

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Exatas

Programa de Pós-Graduação em Química

Brícia Marques Parreiras

**ESTUDO PILOTO DO PRÓPOLIS DO VALE DO JEQUITINHONHA:
Uma avaliação por metabolômica global**

Belo Horizonte
2025

UFMG/ICEx/DQ. 1663^a
D. 905^a

Brícia Marques Parreiras

**ESTUDO PILOTO DO PRÓPOLIS DO VALE DO JEQUITINHONHA:
Uma avaliação por metabolômica global**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre(a) em Química.

Orientadora: Professora Adriana Nori de Macedo

Belo Horizonte
2025

Ficha Catalográfica

P259e Parreiras, Brícia Marques.
2025 Estudo piloto do própolis do Vale do Jequitinhonha [manuscrito] : uma
D avaliação por metabolômica global / Brícia Marques Parreiras. 2025.
122 f. : il., gráfs., tabs.

Orientadora: Adriana Nori de Macedo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais –
Departamento de Química.
Bibliografia: f. 94-103.
Anexo: f. 104-122.

1. Química analítica – Teses. 2. Propole – Teses. 3. Abelha – Produtos – Teses.
4. Metabolômica – Teses. 5. Cromatografia líquida – Teses. 6. Espectrometria de
massa – Teses. 7. Espectrofotometria – Teses. I. Macedo, Adriana Nori de,
Orientadora. II. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

UFMG

Programa de Pós-Graduação em Química
Departamento de Química - ICEX



"Estudo Piloto do Própolis do Vale do Jequitinhonha: Uma Avaliação Por Metabolômica Global"

Brícia Marques Parreiras

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Adriana Nori de Macedo - Orientadora
UFMG

Prof. Rodinei Augusti
UFMG

Prof. Bruno Gonçalves Botelho
UFMG

Belo Horizonte, 09 de julho de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Nori de Macedo, Professora do Magistério Superior**, em 09/07/2025, às 15:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Gonçalves Botelho, Professor do Magistério Superior**, em 09/07/2025, às 15:48, conforme horário oficial de Brasília, com



fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodinei Augusti, Professor do Magistério Superior**, em 09/07/2025, às 15:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4363945** e o código CRC **01AEA9B9**.

Dedico esta dissertação à memória dos meus tios
Vilmar, Delmar, Josimar, Helimar, Valência e
Disson.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meus caminhos e fortalecer minha jornada. Minha espiritualidade sempre me guiou com a certeza de que cada etapa, fácil ou desafiadora, carrega em si um propósito de crescimento, aprendizado e transformação.

À minha orientadora, Profa. Dr^a. Adriana Nori de Macedo, por toda a confiança, atenção, orientação e paciência. Me inspiro profundamente em sua postura como orientadora, professora e ser humano, exemplo de profissionalismo, generosidade e dedicação. Foi e sempre será um privilégio caminhar ao seu lado.

Aos meus pais, Deisimar e Breno, pelo amor incondicional e apoio em todas as esferas da vida. Obrigada por estarem sempre presentes, sustentando meus sonhos com tanto carinho e força. Sem vocês eu não estaria aqui.

À minha dinha, Dulcimar, que desde sempre acreditou no meu potencial. Obrigada por acreditar em mim mesmo nas horas em que eu duvidei, por me apoiar sem hesitar e ser uma presença constante e amorosa na minha vida.

Às minhas irmãs, Daniela, Ignis, Artemis, Florence e Maria Victoria, por serem luz, riso, inspiração e acolhimento. Obrigada pelos momentos engraçados, pelos desabafos e por tornarem tudo mais leve.

Aos meus tios Orsimar e Vera Lúcia, por serem meu porto seguro, por trazerem leveza e acolhimento, mesmo quando tudo parece difícil. Obrigada por estarem sempre por mim; saibam que também estarei sempre por vocês.

À minha irmã acadêmica Júlia, pela parceria, sintonia e amizade construída no laboratório. Por dividir comigo o aprendizado técnico e emocional (e o mesmo neurônio), e por tantas trocas que me fizeram crescer dentro e fora do ambiente científico.

