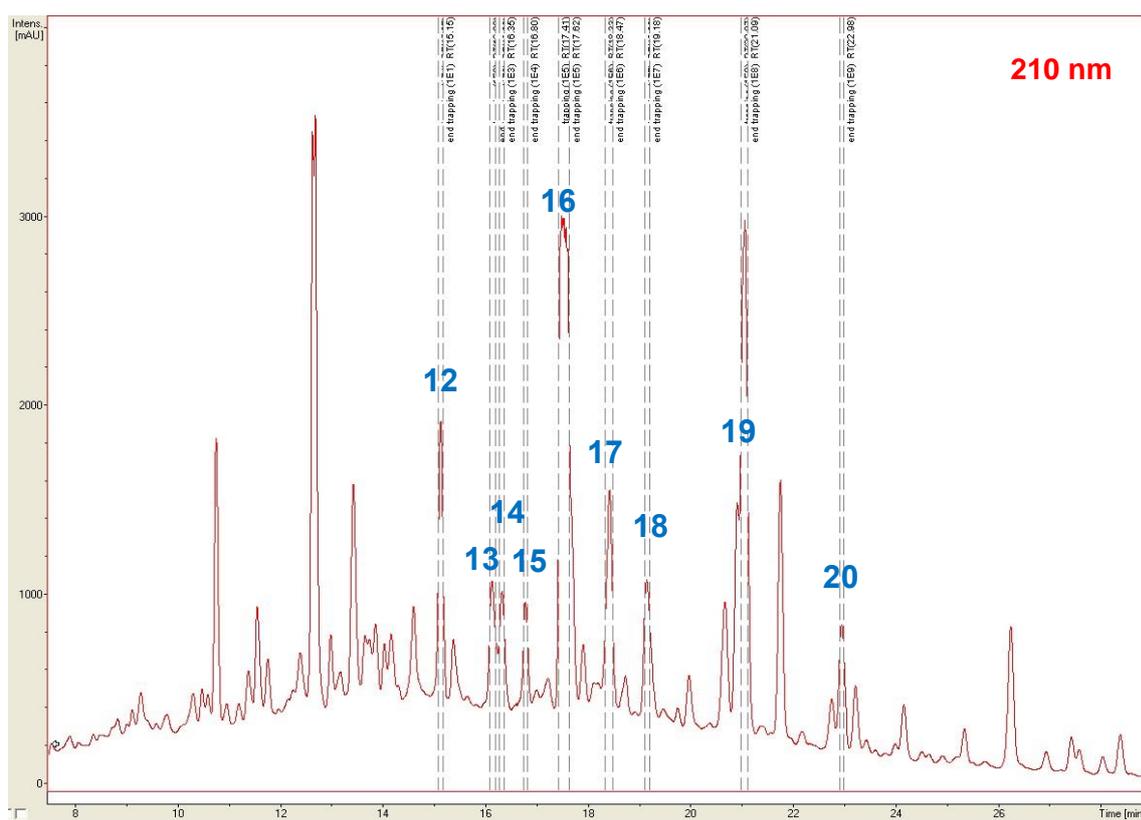


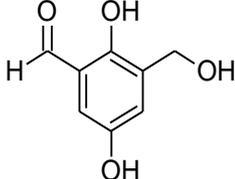
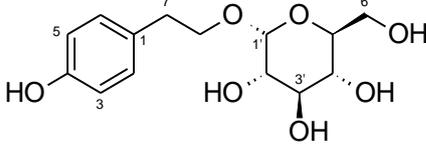
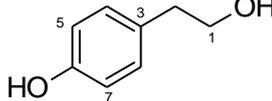
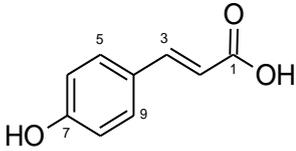
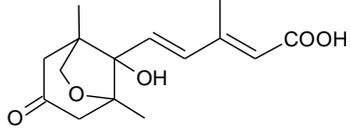
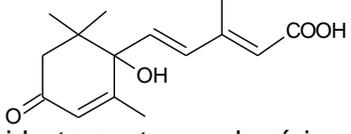
Figura 4.77. Representação gráfica do cromatograma obtido da extração em fase sólida (SPE) de MI-BRa, em meio ácido e picos selecionados para retenção em GP.

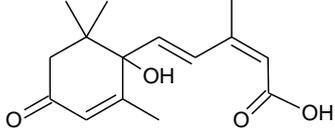
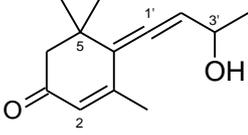
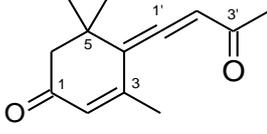
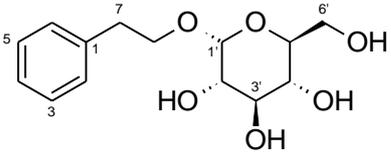
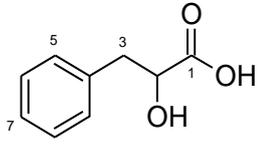
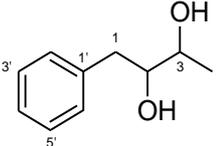
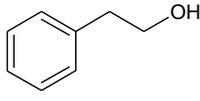
Na tabela 4.17 estão descritos de forma resumida as estruturas das substâncias identificadas na fração MI-BRa que foram isoladas pelo SPE (GP). É possível notar nesta tabela a seguir que nem todos os picos selecionados foram identificados, alguns não apresentaram concentração suficiente para aquisição de espectros 2D, outros foram retidos em misturas que forneceram espectros muito complexos. As substâncias cujas estruturas já foram discutidas anteriormente não serão detalhadas aqui.

Compostos muito polares dificilmente ficam retidos nos cartuchos de SPE, mesmo as fases estacionárias mais recomendadas para esse tipo de compostos não são garantia de retenção. Isso foi o que observamos nos picos MI-BRa1 e MI-BRa2, que não ficaram retidos mesmo na fase estacionária SH (própria para compostos mais polares). Para tentar resolver esse empecilho optamos em utilizar a unidade BPSU, que consiste na unidade que faz conexão com o LC e possui 36 coletores de amostra. No entanto, o modo diferente de como foi utilizado é que será

destacado. Como o nosso objetivo é concentrar os compostos de interesse para assim analisar por RMN, foram realizadas 20 corridas consecutivas e os picos selecionados enviados para cada coletor (*loop*), e posteriormente coletados manualmente de modo que cada composto fosse coletado num mesmo frasco, para então ser seco a pressão reduzida e ressuspensão em solvente deuterado. Somente após esse processo, pôde-se identificar as substâncias presentes nos picos MI-BRa1 e MI-BRa2, como mostra a tabela 4.17. A seguir serão descritas resumidamente as análises espectroscópicas dos compostos identificados nessa fração.

Tabela 4.17. Estruturas das substâncias identificadas na fração MI-BRa através do SPE (GP)

Fração	Estrutura
MI-Bra1 (tabela 4.18) (loop)	 <p>2,5-dihidroxi-3 (hidroximetil)benzaldeído</p>
MI-BRa2 (tabela 4.19) (loop)	 <p>α-D-galactopiranosídeo</p>
MI-BRa3 (tabela 4.20)	 <p>tirosol</p>
MI-BRa4 (tabela 4.21)	 <p>ácido p-cumárico</p>
MI-Bra6	 <p>ácido faseico</p>
MI-Bra7	 <p>ácido <i>trans, trans</i>- abscísico</p>

MI-BRa9	 <p>ácido <i>trans, cis</i>- abscísico</p>
MI-BRa10 (tabela 4.22)	 <p>4-(3-hidroxi-1-butenilideno)-3,5,5-trimetilciclohex-2-en-1-ona</p>
MI-BRa11 (tabela 4.23)	 <p>4-(3-Oxobut-1-enilideno)-3,5,5-trimetilciclohex-2-en-1-ona</p>
MI-BRa12 (tabela 4.24)	 <p>fenil-etil-α-D-glicosídeo</p>
MI-BRa16 (tabela 4.25)	 <p>ácido 2-hidróxi-benzenopropanóico</p>
MI-BRa17 (tabela 4.26)	 <p>1-fenil-2,3-butanodiol</p>
MI-BRa19	 <p>álcool fenético</p>

a) Análise do composto majoritário presente no pico MI-BRa1 (2,5,dihidroxi-3-(hidroximetil) benzaldeído) obtido do coletor de amostras (loop).

O espectro de RMN ^1H (figura 4.78) dessa fração revelou a presença de quatro sinais correspondentes a mesma substância, em δ 9,54 (s), δ 7,39 (d, 7,60 Hz), δ 6,59 (dt, 7,60 e 0,72 Hz) e 4,62 (s). Os valores de carbono foram obtidos através dos experimentos HSQC e HMBC (figura 4.79), como mostrado na tabela 4.18. A proposta estrutural para o composto majoritário presente nessa fração é o aldeído mostrado abaixo, cuja substituição no anel foi justificada pela presença do duplo tripleto de H-4, observado através de apodização gaussiana (gb), pois apresenta um acoplamento meta com H-6 e alílico com H-7. Para méis essa substância ainda não foi relatada.

Tabela 4.18. Dados espectroscópicos para o composto presente em MI-BRa1 (2,5,dihidroxi-3-(hidroximetil) benzaldeído) (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, MeOD).

H/C	δ_{H} (ppm) , J (Hz)	δ_{C} (ppm)*	COSY
1'	9,54 (s)	164,8	-
1	-		H-3
2	-	155,4	H-2
3	-		H-7
4	6,59 (dt, 3,60, 0,72)	111,6	
5	-		
6	7,39 (d, 3,60)	125,9	H-4
7	4,62 (s)	58,5	

*Dados extraídos do mapa de correlação HSQC e HMBC; *dt*- duplo tripleto

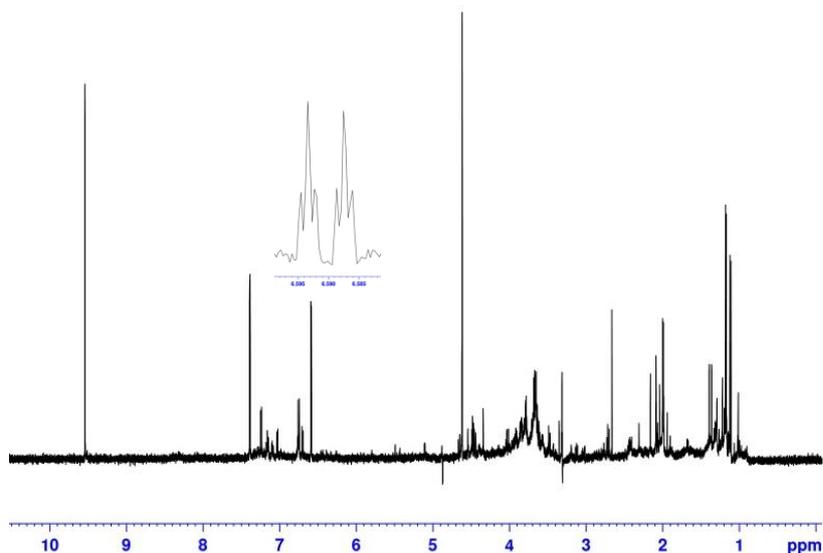


Figura 4.78. Espectro de RMN de ^1H e expansão do 2,5,dihidroxi-3-(hidroximetil) benzaldeído. Dados obtidos utilizando a sequência de pulsos com dupla pré-saturação: lc1pnf2 (nomenclatura Bruker), número de promediações 64.

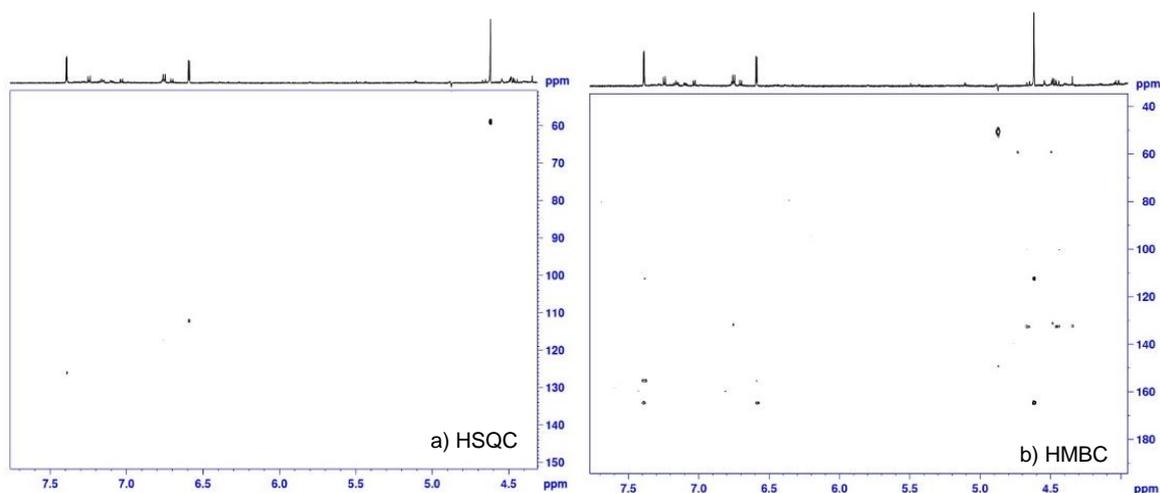


Figura 4.79. Mapas de correlação HSQC (a) e HMBC (b) de 2,5,dihidroxi-3-(hidroximetil) benzaldeído.

b) Análise do composto majoritário presente no pico MI-BRa2 (α -D-galactopiranosídeo) obtido do coletor de frações (*loop*).

No composto majoritário presente no pico MI-BRa2 (*loop*) foi observado através do espectro de RMN ^1H (figura 4.80) a presença de uma glicose, no qual o hidrogênio anomérico aparece em δ 4,80 como dubleto ($J= 3,90$ Hz), caracterizando a posição α , esse mesmo hidrogênio apresentou correlação no HSQC (figura 4.81) com o carbono em δ 103,3. Também no espectro de RMN ^1H observamos a presença de um anel aromático *p*-substituído ligado em uma das extremidades a um grupo $\text{CH}_2\text{-CH}_2$, cujo um os hidrogênios metilênicos H-8 apresentou no HMBC (figura 4.81) correlação com o carbono δ 101,3, da glicose. Dessa forma, os dados espectrais obtidos (tabela 4.19) evidenciam a presença da substância α -D-galactopiranosídeo.

Tabela 4.19. Dados espectroscópicos para o composto presente em MI-BRa2 (α -D-galactopiranosídeo) (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, MeOD).

H/C	δ_{H} (ppm) , J (Hz)	δ_{C} (ppm)*	COSY	HMBC
1	-	158,0	-	
2/6	7,07 (<i>d</i> "AB", 8,50)	132,2	H-3/5	C-7, C3/5, C-4, C-1
3/5	6,70 (<i>d</i> "AB", 8,50)	117,5	H-2/6	C2/6, C-4, C-1
4	-	133,0		
7	2,84 (<i>t</i> , 7,24)	37,6	H-8a, H-8b	C2/6, C-8
8	(a) 3,61- 3,65 (<i>m</i>)	71,8	H-7, H-8b	C-7, C-1', C-2/6
	(b) 3,86 (<i>dt</i> , 9,64, 7,24)		H-7, H-8a	
1'	4,80 (<i>d</i> , 3,90)	101,3	H-2'	
2'	3,35-3,40 (<i>m</i>)	75,0	H-3'	
3'	3,58-3,62 (<i>m</i>)	76,5	H-4'	C-4', C-2'
4'	3,24-3,29 (<i>m</i>)	73,4	H-3', H-5'	C-6', C-3'
5'	3,35-3,39 (<i>m</i>)	75,0	H-4', H-6a'	
6'	(a) 3,60-3,64 (<i>m</i>)	64,0	H-5', H-6b'	
	(b) 3,72 (<i>dd</i> , 11,80, 2,60)		H-5', H-6a'	

*Dados extraídos do mapa de correlação HSQC e HMBC; *dt*- duplo tripleto, *dd*-duplo dubleto

Ressalta-se a importância do uso da hifenação LC-BPSU nesses dois últimos compostos citados, pois forneceu a possibilidade de separação do pico, com massa suficiente para fornecer espectros com excelente relação sinal-ruído, o que não foi possível com o uso do LC-SPE nesses casos.

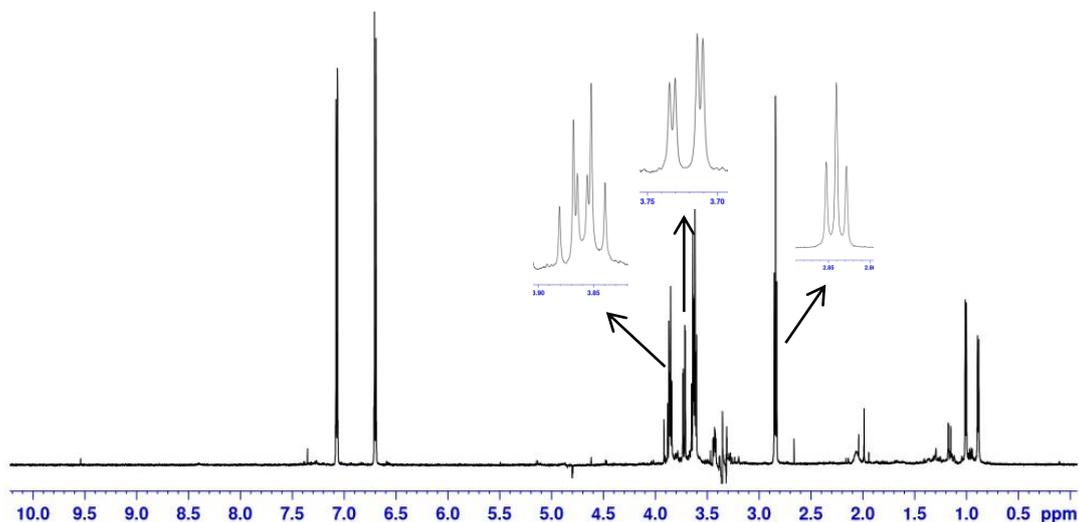


Figura 4.80. Espectro de RMN de ^1H e expansões do α -D-galactopiranosídeo. Dados obtidos utilizando a sequência de pulsos com dupla pré-saturação: lc1pnf2 (nome Bruker), número de promediações 64.

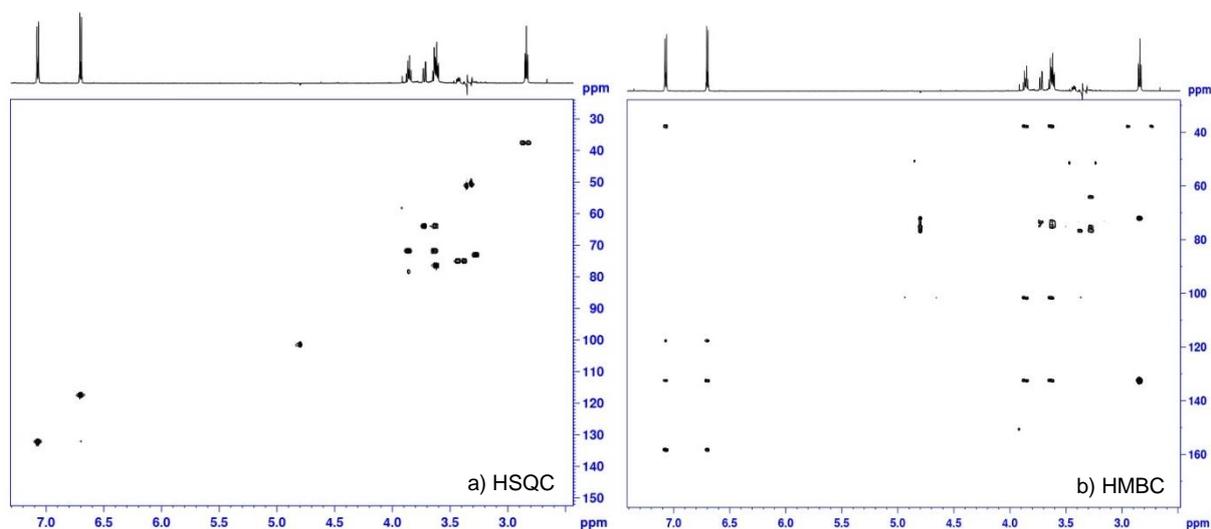


Figura 4.81. Mapas de correlação HSQC(a) e HMBC (b) de α -D-galactopiranosídeo.

c) Análise do composto majoritário presente no pico MI-BRa3 (tirosol).

O espectro de RMN ^1H (figura 4.82) do composto encontrado no pico MI-BRa3 mostrou dois sinais para os grupos metilênicos em δ 2,71 (*t*, 2H) e δ 3,68 (*t*, 2H), dois sinais correspondentes aos hidrogênios de um anel aromático *p*-substituído em 7,03 (*d* “AB”, 2H) e 6,70 (*d* “AB”, 2H), o valor encontrado para o dubleto mais blindado se justifica devido a presença de um grupo substituinte doador de elétrons, como OH. A estrutura proposta para esse composto foi confirmada pelos deslocamentos químicos (tabela 4.20) e correlações encontrados nos mapas de correlação HSQC e HMBC (figura 4.83). Essa substância (tirosol) identificada a primeira vez em méis, é comumente reportado por apresentar propriedades antioxidantes, atividade antifúngica, além de recentemente estar em destaque como um potencial candidato ao uso terapêutico no acidente vascular cerebral, devido ao seu efeito neuroprotetor observado em estudos com ratos (BU et al., 2007; SLININGER et al, 2004; GUIMARÃES et al., 2009).

Tabela 4.20. Dados espectroscópicos para o composto presente em MI-BRa3 (tirosol) (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, MeOD).

H/C	δ_{H} (ppm) , <i>J</i> (Hz)	δ_{C} (ppm)*	COSY	HMBC
1	3,68 (<i>t</i> , 7,20)	65,8	H-2	C2, C3
2	2,71 (<i>t</i> , 7,20)	40,5	H-1	C1, C3
3	-	131,7		
4/8	7,03 (<i>d</i> “AB”, 8,50)	132,1	H-5/7	C2, C6, C3
5/7	6,70 (<i>d</i> “AB”, 8,50)	117,3	H-4/8	C3,C6
6	-	158,3		

*Dados extraídos do mapa de correlação HSQC e HMBC

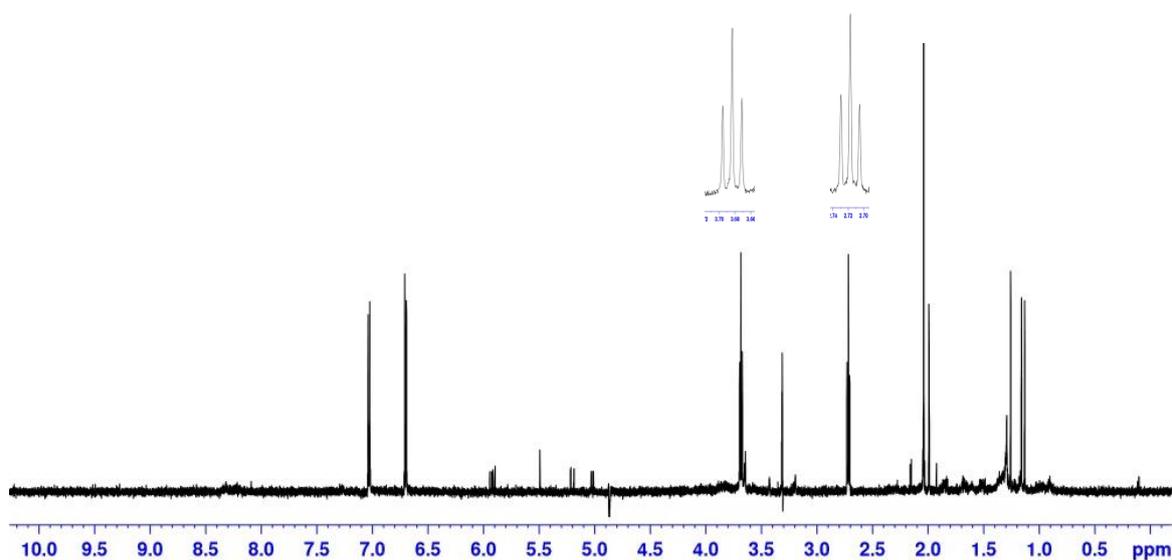


Figura 4.82. Espectro de RMN de ^1H e expansões do tirosol. Dados obtidos utilizando a sequência de pulsos com dupla pré-saturação: lc1pnf2 (nome Bruker), número de promediações 64.

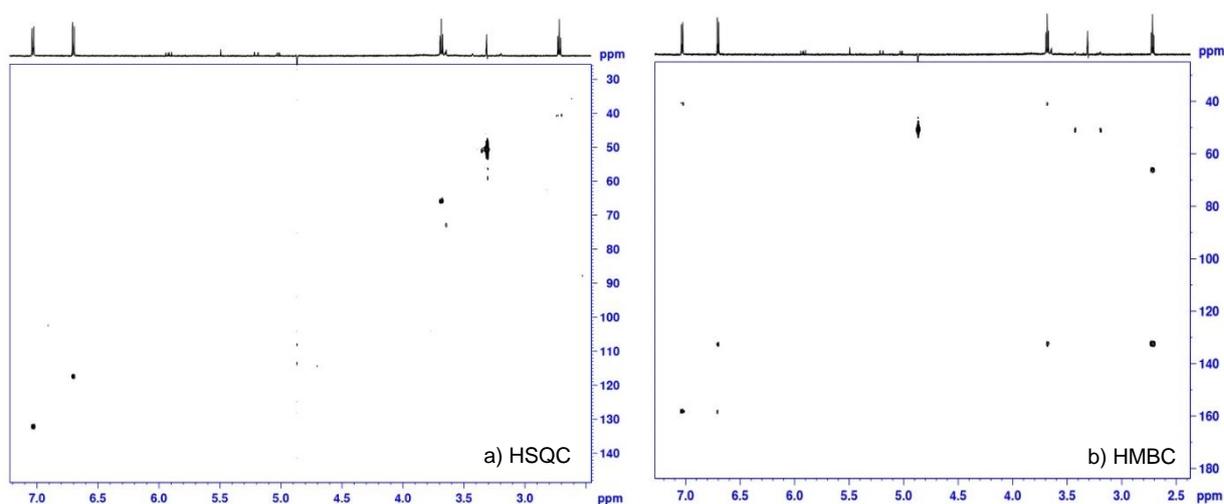
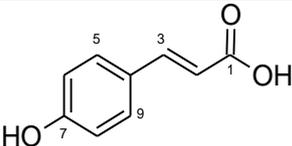


Figura 4.83. Mapas de correlação HSQC(a) e HMBC (b) do tirosol.

d) Análise do composto majoritário presente no pico MI-BRa4 (ácido *p*-cumárico).