Ao meu amigo Hélio, por estar presente em tantos momentos, pelas caronas, pela escuta, pelo companheirismo no dia a dia e por me ensinar tanto, de tantas formas. Com você eu conheci a lealdade verdadeira.

À minha amiga Nayara, por trazer leveza, autenticidade e alegria para os meus dias. Sua presença me lembra o quanto a vida pode ser divertida. Todo mundo merece ter uma Nayara por perto.

Aos amigos do DQ e do LACmass, Ana Granja, Túlio, Henrique, Larissa, João Victor, Mariana, Pedro e Gabriel pela amizade verdadeira e por tantos momentos compartilhados. Levo comigo não só a ciência, mas memórias e vínculos que ficaram para a vida.

Aos meus amigos da república, especialmente Cauã, André, Vitória, Granada e João, agradeço pelo companheirismo, pelas risadas de madrugada, pelos conselhos dados e recebidos, e por fazerem eu me sentir em casa em BH.

Aos meus amigos Renato, Ana Clara, Keila e Robson, por estarem sempre presentes na minha vida, mesmo quando nossas rotinas não se alinham. Vocês me alegram em qualquer tempo e lugar; nem o tempo nem a distância são capazes de nos afastar.

Ao Prof. Dr. Rodinei Augusti, por ser um grande incentivador na minha trajetória acadêmica. Sou muito grata pelos ensinamentos, pela confiança e pelas oportunidades que me motivaram a seguir em frente.

Ao Prof. Dr. André Rodrigo Rech e à Ms. Mayra Conceição Meira Silva, pela colaboração neste trabalho, pelos conhecimentos compartilhados e por todo o suporte.

À UFMG e ao Departamento de Química, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Química, por serem espaços de crescimento intelectual e pessoal. Foram anos que me permitiram amadurecer como pesquisadora e criar amizades e parcerias que levarei comigo para sempre.

Aos órgãos de fomento à pesquisa, CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio essencial para a realização deste trabalho.

"A única coisa previsível sobre a vida é que ela é imprevisível."
Remy, *Ratatouille*

RESUMO

O própolis é um produto apícola de composição complexa, cuja variabilidade química reflete a diversidade botânica e ambiental das regiões produtoras. Este trabalho teve como objetivo investigar o perfil químico de amostras de própolis coletadas em diferentes localidades do Vale do Jequitinhonha, em Minas Gerais, por meio de uma abordagem metabolômica baseada em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), buscando compreender variações associadas à origem geográfica e possíveis influências da vegetação local. Adicionalmente, espectros de absorção molecular na região do visível foram utilizados para avaliar a coloração dos extratos, a fim de complementar sua caracterização e agrupamento. No total, foram analisadas 54 amostras de própolis extraídas com etanol 70%, com aquisição dos dados nos modos positivo e negativo de ionização. O processamento inicial dos dados foi realizado no software Compound Discoverer 3.3, para detecção de compostos, agrupamento, alinhamento de tempos de retenção, remoção de sinais de *background* e anotações. Em seguida, os dados foram exportados, filtrados e organizados em uma matriz de intensidades relativas, submetida ao ambiente MetaboAnalyst 5.0. Os dados foram submetidos a análises estatísticas uni e multivariadas para avaliar padrões de agrupamento, revelando que a subdivisão geográfica em Alto e Baixo Jequitinhonha não foi suficiente para explicar a diversidade observada. Classificações complementares por microrregiões (Diamantina, Capelinha, Araçuaí e Almenara) proporcionaram melhor discriminação, mas apenas as amostras de Felício dos Santos e Diamantina apresentaram agrupamento específico. A classificação exploratória baseada na coloração dos extratos etanólicos e nos espectros de absorção molecular no visível (400–800 nm) mostrou-se mais eficaz para discriminar perfis químicos, revelando bandas características de própolis verde (630–750 nm) e vermelho (450–600 nm) em amostras de diferentes localidades da região em estudo. Foram detectados marcadores clássicos como vestitol, neovestitol e formononetina (própolis vermelho), Artepillin C, ácidos cafeoilquínicos e aromadendrina (própolis verde), além de outros metabólitos como galangina, rutina, quercetina, crisina, medicarpina, calicosina e isoliquiritigenina, com padrões de distribuição distintos entre os grupos. Parte dos compostos detectados pertence às classes de flavonoides, ácidos fenólicos, terpenos, alcaloides e derivados lipídicos, muitos associados à flora do Cerrado, predominante na região estudada. Algumas amostras apresentaram perfis atípicos em relação ao esperado pela coloração, sugerindo influência de múltiplas fontes vegetais, coleta mista de resinas ou variação na flora local. Os resultados indicam que fatores botânicos locais, mais do que a localização geográfica, determinam o perfil químico do própolis do Vale do Jequitinhonha. Além de contribuir para a caracterização química de um tipo de própolis ainda pouco estudado, este trabalho destaca a importância de avaliações biológicas complementares, comparações com outros tipos de própolis brasileiros e investigação dos metabólitos da vegetação regional para ampliar o conhecimento e valorizar o própolis produzido na região.