O espectro de RMN de ^1H (figura 4.84) do composto presente no pico MI-BRa4, apresentou sinais característicos para um sistema aromático 1-4 substituído, em δ 6,28 e δ 7,60. Conectado a esse anel aromático observou-se a presença de um sistema olefínico α a uma carboxila. Essas informações aliadas aos dados obtidos nos mapas de correlação HSQC e HMBC (figura 4.85, tabela 4.21) nos levaram à identificação do ácido *p*-cumárico.

Tabela 4.21. Dados espectroscópicos para o composto presente em MI-BRa4 (ácido *p*-cumárico) (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, MeOD).



H/C	δ_{H} (ppm) , J (Hz)	δ_{C} (ppm)*	HMBC
1	-	170,5	
2	6,28 (<i>d</i> , 16,0)	115,0	C1, C4
3	7,60 (<i>d</i> , 16,0)	145,9	C1, C2, C5/9
4	-	126,7	
5/9	7,45 (<i>d</i> "AB", 8,8)	130,5	C3, C7
6/8	6,81 (<i>d</i> "AB", 8,8)	116,3	C4, C7
7	-	160,7	

*Dados extraídos do mapa de correlação HSQC e HMBC

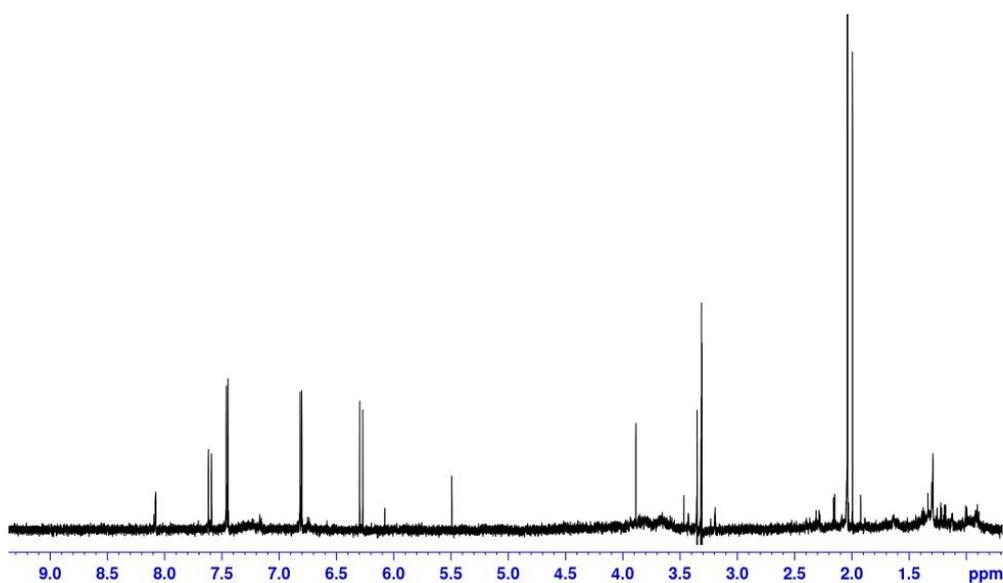


Figura 4.84. Espectro de RMN de ^1H do ácido *p*-cumárico. Dados obtidos utilizando a sequência de pulsos com dupla pré-saturação: lc1pnf2 (nomenclatura Bruker), número de promediações 64.

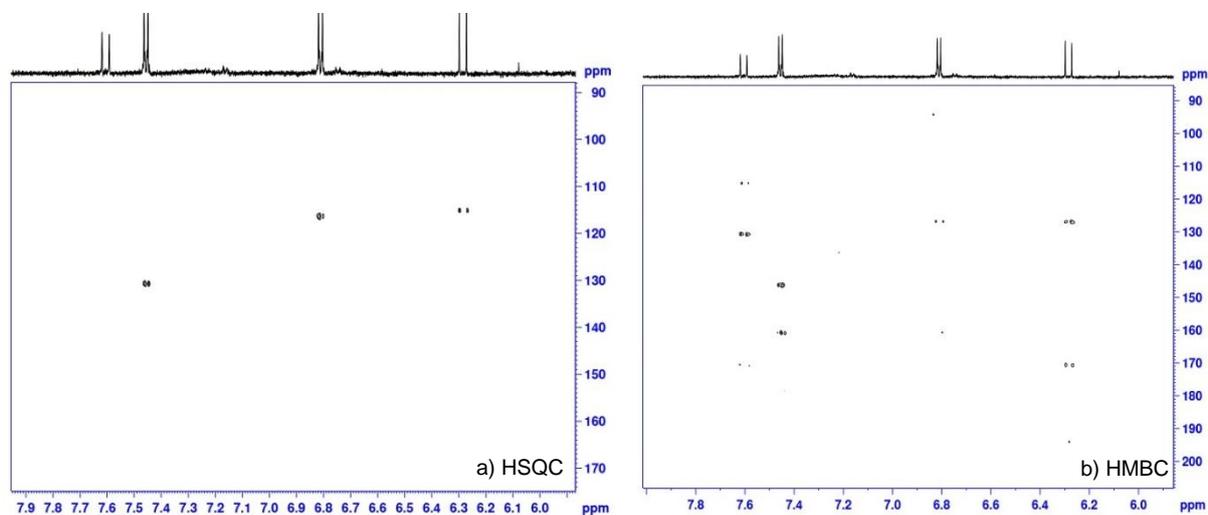


Figura 4.85. Mapas de correlação HSQC(a) e HMBC (b) do ácido *p*-cumárico.

e) Análise do composto majoritário presente no pico MI-BRa10 (4-(3-hidroxi-1-butenilideno)-3,5,5-trimetilciclohex-2-en-1-ona).

O composto majoritário observado na fração 10 de MI-BRa, apresentou no espectro de RMN de ^1H (figura 4.86) novamente evidências da presença do sistema “3,5,5-trimetilciclohex-2-en-1-ona”, o mesmo grupo presente no ácido abscísico e derivados. Observa-se a presença de três metilas, em δ 1,19, δ 1,21 e δ 2,04; de um hidrogênio olefínico δ 5,88 e de um singlete largo em δ 2,39, correspondente aos hidrogênios metilênicos H-6. Através das correlações observadas no HMBC (figura 4.87) de H-6, H2' e das metilas 5a-Me e 5b-Me com um sinal em δ 117,5, foi atribuído ao C-4 esse deslocamento químico. O quintupletto em δ 4,41 apresenta correlação com um sinal em δ 206,2, atribuído então ao C-1', de um dieno cumulado como mostrado na tabela 4.22.

Tabela 4.22. Dados espectroscópicos para o composto presente em MI-BRa10 (4-(3-hidroxi-1-butenilideno)-3,5,5-trimetilciclohex-2-en-1-ona) (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, MeOD).

H/C	δ_{H} (ppm) , J (Hz)	δ_{C} (ppm)*	COSY	HMBC
1	-	202,8		-
2	5,88 (<i>s</i>)	127,0	3-Me	
3	-	156,8		-
4	-	117,5		-
5	-	38,5		-
6	2,39 (<i>s</i>)	53,1		5b-Me, C5, C4, C1
1'	-	206,2		-
2'	5,80- 5,83 (<i>m</i>)	104,4	H-3'	C4
3'	4,41 (<i>quint</i> , 6,35)	68,0	H-4'	C1'
4'	1,33 (<i>d</i> , 6,35)	24,9		C3', C2'
3-Me	2,04 (<i>s</i>)	22,8		C4, C2, C3
5a-Me	1,19 (<i>s</i>)	29,9		5b-Me, C4, C5, C6
5b-Me	1,21 (<i>s</i>)	30,5		5a-Me, C4, C5, C6

*Dados extraídos do mapa de correlação HSQC e HMBC; *quint* = quintupletto

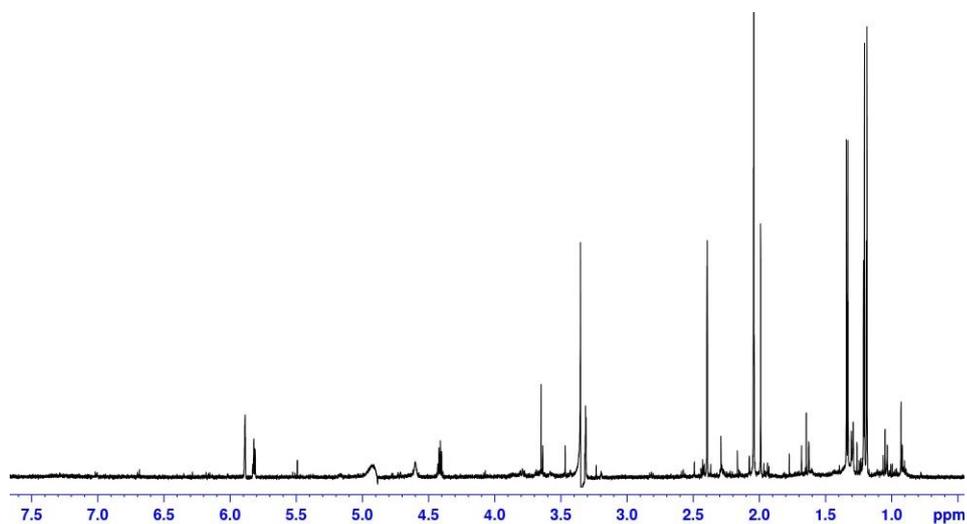


Figura 4.86. Espectro de RMN de ^1H de 4-(3-hidroxi-1-butenilideno)-3,5,5-trimetilciclohex-2-en-1-ona. Dados obtidos utilizando a sequência de pulsos com dupla pré-saturação: lc1pnf2 (nomenclatura Bruker), número de promediações 32.

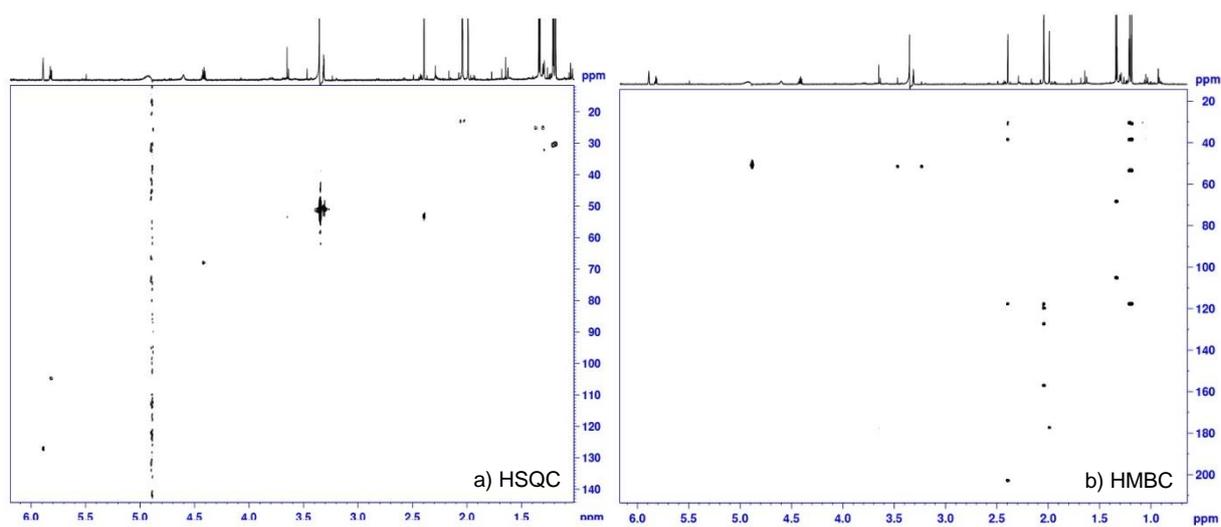


Figura 4.87. Mapas de correlação HSQC(a) e HMBC (b) de 4-(3-hidroxi-1-butenilideno)-3,5,5-trimetilciclohex-2-en-1-ona.

f) Análise do composto majoritário presente no pico MI-BRa11 (4-(3-Oxobut-1-enilideno)-3,5,5-trimetilciclohex-2-en-1-ona).

Para a substância presente em MI-BRa11, observou-se sinais muito similares aos observados na fração MI-BRa10, mostrada anteriormente, como pode ser visto na figura 4.88. No entanto, no mapa de correlação HMBC (figura 4.89), observou-se a presença de uma carbonila que apresenta correlação com os hidrogênios (H-4') da metila em δ 2,28. Dessa forma a proposta para a estrutura presente nessa fração baseando-se nessas informações e nas demais mostradas na tabela 4.23, é o composto denominado 4-(3-Oxobut-1-enilideno)-3,5,5-trimetilciclohex-2-en-1-ona, relatado a primeira vez em mel.