Palavras-chave: produtos apícolas; LC-MS; perfil químico; espectrofotometria de absorção molecular na região do visível; origem botânica.

ABSTRACT

Propolis is a complex bee product whose chemical composition varies according to the botanical and environmental diversity of its region of origin. This study aimed to investigate the chemical profile of propolis samples collected from different localities in the Vale do Jequitinhonha region, Minas Gerais, Brazil. A metabolomics approach based on liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS), complemented by visible molecular absorption spectrophotometry, was used to explore variations related to geographic origin and possible influences of local flora. A total of 54 propolis samples extracted with 70% ethanol were analyzed, with data acquired in both positive and negative ionization modes. Initial data processing was performed using Compound Discoverer 3.3 for compound detection, grouping, retention time alignment, background removal, and annotation. The data were then exported, filtered, and organized into a matrix of relative intensities for analysis in MetaboAnalyst 5.0. Exploratory and comparative analyses showed that the geographic subdivision into Alto and Baixo Jequitinhonha was not sufficient to explain the observed diversity. Complementary classification by microrregions (Diamantina, Capelinha, Araçuaí, and Almenara) provided better discrimination, but only samples from Felício dos Santos and Diamantina showed specific grouping. Exploratory classification based on extract color and visible absorption spectra (400–800 nm) was more effective in discriminating chemical profiles, revealing characteristic bands of green propolis (630–750 nm) and red propolis (450–600 nm) in samples from different areas of the valley. Classical markers such as vestitol, neovestitol, and formononetin (red propolis), as well as Artepillin C, caffeoylquinic acids, and aromadendrin (green propolis), were detected, along with other metabolites such as galangin, rutin, quercetin, chrysin, medicarpin, calycosin, and isoliquiritigenin, with distinct distribution patterns among groups. Some detected compounds belonged to classes such as flavonoids, phenolic acids, terpenes, alkaloids, and lipid derivatives, many of which are associated with the flora of the Cerrado, predominant in the studied region. Some samples showed atypical profiles compared to what would be expected based on their color, suggesting the influence of multiple botanical sources, mixed resin collection, or variation in local flora. The results indicate that local botanical factors, more than geographic location itself, determine the chemical profile of propolis from Vale do Jequitinhonha. In addition to contributing to the chemical characterization of a scarcely studied type of propolis, this work highlights methodological challenges of applying conventional untargeted metabolomics workflows. The study emphasizes the importance of complementary biological evaluations, comparisons with other Brazilian propolis types, and investigation of metabolites from local flora to expand knowledge and add value to the propolis produced in the region.