Tabela 4.23. Dados espectroscópicos para o composto presente em MI-BRa11 (4-(3-Oxobut-1-enilideno)-3,5,5-trimetilciclohex-2-en-1-ona) (^1H 600 MHz, ^{13}C 200 MHz, MeOD).

H/C	δ_{H} (ppm) , J (Hz)	δ_{C} (ppm)*	COSY	HMBC
1	-	201,3		-
2	6,01 (<i>s</i>)	129,0	3-Me	
3	-	152,5		-
4	-	119,3		-
5	-	39,5		-
6	2,48 (<i>s</i>)	52,3	5a-Me	C4, C1
1'	-	ND		-
2'	6,27 (<i>s</i>)	104,3		-
3'	-	200,4		-
4'	2,28 (<i>s</i>)	29,0		C3'
3-Me	2,07 (<i>s</i>)	22,5		C4, C2, C3
5a-Me	1,26 (<i>s</i>)	30,2		5b-Me, C4, C5, C6
5b-Me	1,30 (<i>s</i>)	29,9		5a-Me, C4, C5, C6

*Dados extraídos do mapa de correlação HSQC e HMBC; *s*/ = singlete largo; ND = não determinado

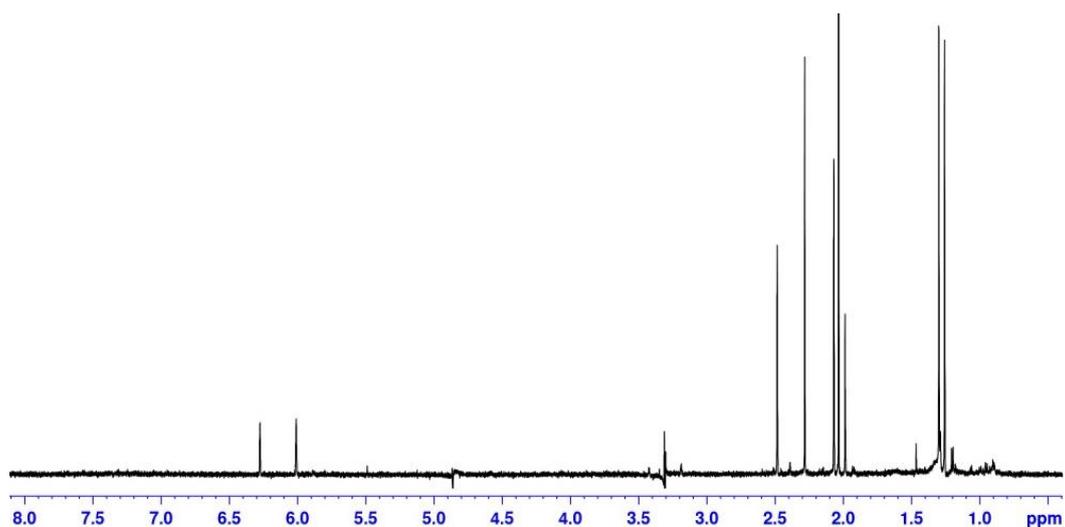


Figura 4.88. Espectro de RMN de ^1H de 4-(3-Oxobut-1-enilideno)-3,5,5-trimetilciclohex-2-en-1-ona. Dados obtidos utilizando a sequência de pulsos com dupla pré-saturação: lc1pnf2 (nomenclatura Bruker), número de promediações 32.

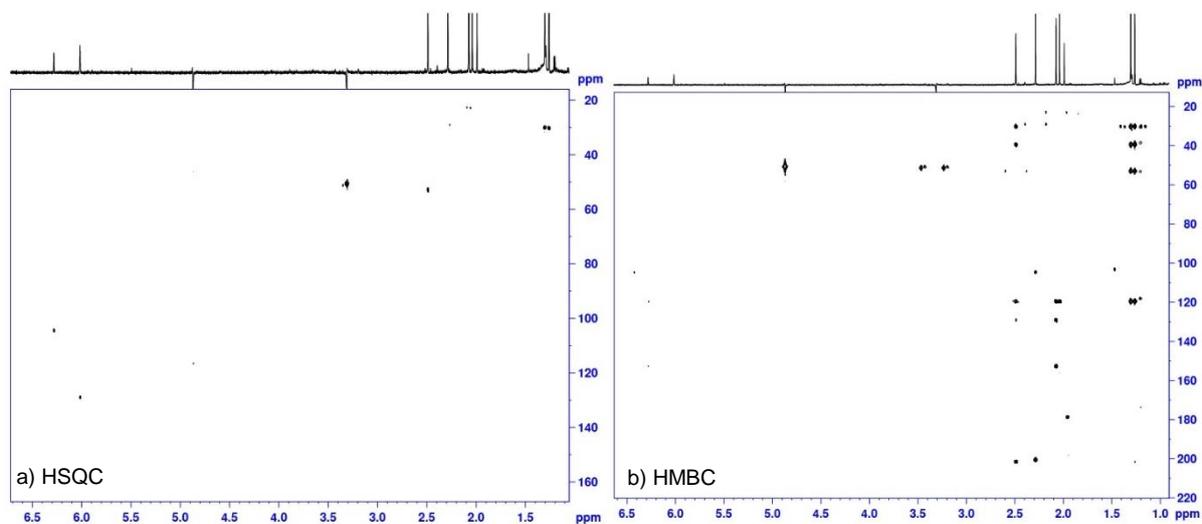


Figura 4.89. Mapas de correlação HSQC(a) e HMBC (b) de 4-(3-Oxobut-1-enilideno)-3,5,5-trimetilciclohex-2-en-1-ona.

g) Análise do composto majoritário presente no pico MI-BRa11 (2-fenil-etil- α -D-glicosídeo).

No espectro de RMN de ^1H (figura 4.90) da substância presente no pico 11, foram observados sinais que caracterizaram a presença de um anel aromático monossustituído e também de uma glicose. Com base nas informações retiradas dos mapas de correlação HSQC e HMBC (figura 4.91, tabela 4.24) pôde-se propor para esse pico a estrutura do composto 2-fenil-etil- α -D-glicosídeo.

Tabela 4.24. Dados espectroscópicos para o composto presente em MI-BRa12 (2-fenil-etil- α -D-glicosídeo) (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, MeOD).

H/C	δ_{H} (ppm) , J (Hz)	δ_{C} (ppm)*	COSY	HMBC
1	-	142,0	-	
2/6	7,25- 7,27 (<i>m</i>)	130,0		
3/5	7,25- 7,27 (<i>m</i>)	130,0		
4	7,15- 7,19 (<i>m</i>)	126,9		
7	2,94 (<i>t</i> , 7,4)	36,4	H-8a, H-8b	C-1, C-2/6, C-8
8	(a) 3,67- 3,70 (<i>m</i>)	70,1	H-7, H-8b	
	(b) 3,91 (<i>dt</i> , 9,6)		H-7, H-8a	
1'	4,80 (<i>d</i> , 3,5)	100,0	H-2'	
2'	3,35-3,40 (<i>m</i>)	73,4	H-3'	
3'	3,58-3,62 (<i>m</i>)	74,8	H-4'	C2'
4'	3,24-3,29 (<i>m</i>)	71,6	H-3', H-5'	
5'	3,35-3,40 (<i>m</i>)	73,4	H-4'	
6'	(a) 3,58-3,62 (<i>m</i>)	62,3	H-5', H-6b'	
	(b) 3,68-3,71 (<i>m</i>)		H-5', H-6a'	

*Dados extraídos do mapa de correlação HSQC e HMBC; *dt*- duplo tripleto.

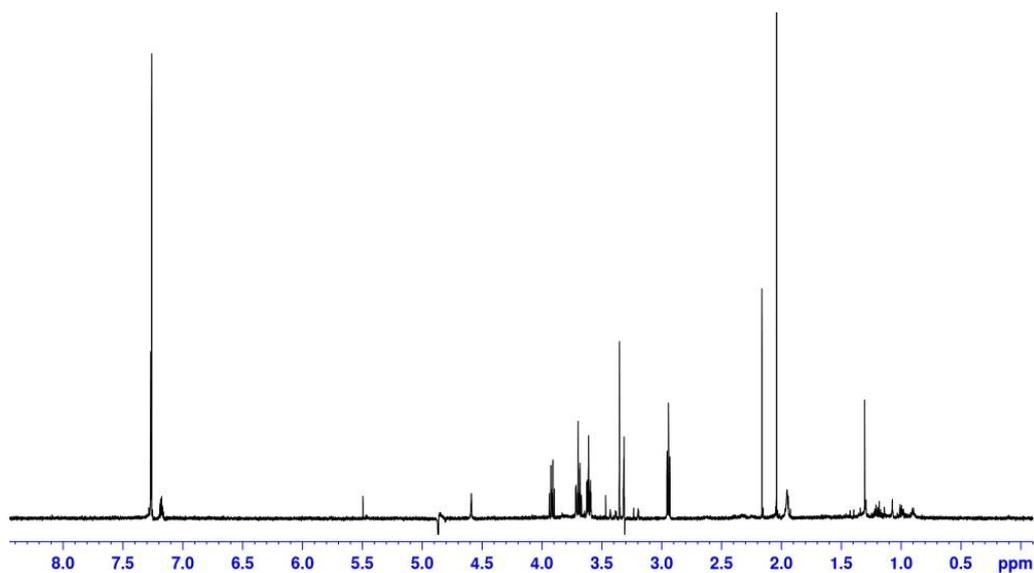


Figura 4.90. Espectro de RMN de ^1H de 2-fenil-etil- α -D-glicosídeo. Dados obtidos utilizando a sequência de pulsos com dupla pré-saturação: lc1pnf2 (nomenclatura Bruker), número de promediações 64.

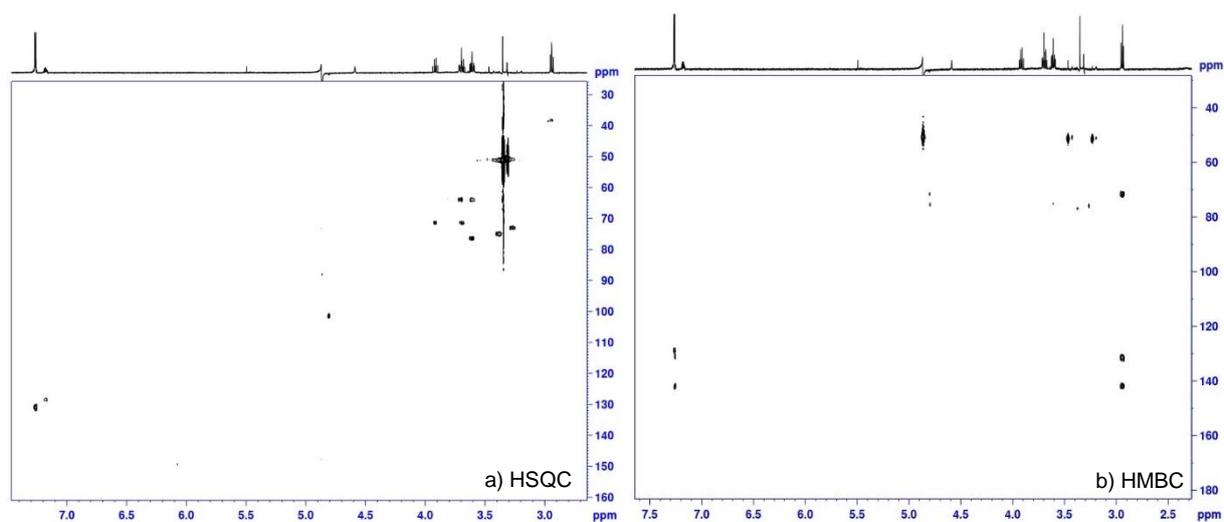


Figura 4.91. Mapas de correlação HSQC(a) e HMBC (b) de 2-fenil-etil- α -D-glicosídeo.

h) Análise do composto majoritário presente no pico MI-BRa16 (ácido 2-hidróxi-benzenopropanóico).

Para o composto presente no pico 16, foram observados no espectro de RMN de ^1H sinais característicos de um anel monossustituído, dois duplo dubletos em δ 2,89 e δ 3,09, integrando para um hidrogênio cada, e ainda um outro duplo dubleto em δ 4,32, característico de um hidrogênio ligado a um carbono carbinólico. No mapa de correlação HMBC (figura 4.25) observou-se a correlação dos hidrogênios δ 2,89 e δ 3,09 com um sinal em δ 178,6, de uma carboxila. Todas essas informações aliadas às demais mostradas na tabela 4.25 levaram à identificação do ácido 2-hidróxi-benzenopropanóico.

Tabela 4.25. Dados espectroscópicos para o composto presente em MI-BRa16 (ácido 2-hidróxi-benzenopropanóico) (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, MeOD).