Key-words: bee products; LC-MS; chemical profiling; visible molecular absorption spectrophotometry; botanical origin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplos de amostras de própolis bruto incluídas no presente estudo antes do processamento: AP47, de tonalidade amarelada, e AP53, de tonalidade avermelhada.	22
Figura 2: Exemplos de amostras de própolis em fase de extração etanólica (70%), coletadas em diferentes municípios do Vale do Jequitinhonha, destacando a variação de coloração dos extratos, que reflete diferenças de composição química	24
Figura 3: Mapa do estado de Minas Gerais, com destaque para microrregião do Vale do Jequitinhonha, indicando a localização regional dos pontos de coleta das amostras de própolis analisadas neste estudo.	28
Figura 4: Representação esquemática do fluxo de trabalho da abordagem de metabolômica global baseada em LC-MS.	33
Figura 5: Cromatograma de Íon Extraído (EIC) sobreposto das amostras de QC para o íon F-Phe (m/z 182.0623) no modo de ionização negativo.....	54
Figura 6: Gráficos de controle para as áreas de pico do padrão interno F-Phe nos modos negativo (A) e positivo (B) nas amostras de QC.....	56
Figura 7: Gráficos de controle para as áreas de pico da quercetina (A), ácido p-cumárico (B) e ácido cafeico (C) nas amostras de QC.	57
Figura 8: Gráfico de escores da PCA para os QCs nos modos de ionização negativo (A) e positivo (B).	58
Figura 9: Cromatogramas de íons totais (TIC) sobrepostos obtidos nos modos negativo (A) e positivo (B) de ionização para as amostras de própolis do Vale do Jequitinhonha.	59
Figura 10: Gráfico de escores da PCA (PC1 vs PC2) das amostras agrupadas em Alto e Baixo Jequitinhonha, modos negativo (A) e positivo (B). As elipses vermelhas foram traçadas manualmente para destacar o agrupamento das amostras de Diamantina.	60
Figura 11: Gráfico de escores da PCA (PC1 vs PC3) das amostras agrupadas em Alto e Baixo Jequitinhonha, modos negativo (A) e positivo (B).....	61
Figura 12: <i>Heatmap</i> das amostras classificadas por Alto e Baixo Jequitinhonha no modo negativo de ionização.	62

Figura 13: <i>Heatmap</i> das amostras classificadas por Alto e Baixo Jequitinhonha no modo positivo de ionização.	63
Figura 14: Gráfico de escores da PCA relacionando PC1 vs PC2 para os dados adquiridos no modo negativo (A) e positivo (B) de ionização, na comparação entre as microrregiões de Almenara, Araçuaí, Capelinha e Diamantina. Variância explicada: (A) PC1 = 26,7%, PC2 = 17,2%. (B) PC1 = 20,8%, PC2 = 20,2%.	64
Figura 15: Gráfico de escores da PCA relacionando PC1 vs PC3 para os dados adquiridos no modo negativo (A) e positivo (B) de ionização, na comparação entre as microrregiões de Almenara, Araçuaí, Capelinha e Diamantina. Variância explicada: (A) PC1 = 26,7%, PC3 = 6,6%. (B) PC1 = 20,8%, PC3 = 8,9%.	65
Figura 16: <i>Heatmap</i> das amostras classificadas por microrregião (Almenara, Araçuaí, Capelinha e Diamantina) no modo negativo de ionização.	66
Figura 17: <i>Heatmap</i> das amostras classificadas por microrregião (Almenara, Araçuaí, Capelinha e Diamantina) no modo positivo de ionização.	67
Figura 18: Espectros de absorção molecular na região do visível (400–800 nm) das amostras de própolis analisadas. As amostras AP21 e AP53, apresentadas com absorbâncias mais intensas, foram diluídas e corrigidas pelo fator de diluição.	70
Figura 19: Espectros selecionados de amostras de própolis verde (A) e vermelho (B), obtidos por espectrofotometria de absorção molecular na região do visível.	71
Figura 20: Áreas dos picos de Drupanina (A), Artepillin C (B) e Ácido <i>p</i> -cumárico (C) obtidas no modo de ionização negativo para todas as amostras de própolis, separadas entre verde, vermelho e outras...	75
Figura 21: Espectro de fragmentação do íon de <i>m/z</i> 299.0900, atribuído ao Artepillin C, obtido em modo negativo para a amostra AP45.	76
Figura 22: Áreas dos picos de rutina (A), galangina (B) e quercetina (C) obtidas no modo de ionização negativo para todas as amostras de própolis, separadas entre verde, vermelho e outras.	78
Figura 23: Área do pico de ácido cinâmico obtida no modo de ionização negativo para todas as amostras de própolis, separadas entre verde, vermelho e outras.	79
Figura 24: Área do pico de calicosina obtida no modo de ionização negativo para todas as amostras de própolis, separadas entre verde, vermelho e outras.	79