H/C	δ_{H} (ppm) , J (Hz)	δ_{C} (ppm)*	COSY	HMBC
1	-	178,6	-	-
2	4,32 (<i>dd</i> , 8,0; 4,4)	74,2	H-3a, H-3b	-
3	(a) 2,89 (<i>dd</i> , 14,0; 8,0)	43,0	H-3b, H-2	C1, C2, C4, C6/8
	(b) 3,09 (<i>dd</i> , 14,0; 4,4)		H-3a, H-2	
4	-	140,3	-	-
5/9	7,24- 7,27 (<i>m</i>)	130,5	-	C3, C7
6/8	7,24- 7,27 (<i>m</i>)	132,0	-	C4
7	7,17- 7,21 (<i>m</i>)	128,8	-	-

*Dados extraídos do mapa de correlação HSQC e HMBC; *dd*- duplo dubleto

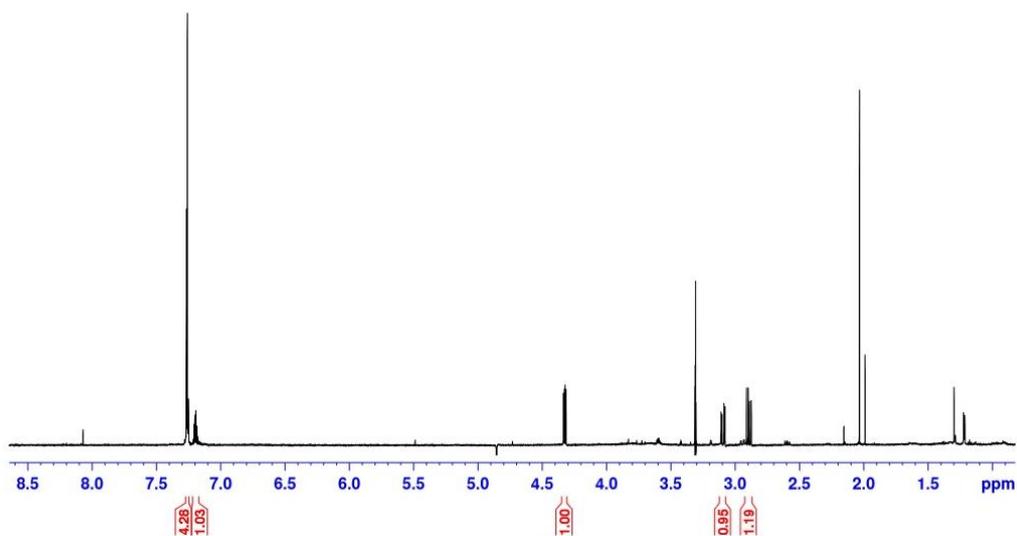


Figura 4.92. Espectro de RMN de ^1H do ácido 2-hidróxi-benzenopropanóico. Dados obtidos utilizando a sequência de pulsos com dupla pré-saturação: lc1pnf2 (nomenclatura Bruker), número de promediações 32.

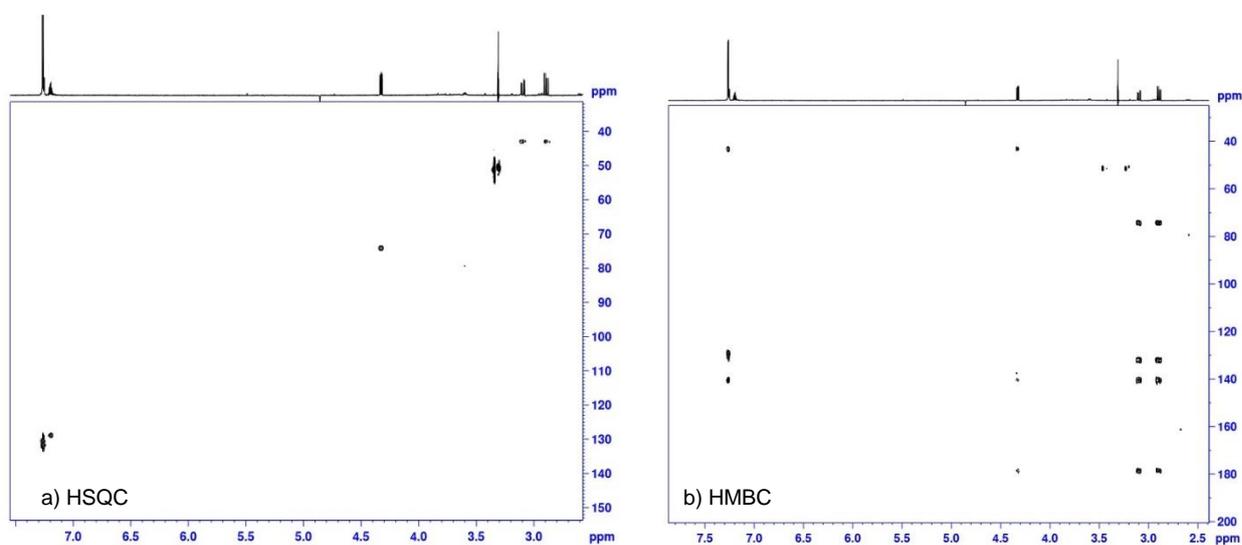


Figura 4.93. Mapas de correlação (a) HSQC e (b) HMBC do ácido 2-hidróxi-benzenopropanóico.

i) Análise do composto majoritário presente no pico MI-BRa17 (1-fenil-2,3-butanodiol).

O espectro de RMN de ^1H (figura 4.94) obtido para o composto presente no pico 17 apresentou evidências novamente de um sistema de anel aromático monossustituído, agora apresentando uma cadeia com um diol, como substituinte do anel. As demais informações sobre o deslocamento químico e correlações podem ser vistas na tabela 4.26 e figura 4.95.

Tabela 4.26. Dados espectroscópicos para o composto presente em MI-BRa17 (1-fenil-2,3-butanodiol) (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, MeOD).

H/C	δ_{H} (ppm) , J (Hz)	δ_{C} (ppm)*	COSY	HMBC
1	(a) 2,65 (<i>dd</i> , 13,8; 8,7) (b) 2,87 (<i>dd</i> , 13,8; 4,2)	40,1	H-1b, H-2 H-1a, H-2	C2, C1', C2'
2	3,57 (<i>dt</i> , 8,7; 4,2)	77,4	H-1a, H1b	
3	3,64 (<i>qd</i> , 6,6; 4,2)	70,4	H-4	
4	1,18 (<i>d</i> , 6,6)	18,9	H-3	C2, C3
1'	-	142,3		
2'/6'	7,26 (<i>m</i>)	130,4		C3'/5', C1
3'/5'	7,25 (<i>m</i>)	128,8		C2'/6', C1'
4'	7,16 (<i>m</i>)	126,7		

*Dados extraídos do mapa de correlação HSQC e HMBC; *qd*- quádruplo dubleto; *dt*-duplo tripleto; *dd*-duplo dubleto.

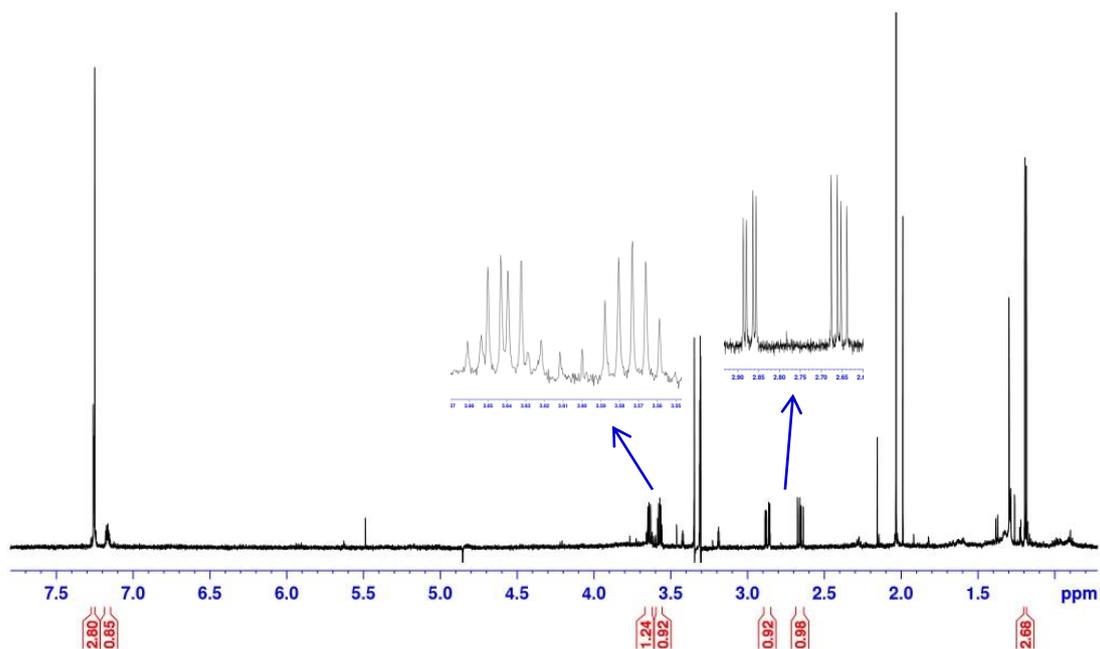


Figura 4.94. Espectro de RMN de ^1H e expansões do 1-fenil-2,3-butanodiol. Dados obtidos utilizando a sequência de pulsos com dupla pré-saturação: lc1pnf2 (nomenclatura Bruker), número de promediações 64.

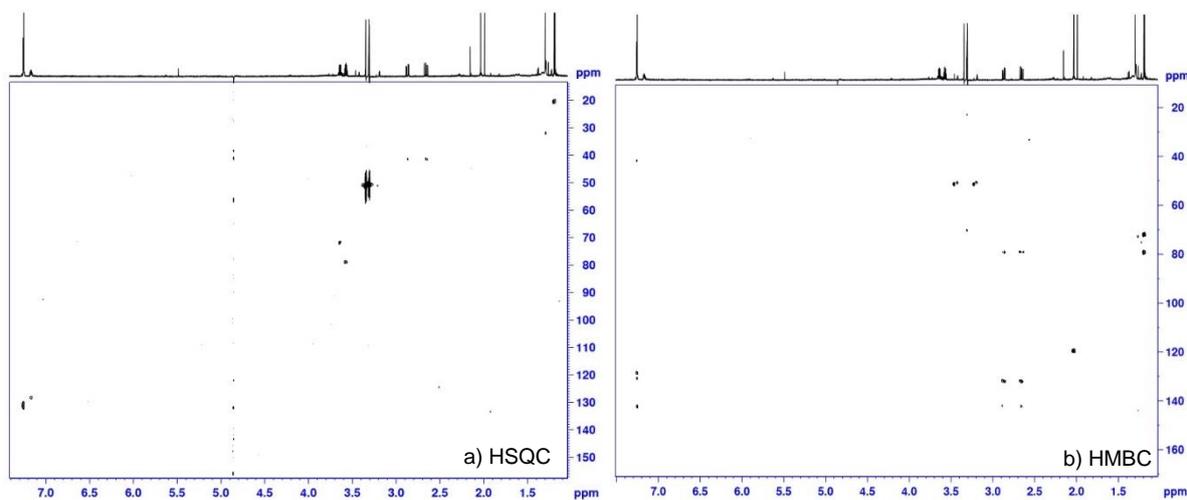


Figura 4.95. Mapas de correlação (a) HSQC e (b) HMBC do 1-fenil-2,3-butanodiol.

Todas essas substâncias foram identificadas pelo método *threshold*, ou seja, um método que depende da intensidade de absorção do composto em questão, caso na matriz em estudo exista alguma substância com baixa absorção ou que não é visível ao UV, ficamos susceptíveis a ignorar potenciais substâncias. Tendo isso em vista, optamos por realizar um estudo nessa mesma fração, MI-BRa, rastreando todas as regiões do cromatograma que não apresentaram sinais visíveis no UV. E para isso, selecionamos o modo de operação *time slice*, agora o monitoramento foi realizado através do tempo de retenção, e os intervalos de tempo selecionados foram enviados para o coletor de amostras (*loop*), esse procedimento foi realizado 3 vezes para cada região selecionada.

As figuras 4.96 e 4.97 mostram as regiões do cromatograma que foram selecionadas, o intervalo utilizado foi de 30s, ao final foram coletadas 45 frações e analisadas por RMN ^1H . Dessas, somente 4 frações apresentaram sinais interessantes no espectro de ^1H , MI-BRa14_TL a MI-BRa17_TL. Esses intervalos no cromatograma, os quais apresentaram sinal no espectro de RMN foram novamente selecionados e enviados ao coletor de amostra, na tentativa de identificarmos as substâncias, mas dessa vez foram realizadas 18 corridas. O cromatograma com as regiões selecionadas pode ser visualizado na figura 4.98.

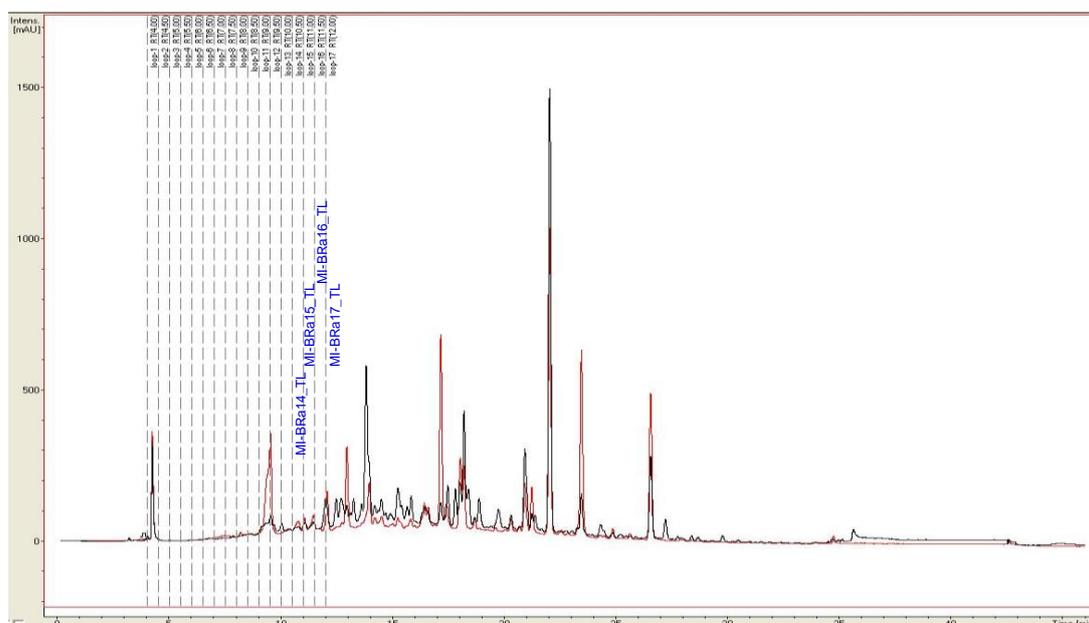


Figura 4.96. Representação gráfica do cromatograma de MI-BRa, mostrando as regiões selecionadas para alças de amostragem por *time slice*.

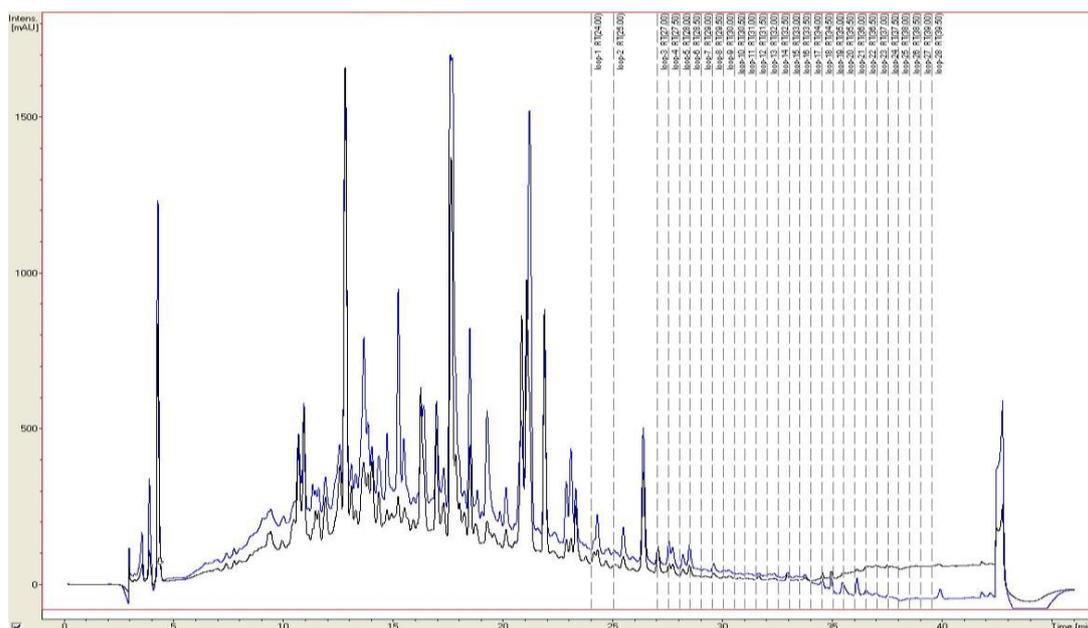


Figura 4.97. Representação gráfica do cromatograma de MI-BRa, mostrando as regiões selecionadas para alças de amostragem por *time slice*.

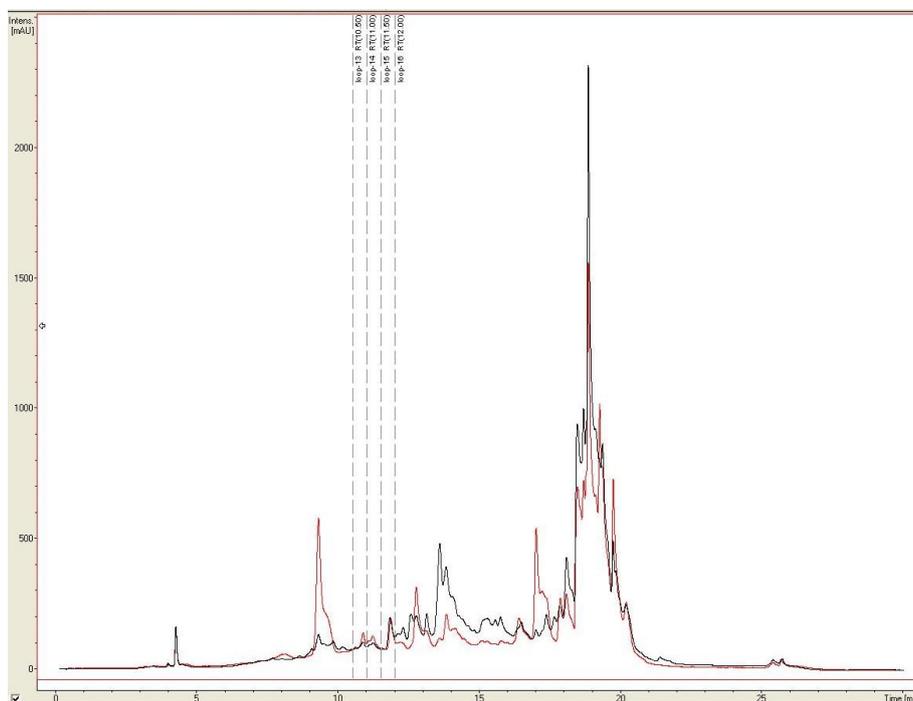
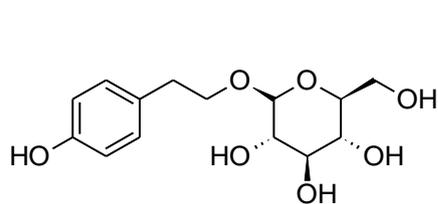
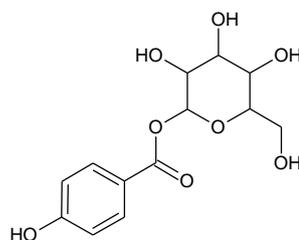


Figura 4.98. Representação gráfica do cromatograma de MI-BRa, mostrando as 4 regiões selecionadas para alças de amostragem por *time slice* para concentrar os compostos de interesse

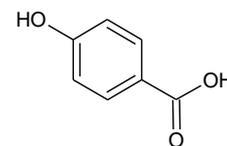
Dessas quatro (4) regiões selecionadas foram realizados experimentos de RMN 1D e 2D para identificação das substâncias. Somente a fração MI-BRa15_TL não pôde ser identificada, pois a sua concentração não foi suficiente para análises bidimensionais por RMN. As outras três regiões mostraram sinais característicos das seguintes substâncias. Das quais, as duas primeiras são inéditas em méis.



Rhodiolsídeo
(MI-BRa14_TL)

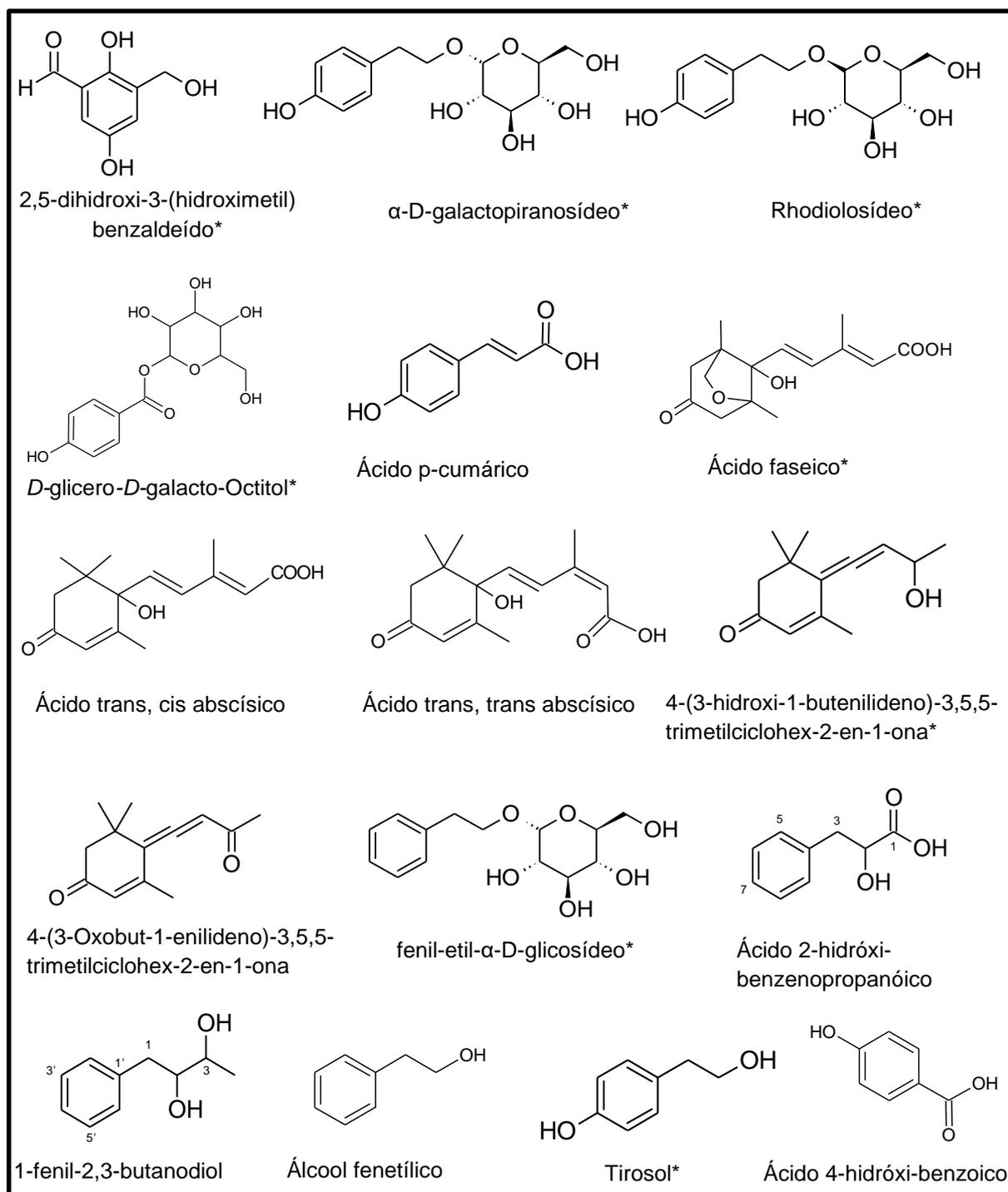


D-glicero-D-galacto-Octitol
(MI-BRa16_TL)



Ácido p-hidroxibenzóico
(MI-BRa17_TL)

No mel de *M. interrupta*, tratado com SPE *off-line* para retirar açúcar, foram identificadas 16 substâncias (figura 4.99), sendo 8 nunca relatadas em méis anteriormente. Destaca-se a importância do potencial biológico de algumas delas, por exemplo, o rhodiosídeo (salidosídeo) e o tirosol cujas principais propriedades são anti-depressivo, anti-fadiga e também melhora a capacidade mental. Esses compostos são encontrados principalmente em uma planta (*Rhodiola rosea*), muito conhecida e comercializada por apresentar tais atividades (PANOSSIANA et al., 2008).



*Não relatadas em méis anteriormente.

Figura 4.99. Substâncias identificadas no mel de *M. interrupta* após tratamento no SPE.

5.0 CONCLUSÃO

5.0 CONCLUSÃO

A partir da técnica SNIF-NMR foi possível inferir a respeito de adulterações nos méis a respeito de não estar sendo adicionado açúcar na alimentação das abelhas, pois todos os méis analisados apresentaram conteúdo de relação isotópica em torno de 100 ppm, característico de plantas que absorvem CO₂ através do ciclo C3, muito comum em plantas de florestas tropicais úmidas. Com base nesses resultados também não foi possível observar diferença na relação isotópica entre as espécies *M. seminigra* e *M. interrupta*, e tão poucas variações sazonais. No entanto, a quimiometria auxiliou efetivamente na determinação de adulterações envolvendo méis de Melipona.

A partir da quimiometria foi possível notar a separação nítida de amostras de méis autênticos e comerciais, essa separação ocorreu devido a presença de HMF e ácido cítrico somente nas amostras comerciais, da mesma forma que somente os méis autênticos apresentaram os aminoácidos fenilalanina e treonina. Com base nos resultados obtidos a partir das análises quimiométricas podemos inferir a respeito de adulterações ocorrendo na venda de méis de Melipona, pois de dez méis comerciais analisados somente dois apresentaram características condizentes com mel de abelhas sem ferrão, isso nos leva à conclusão que está sendo vendido mel de outra espécie (*Apis mellifera*) no lugar de mel de *Melipona*.