Figura 25: Áreas dos picos de liquiritigenina (A) e isoliquiritigenina (B) obtidas no modo de ionização negativo para todas as amostras de própolis, separadas entre verde, vermelho e outras. Anotação putativa baseada na literatura.	80
Figura 26: Áreas dos picos de vestitol (A) e neovestitol (B) obtidas no modo de ionização negativo para todas as amostras de própolis, separadas entre verde, vermelho e outras. Anotação putativa baseada na literatura.	81
Figura 27: Área do pico de crisina obtida no modo de ionização negativo para todas as amostras de própolis, separadas entre verde, vermelho e outras.	82
Figura 28: Área do pico de medicarpina obtida no modo de ionização negativo para todas as amostras de própolis, separadas entre verde, vermelho e outras.	82
Figura 29: Gráfico de barras das somas das áreas relativas dos compostos selecionados nas amostras de própolis AP35, AP16, AP48, AP21 e AP53, e imagens dos respectivos extratos etanólicos.	83
Figura 30: Gráfico de escores da PCA relacionando PC1 vs PC2 (A) e PC1 vs PC3 (B) para os dados adquiridos no modo negativo de ionização. Variância explicada: PC1 = 26,7%, PC2 = 17,2%, PC3 = 6,6%.	85
Figura 31: <i>Heatmap</i> do agrupamento considerando amostras verde, vermelho e outras (A) e somente verde e vermelho (B) para os dados do modo negativo de ionização.	86
Figura 32: Gráfico de escores da PCA relacionando PC1 vs PC2 (A) e PC1 vs PC3 (B) para os dados do modo positivo de ionização. Variância explicada: PC1 = 20.8%, PC2 = 20.2%, PC3 = 8.9%. Amostras de própolis classificadas como verde, vermelho e outras.	87
Figura 33: <i>Heatmap</i> do agrupamento considerando amostras verde, vermelho e outras para os dados do modo positivo de ionização.	88
Figura 34: <i>Heatmap</i> do agrupamento considerando apenas amostras verde e vermelho para os dados do modo positivo de ionização.	89
Figura 35: <i>Volcano plot</i> obtido para os dados no modo de ionização negativo. Comparação entre amostras classificadas como verde e vermelho.	90
Figura 36: <i>Volcano plot</i> obtido para os dados no modo de ionização positivo. Comparação entre amostras classificadas como verde e vermelho.	91
Figura A1: Ácido cafeico. (A) Espectro de fragmentação em modo negativo do íon de m/z 179,0349 da	

amostra AP54; (B) distribuição isotópica do íon observado em AP54; (C) espectro de fragmentação correspondente reportado na literatura; (D) área do pico nas amostras analisadas. 104

Figura A2: Ácido p-cumárico. (A) Espectro de fragmentação em modo negativo do íon de m/z 163,0399 da amostra AP54; (B) *boxplot* das áreas do pico entre as amostras de própolis verde, vermelho e outras (em azul); (C) espelho comparando a fragmentação experimental com o espectro de 4-coumaric acid disponível no MzCloud. 105

Figura A3: Ácido 3,5-dicafeoilquínico. (A) Full scan da amostra AP54 em modo negativo; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 515,11957; (C) espectro de fragmentação do íon de m/z 515,1195 na amostra AP54; (D) *boxplot* das áreas do pico nas diferentes classes de própolis; (E) espectro de fragmentação do ácido 3,5-dicafeoilquínico reportado na literatura. 106

Figura A4: Rutina. (A) Full scan da amostra AP10, destacando o íon de m/z 609,14691; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 609,14691; (C) espelho comparando a fragmentação experimental com o espectro de rutina do MzCloud; (D) *boxplot* das áreas do pico nas diferentes classes de própolis. 107

Figura A5: Ácido 4,5-dicafeoilquínico. (A) Full scan da amostra AP54, destacando o íon de m/z 515,11951; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 515,11951; (C) espelho comparando a fragmentação experimental com o espectro de fragmentação do ácido 4,5-dicafeoilquínico disponível no MzCloud; (D) *boxplot* das áreas do pico nas diferentes classes de própolis; (E) área do pico atribuída ao ácido 4,5-dicafeoilquínico em todas as amostras analisadas. 108