Foram identificadas ao total 21 substâncias em méis Melipona, através do uso das técnicas LC-SPE e LC-BPSU, cujo uso desta última unidade foi de extrema importância na identificação de compostos muito polares que não apresentaram retenção nas fases estacionárias dos cartuchos de SPE. Dessas, 11 não haviam sido relatadas em méis, são tirosol; fenil-etil- α -D-glicosídeo; 4-(3-hidroxi-1-butenilideno)-3,5,5-trimetilciclohex-2-en-1-ona; *D*-glicero-*D*-galacto-Octitol; rhodiolosídeo (β), rhodiolosídeo (α), 2,5-dihidroxi-3-(hidroximetil) benzaldeído, 4H-1-benzopiran-4-ona, 2,3-dihidro-1H-quinolin-4-ona, ácido faseico e xanthoceron A. De acordo com levantamento realizado a maioria das substâncias identificadas nesses méis apresenta de atividade biológica, como antifúngica, anti-depressiva, bactericida, isso pode justificar o seu uso popular intenso na região norte e sua fama diferenciada dos méis de *Apis mellifera*, o que torna o seu custo elevado.

Dos dois métodos utilizados como pré-tratamento, a limpeza dos méis utilizando cartuchos de SPE foi certamente a mais eficiente e ecologicamente correta,

devido ao baixo consumo de solventes orgânicos utilizados no tratamento, além de fornecer resultados muito mais satisfatórios.

O sistema hifenado LC-SPE e LC-BPSU, por sua vez ofereceu versatilidade, rapidez e principalmente reprodutibilidade nas análises. Além da possibilidade que encontramos de trabalhar em um modo diferenciado com as alças de amostragem (*loop*), que nos proporcionou a identificação de substâncias que não foram adsorvidas quando manipuladas de modo usual no LC-SPE.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABSY, M. L.; CAMARGO, J. M. F.; KERR, W. E. & MIRANDA, I. P. A. “Espécies de plantas visitadas por Meliponinae (Hymenoptera: Apoidea), para coleta de pólen na região do médio Amazonas”. *Rev. Bras. Biol.*, **44** (2): 227, 1984

ALBERT, K.; KUNST, M. & BAYER, E. “Reversed-phase high-performance liquid chromatography-nuclear magnetic resonance on-line coupling with solvent non-excitation”. *J. Chromatogr.*, **463**: 355, 1989.

ALBERT, K. “On-line LC–NMR and Related Techniques”. Ed. John Wiley & Sons, New York, 2004. 290p.

ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; CHOZE, R.; LIAO, L. M.; HONDA, N. K. & ALCANTARA, G. B. “Discrimination of sugarcane according to cultivar by ¹H NMR and chemometric analysis”. *J. Braz. Chem. Soc.*, **23** (3): 273, 2012.

AMAVIDA. Mel de abelhas nativas no mercado. Disponível em: <http://www.amavida.org.br>, acessado em : 10/04/2012.

AZEREDO, M. A. A.; AZEREDO, L. da C. & DAMASCENO, J. G. “Características físico-químicas dos méis do município de São Fidélis – RJ”. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **19** (1): 3, 1999.

BAUER-CHRISTOPH, C.; CHRISTOPH, N.; AGUILAR-CISNEROS, B. O.; LÓPEZ, M. G.; RICHLING, E.; ROSSMANN, A. & SCHREIER, P. “Authentication of tequila by gas chromatography and stable isotope ratio analyses”. *Eur. Food Res. Technol.* **217** (5): 438, 2003.

BAYER, E.; ALBERT, K.; NIEDER, M. & GROM, E. “On-line coupling of high-performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance”. *J. Chromatogr.*, **186**: 497, 1979.

BAYER, E.; ALBERT, K.; NLEDER, M. & GROM, E. "On-line coupling of liquid chromatography and high-field nuclear magnetic resonance spectrometry". *Anal. Chem.*, **54** (11): 1747, 1982.

BEEBE, K.; PELL, R. & SEAHOLTS, N. B. "Chemometric: A practical guide". Ed. John Wiley & Sons, New York, 1998.

BEZERRA, J. A. & SOUZA, E. "A rainha do sertão". *Rev Globo Rural*, **17** (202): 62, 2002.

BOFFO, E. F.; TAVARES, L. A.; FERREIRA, M. M. C.; FERREIRA, A. G. "Classification of Brazilian vinegars according to their ^1H NMR spectra by pattern recognition analysis". *LWT - Food Sci. Technol.*, **42** (9): 1455, 2009a.

BOFFO, E. F. "Utilização da RMN Aliada a Métodos Quimiométricos na Análise de Méis e Aguardentes". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2009b. Tese de doutorado, 177 p.

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 Sci. Technol.*, **49** (1): 55, 2012.

BOOM, A. "A geochemical study of lacustrine sediments: towards palaeo-climatic reconstructions of high Andean biomes in Colombia". Amsterdam, University of Amsterdam, 2004. Tese de doutorado. 125 p.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>, acessado em 18/04/2012.

BRESCIA, M. A.; CALDAROLA, V.; DE GIGLIO, A.; BENEDETTI, D.; FANIZZI, F.P. & SACCO, A. "Characterization of the geographical origin of Italian red wines based

on traditional and nuclear magnetic resonance spectrometric determinations". *Anal. Chim. Acta*, **458** (1): 177, 2002.

BRETERON, R. G." *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*". John Wiley & Sons, 2002.

BU, Y.; RHO, S.; KIM, J.; KIM, M. Y.; LEE, D.H.; KIM, S. Y.; CHOI, H.; KIM, H. Neuroprotective effect of tyrosol on transiente focal cerebral ischemia in rats. *Neurosci. Lett*, **414**: 218, 2007.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. 2008. Meliponini Lepeletier, 1836. In: MOURE, J. S.; URBAN, D. & MELO, G. A. R. (Orgs). *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version*. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acessado em: 15/10/2014.

CAMPOS, G. & MODESTA, R. C. D. "Diferenças sensoriais entre mel floral e mel de melato". *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **59** (1/2): 7, 2000.

CARVALHO, C. A. F.; SOUZA, B. A.; SODRÉ, G. S.; MARCHINI, L. C. & ALVES, R. M. O. "Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para caracterização físico-química. Série Meliponicultura". n. 04. 1. Ed. Cruz das Almas, BA, 2005, 32 p.

CARVALHO-ZILSE, G.; SILVA, C. G. N.; ZILSE, N.; VILAS BOAS, H. C.; SILVA, A. C.; LARAY, J. P. & KERR, W. E. "Criação de abelhas sem ferrão - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis". Projeto Manejo dos Recursos Naturais da Várzea - Iniciativas Promissoras 2. Brasma: Edições IBAMA, 2005. 18 p.

CLARIDGE, T. D. W. "High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry". 2a ed. Oxford, Elsevier, 2009. 383 p.

CLOAREC, O.; CAMPBELL, A.; TSENG, L.; BRAUMANN, U.; SPRAUL, M.; SCARFE, G.; WEAVER, R. & NICHOLSON, J. K. "Virtual Chromatographic

Resolution Enhancement in Cryoflow LC-NMR Experiments via Statistical Total Correlation Spectroscopy". *Anal. Chem.* **79** (9): 3304, 2007.

CONSONNI, R.; CAGLIANI, L. R. & COGLIATI, C. "Geographical discrimination of honeys by saccharides analysis". *Food Control* **32** (2): 543, 2013.

CORCORAN, O. & SPRAUL, M. "LC-NMR-MS in drug discovery". *Drug Discov. Today*. **8** (14): 624, 2003.

CORRE, J.; LUECHINI, J. J.; MERCIER, G. M. & CREMIEUX, A. "Antibacterial activity of phenethyl alcohol and resulting membrane alterations". *Res. Microbiol.*, **141**: 483, 1990.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ROUBIK, D. W.; DOLLIN, A.; HEARD, T.; AGUILAR, I.; VENTURIERI, G. C.; EARDLEY, C. & NOGUEIRA-NETO, P. "Global meliponiculture: challenges and opportunities". *Apidologie*, **37**: 275, 2006.

CRANE, E. "O livro do mel". 2. ed. São Paulo: Nobel, 1985. 226 p.

CROSS, J. L.; GALLAHER, T. N.; LEARY, J. J. & SCHREINER, S. "The application of Site-specific Natural Isotopic Fractionation – Nuclear Magnetic Resonance (SNIF-NMR) to the Analysis of Alcoholic Beverages". *Chem. Educ.*, **4** (5): 1, 1998.

DANHO, D.; NAULET, N. & MARTIN, G. J. "Deuterium, carbon and nitrogen isotopic analysis of natural and synthetic caffeine. Authentication of coffees and coffee extracts". *Analisis*, **20** (3): 179, 1992.

DA SILVA, I. A. A.; DA SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A.; QUEIROZ, N.; MAGNANI, M.; NOVAIS, J. S.; SOLEDADE, L. E. B.; LIMA, E. O.; SOUZA, A. L. & SOUZA, A. G. "Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil". *Food Chem.*, **141** (4): 3552, 2013.

EXARCHOU, V.; GODEJOHANN, M.; VAN BEEK, T. A.; GEROTHANASSIS, I. P. & VERVOORT, J. "LC-UV-Solid-Phase Extraction-NMR-MS Combined with a cryogenic flow probe and its application to the identification of compounds present in Greek oregano". *Anal. Chem.*, **75** (22): 6288, 2003.

EXARCHOU, V.; KRUCKER, M.; VAN BEEK, T. A.; VERVOORT, J.; GEROTHANASSIS, I. P. & ALBERT, K. "LC-NMR coupling technology: recent advancements and applications in natural products analysis". *Magn. Reson. Chem.*, **43** (9): 681, 2005;

FERRERES, F.; ANDRADE, P. & TOMÁS-BARBERÁN, F. A. "Natural Occurrence of Abscisic Acid in Heather Honey and Floral Nectar". *J. Agric. Food Chem.*, **44**: 2053, 1996.

GRIFFITHS, L. "Optimization of NMR and HPLC Conditions for LC-NMR". *Anal. Chem.*, **67** (22): 4091, 1995.

GUERRINI, A.; BRUNI, R.; MAIETTI, S.; POLI, F.; ROSSI, D.; PAGANETTO, G.; MUZZOLI, M.; SCALVENZI, L. & SACCHETTI, G. "Ecuadorian stingless bee (*Meliponinae*) honey: A chemical and functional profile of an ancient health product". *Food Chem.*, **114** (4): 1413, 2009.

GUILLOU, C.; REMAUD, G. & MARTIN, G. J. "Applications of NMR to the characterization and authentication of foods and beverages". *Trends Food Sci. Tech.*, **3**: 197, 1992.

GUIMARÃES, D. O.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; PUPO, M. T. A simple method for the quantitative analysis of tyrosol by HPLC in liquid Czapek cultures from Endophytic fungi. *J. Braz. Chem. Soc.*, **20** (1): 188, 2009.

HALL, D. O.; SCURLOCK, J. M. O.; BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R.; LEEGOOG, R. C. & LONG, S. P." Photosynthesis and production in a changing environment. A field and laboratory manual". New York, Chapman & Hall, 1995. 477 p.

JACOBSEN, N. E. "NMR Spectroscopy Explained: Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology". 1a ed. New Jersey, John Wiley & Sons, 2007. 688 p.

JALALI-HERAVI, M.; MASOUM, S. & SHAHBAZIKHAH P. "Simulation of ^{13}C nuclear magnetic resonance spectra of lignin compounds using principal component analysis and artificial neural networks". J. Magn. Reson., **171** (1): 176, 2004.

JIANG, F & HARTUNG, W. "Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal". J. Exp. Bot., **59** (1): 37, 2008

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A. & NASCIMENTO, V. A. "Abelha Uruçu: biologia, manejo e conservação". Fundação Acangaú, Paracatu-MG. 1996, 143p.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; SILVA, A. C. & ASSIS, M. G. P. "Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. Parcerias Estratégicas". In: Biodiversidade, Pesquisa e Desenvolvimento na Amazônia, Ministério da Ciência e Tecnologia, n. 12, p. 20-41, set. 2001.

KERR, W. E. "Extinção de espécies: a grande crise biológica do momento e como afeta os meliponíneos". Anais do V Encontro sobre Abelhas. Ribeirão Preto - SP, 2002. vol. 1, p. 4-9.

KOWALSKI, B. R. & REILLY, C. A. "Nuclear magnetic resonance spectral interpretation by pattern recognition". J. Phys. Chem., **75** (10): 1402, 1971.

LEHNINGER, A. L. "Bioquímica. Biossíntese e a utilização da energia das ligações de fosfato". vol 3. São Paulo, Edgard Blücher, 2006.

LEVSEN, K.; PREISS, A. & GODEJOHANN, M. "Application of high-performance liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry to complex environmental samples". Trends Analyt. Chem., **19** (1): 27, 2000.

- LINDNER, P.; BERMAN, E. & GAMARNIK, B. Characterization of citrus honey by deuterium NMR. *J. Agric. Food Chem.*, **44** (1): 139, 1996.
- LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E. & EVERETT, J. R. "Metabonomics: metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids". *Concepts Magn. Reson.*, **12** (5): 289, 2000.
- MACMILLAN, J. & PRYCE, R. J. "Plant hormones-X: The constitution of phaseic acid; A relative of abscisic acid from *Phaseolus multiflorus*. An interpretation of the mass spectrum of phaseic acid and a probable structure". *Tetrahedron*, **25** (24): 5903, 1969.
- Manual do programa Amix[®] de análises quimiométricas. Bruker Biospin, Karlsruhe, 2004.
- MARCHINI, L. C.; CARVALHO, C. A. L.; ALVES, R. M. O.; TEIXEIRA, G. M.; OLIVEIRA, P. C. F. & RUBIA, V. R. "Características físico-químicas de amostras de méis da abelha urucu (*Melipona scutellaris*)". *Anais do XII Congresso Brasileiro de Apicultura*. Salvador - BA, 1998. vol. 1, p. 201.
- MARQUES-SOUZA, A. C. "Fontes de pólen exploradas por *Melipona compressipes manaosensis* (Apidae: Meliponinae), abelhas da Amazônia Central". *Acta Amazon.*, **26** (1/2): 77, 1996.
- MARQUES-SOUZA, A. C.; MIRANDA, I. P. A.; MOURA, C. O.; RABELO, A. & BARBOSA, E. M. "Características morfológicas e bioquímicas do pólen coletado por cinco espécies de meliponíneos da Amazônia Central". *Acta Amazon.*, **32** (2): 217, 2002.
- MARTIN, G. J. & MARTIN, M. L. Deuterium labelling at the natural abundance level as studied by high field quantitative ²H NMR. *Tetrahedron Lett.* **22** (36): 3525, 1981.
- MARTIN, G. J.; MARTIN, M. L.; MABON, F. & MICHON, M. J. "A new method for the identification of the origin of ethanols in grain and fruit spirits: high-field quantitative

deuterium nuclear magnetic resonance at the natural abundance level". J. Agric. Food Chem. **31** (2): 311, 1983.

MARTIN, G. J.; GUILLOU, C.; MARTIN, M. L.; CABANIS, MARIE-THÉRÈSE; TEP, Y. & AERNY, J. "Natural factors of isotope fractionation and the characterization of wines". J. Agric. Food Chem. **36** (2): 316, 1988.

MARTIN, G. J. "The chemistry of chaptalization". Endeavour, **14** (3): 137, 1990.

MARTIN, M. L.; MARTIN, G. J. & GUILLOU, C. "A site-specific and multi-element isotopic approach to origin inference of sugars in foods and beverages". Mikrochim. Acta, **104** (1-6): 81, 1991.

MICHALKIEWICZ, A.; BIESAGA, M. & PYRZYNSKA, K. "Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey". J. Chromatogr. A, **1187** (1-2): 18, 2008.

MOITA-NETO, J. M. & MOITA, G. C. "Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. Quim. Nova, **21**(4): 467, 1998.

NOGUEIRA-NETO, P. "Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão". Editora Nogueirapis: São Paulo, SP, 1997. 445 p.

NUNES-SILVA, C. G.; ASTOLF-FILHO, S. & CARVALHO-ZILSE, G. A. "Sex and Caste in Amazonian Melipona Bees". Anais do VIII Encontro sobre Abelhas. Ribeirão Preto - SP, 2008. vol. 1, p.116-120.

OGRINC, N., KOŠIR, I. J.; KOCJANČIČ, M. & KIDRIČ, J. "Determination of authenticity, regional origin, and vintage of slovenian wines using a combination of IRMS and SNIF-NMR analyses". J. Agric. Food Chem. **49** (3): 1432, 2001.

OGRINC, N.; KOŠIR, I. J.; SPANGENBERG, J. E. & KIDRIČ, J. "The application of NMR and MS methods for detection of adulteration of wine, fruit juices, and olive oil. A review". Anal. Bioanal. Chem. **376** (4): 424, 2003.

- OLIVEIRA, C. R. “Emprego da RMN aliada à quimiometria no controle de qualidade de suco de laranja”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2012. Dissertação de mestrado, 86 p.
- OWSTON, E & LOUGH, R. “A 90-day toxicity study of phenylethyl alcohol in the rat”. *Food Cosmet Toxicol.* **19**: 713, 1981.
- PANERO, F. S. & DA SILVA, H. E. B. “Application of exploratory data analysis for the characterization of tubular wells of the North of Brazil”. *Microchem. J.*, **88** (2): 194, 2008.
- PANERO, F. S.; VIEIRA, M. F. P.; DA CRUZ, A. M. F. & MOURA, M. F. V. “Aplicação da análise exploratória de dados na discriminação geográfica do quiabo do Rio Grande do Norte e Pernambuco”. *Orbital*, **1** (3); 228, 2009.
- PANOSSIANA, A., NIKOYAN, N., OHANYAN, N., HOVHANNISYAN, A., ABRAHAMYAN, H., GABRIELIAN, E., WIKMAN, G. “Comparative study of *Rhodiola* preparations on behavioral despair of rats”. *Phytomed.*, **15**: 84, 2008.
- PAWLUS, A. D.; CANTOS-VILLAR, E.; RICHARD, T.; BISSON, J.; POUPARD, P.; PAPASTAMOULIS, Y.; MONTI, J. P.; TEISSEDRE, P. L.; WAFFO-TÉGUOA, P. & MÉRILLON, J. M. “Chemical dereplication of wine stilbenoids using high performance liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy”. *J. Chromatogr.*, **1289**: 19, 2013.
- PERALTA, F. J. A.; MESQUITA, H. G. & ASSIS, M. G. P. “Iniciação a Meliponicultura: criação de abelhas melíferas sem ferrão”. INPA/ IPAAM/ SEBRAE. Manaus, AM, 1999, 95p.
- PIMENTEL, R. B. Q.; COSTA, C. A.; ALBUQUERQUE, P. M. & DUVOISIN-JUNIOR, S. “Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manaosensis* and commercial honey”. *BMC Complem. Altern. M.* **13** (151): 2, 2013.

PORTUGAL-ARAÚJO, V. "Contribuição Para o Conhecimento da Biologia, Cultura e Domesticação das Abelhas Amazônicas". Manaus, Programa de Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Fundação Universidade do Amazonas, 1978. Tese de Doutorado ,180 p.

QUEIROZ-JÚNIOR L. H. K.; QUEIROZ, D. P. K.; DHOOGHE, L.; FERREIRA, A. G. & GIRAudeau, P. "Real-time separation of natural products by ultrafast 2D NMR coupled to on-line HPLC". *Analyst*, **137** (10): 2357, 2012.

REID, L. M.; O'DONNELL, C. P. & DOWNEYA, G. "Recent technological advances for the determination of food authenticity". *Trends Food Sci. Tech.* **17** (7): 344, 2006.

ROYER, A.; NAULET, N.; MABON, F.; LEES, M. & MARTIN, G. J. Stable isotope characterization of olive oils: II-deuterium distribution in fatty acids studied by nuclear magnetic resonance (SNIF-NMR). *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **76** (3): 1, 1999.

SANZ, M. L.; CASTILLO, M. D.; CORZO, N. & OLANO, A. "2-Furylmethyl amino acids and hydroxymethylfurfural as indicators of honey quality". *J. Agric. Food Chem.*, **51** (15): 4278, 2003.

SEGER, C.; GODEJOHANN, M.; TSENG, L. H.; SPRAUL, M.; GIRTLER, A.; STURM, S. & STUPPNER, H. "LC-DAD-MS/SPE-NMR Hyphenation. A tool for the analysis of pharmaceutically used plant extracts: identification of isobaric iridoid glycoside regioisomers from *Harpagophytum procumbens*". *Anal. Chem.* **77** (3): 878, 2005.

SILVA, T. M. S.; SANTOS, F. P.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; DA SILVA, E. M. S.; DA SILVA, G. S.; NOVAIS, J. S.; SANTOS, F. A. R. & CAMARA, C. A. "Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey". *J. Food Compos. Anal.*, **29** (1): 10, 2013.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. & ALMEIDA, E. A. B. “Abelhas brasileiras: Sistemática e Identificação”. 2. ed. Fundação Araucária, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2002. 253 p.

SLININGER, P. J.; BURKHEAD, K. D.; SCHISLER, D. A. Antifungal and sprout regulatory bioactivities of phenylacetic acid, indole-3-acetic acid, and tyrosol isolated from the potato dry rot suppressive bacterium *Enterobacter cloacae* S11:T:07. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., **31**: 517, 2004.

SNYDER, L. R. & DOLAN, J. W. “Initial experiments in high-performance liquid chromatographic method development. I. Use of a starting gradient run”. J. Chromatogr. A, **721** (1): 3, 1996.

SOUSA, R. A.; BORGES-NETO, W.; POPPI, R. J.; BACCAN, N. & E CADORE, S. “Classificação de água de coco processada e natural por meio de HCA, PCA e teores de íons metálicos determinados por ICP OES”. Quim. Nova, 29 (4): 654, 2006.

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 Amazon., **34** (2): 333, 2004.

SOUZA, A. M. & POPPI, R. J. “Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I”. Quim. Nova, **35** (1): 223, 2012.

SPANO, N.; CASULA, L.; PANZANELLI, A.; PILO, M. I.; PIU, P. C.; SCANU, R.; TAPPARO, A. & SANNA, G. “An RP-HPLC determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey. The case of strawberry tree honey”. Talanta, **68** (4): 1390, 2006.

SPRAUL, M.; HOFMANN, M. & DVORTSAK, P. “High-performance liquid chromatography coupled to high-field proton nuclear magnetic resonance spectroscopy: Application to the urinary metabolites of ibuprofen”. Anal. Chem., **65** (4): 327, 1993.

SPRAUL, M.; SCHÜTZ, B. HUMPFER, E.; MÖRTTER, M.; SCHÄFER, H.; KOSWIG, S. & RINKE, P. "Mixture analysis by NMR as applied to fruit juice quality control". *Magn. Reson. Chem.*, **47** (1): 130, 2009.

TATSIS, E. C.; BOEREN, S.; EXARCHOU, V.; TROGANIS, A. N.; VERVOORT, J. & GEROTHANASSIS, I. P. "Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS". *Phytochemistry*, **68** (3): 383, 2007.

THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, n. 2676/90. Community methods for the analysis of wines. 3 (34), 1990. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/homepage.html>, acessado em 01/09/2014.

THOMASI, S. S.; GRANATO, A. C.; ROMANO, L. H.; DHOOGHE, L.; NASCIMENTO, E. S. P.; BADINO, A. C.; SILVA, M. F. G. F.; FERREIRA, A. G. & VENÂNCIO, T. "Unusual 2(1H)-Pyrazinones isolated from a culture of a Brazilian marine-derived *Streptomyces* sp". *Nat. Prod. Commun.*, **9** (9): 1275, 2014.

TODE, C.; MAOKA, T. & SUGIURA, M. "Application of LC-NMR to analysis of carotenoids in foods". *J. Sep. Sci.*, **32** (21): 3659, 2009.

VILHENA, F. & ALMEIDA-MURADIAN, L. B. de. "Análises físico-químicas de méis de S. Paulo". *Mensagem Doce*, **53**: 17, 1999.

VOET, D.; VOET, J. G. & PRATT, C. W. "Fundamentos de bioquímica". Porto Alegre, Artmed Editora, 2006.

XU, Y. J.; FOUBERT, K.; DHOOGHE, L.; LEMIÈRE, F.; MAREGESI, S.; COLEMAN, C. M.; ZOU, Y.; FERREIRA, D.; APERS, S. & PIETERS, L. "Rapid isolation and identification of minor natural products by LC-MS, LC-SPE-NMR and ECD: Isoflavanones, biflavanones and bisdihydrocoumarins from *Ormocarpum kirki*". *Phytochemistry*, **79**: 121, 2012.

ZHANG, B. L. & YUNIANITA-MARTIN, M. L. "Site-specific isotopic fractionation in the characterization of biochemical mechanisms. The glycolytic pathway". J. Biol. Chem., **270** (27): 16023, 1995.

ZHANG, BEN-LI, FALLOURD, V.; ROLE, C. & MARTIN, G. "Comparison of isotopic fractionation in lactic acid and ethanol fermentations". Bioorg. Chem., **31** (3): 227, 2003.

ZHAO, DAN-DAN; LI, DAN-YI; HUA, HUI-MING; & LI, ZHAN-LIN. "A new monoterpenoid isolated from flowers of *Xanthoceras sorbifolia*". Chinese Traditional and Herbal Drugs, **44** (1): 11, 2013.

ZHOU, Z.; LAN, W.; ZHANG, W.; ZHANG, X.; XIA, S.; ZHU, H.; YE, C. & LIU, M. "Implementation of real-time two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy for on-flow high-performance liquid chromatography". J. Chromatogr., **1154** (1-2): 464, 2007.

WATANABE, N. & NIKI, E. "Direct-coupling of FT-NMR to high performance liquid Chromatography". Proc. Japan Acad., **54** (4): 194, 1978.

WIESE, H. "Nova Apicultura". 7. ed. Porto Alegre: Agropecuária. 1986. 493p.

WOLFENDER, J. L.; RODRIGUEZ, S. & HOSTETTMANN, K. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy for the screening of plant constituents. J. Chromatogr. A, **794** (1-2): 299, 1998.

WOLFENDER, J. L.; VEROTTA, L.; BELVISI, L.; FUZZATI, N. & HOSTETTMANN, K. "Structural investigations of isomeric oxidised forms of hyperforin by HPLC-NMR and HPLC-MS". Phytochem. Anal. **14** (5): 290, 2003.