Figura A6: Ácido cinâmico. (A) Full scan da amostra AP21, destacando o íon de m/z 147,04501; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 147,04501; (C) espelho comparando a fragmentação experimental com o espectro de ácido cinâmico disponível no MzCloud; (D) *boxplot* das áreas do pico nas diferentes classes de própolis. 109

Figura A7: Quercetina. (A) Full scan destacando o íon de m/z 301,03571; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 301,03571; (C) espelho comparando a fragmentação experimental com o espectro de quercetina do MzCloud; (D) *boxplot* das áreas do pico nas diferentes classes de própolis. 110

Figura A8: Aromadendrina. (A) Espectro de fragmentação do íon de m/z 287,0563 na amostra AP59; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 287,0563; (C) comparação com a fragmentação *in silico* do íon de m/z 287,0563; (D) *boxplot* das áreas do pico nas diferentes classes de própolis; (E) área do pico atribuída à aromadendrina em todas as amostras analisadas. 111

Figura A9: Drupanina. (A) Full scan da amostra AP54, destacando o íon de m/z 231,10249; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 231,10249; (C) espectro de fragmentação do íon de m/z 231,10249

na amostra AP54; (D) boxplot das áreas do pico nas diferentes classes de própolis; (E) espectro de fragmentação da drupanina reportado na literatura. 112

Figura A10: Crisina. (A) *Full scan* da amostra AP22, destacando o íon de m/z 253,05061; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 253,05061; (C) espelho comparando a fragmentação experimental com o espectro de crisina disponível no MzCloud; (D) boxplot das áreas do pico nas diferentes classes de própolis. 113

Figura A11: Galangina. (A) Espectro de fragmentação do íon de m/z 269,0456 na amostra AP05; (B) *full scan* da amostra AP11; (C) espectro de fragmentação *in silico* da galangina no modo de ionização negativo; (D) boxplot das áreas do pico nas diferentes classes de própolis. 114

Figura A12: Liquiritigenina. (A) *Full scan* da amostra AP22, destacando o íon de m/z 255,06631; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 255,06631; (C) espectro de fragmentação do íon de m/z 255,0663. 115

Figura A13: Calicosina. (A) *Full scan* da amostra AP22, destacando o íon de m/z 283,06122; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 283,06122; (C) espectro de fragmentação do íon de m/z 283,0612. 116

Figura A14: Isoliquiritigenina. (A) *Full scan* da amostra AP22, destacando o íon de m/z 255,06638; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 255,06638; (C) espectro de fragmentação do íon de m/z 255,0664. 117

Figura A15: Formononetina. (A) *Full scan* da amostra, destacando o íon de m/z 267,06628; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 267,06628; (C) espelho comparando a fragmentação experimental com o espectro de formononetina disponível no MzCloud. 118

Figura A16: Vestitol. (A) *Full scan* da amostra, destacando o íon de m/z 271,09766; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 271,09766; (C) espectro de fragmentação do íon de m/z 271,0978. 119

Figura A17: Neovestitol. (A) *Full scan* da amostra, destacando o íon de m/z 271,09778; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 271,09778; (C) espectro de fragmentação do íon de m/z 271,0977. 120

Figura A18: Medicarpina. (A) *Full scan* da amostra, destacando o íon de m/z 269,08182; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 269,08182; (C) espectro de fragmentação do íon de m/z 269,0815. 121

Figura A19: Biochanina A. (A) *Full scan* da amostra, destacando o íon de m/z 283,06116; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 283,06116; (C) espectro de fragmentação do íon de m/z 283,0975. 122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais ferramentas computacionais utilizadas para anotação em estudos de metabolômica, com destaque para suas principais funções e características.....	44
Tabela 2: Gradiente utilizado na separação cromatográfica.....	50
Tabela 3: Compostos selecionados como marcadores de própolis verde e vermelho, conforme detectados pelo Skyline. (N/D: não definido).....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPIVAJE – Associação dos Apicultores do Vale do Jequitinhonha

ANOVA – *Analysis of Variance* (Análise de Variância)

APCI – *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (Ionização Química em Pressão Atmosférica)

AU – *Absorbance Units* (Unidades de Absorbância)

CAV – Centro de Agricultura Alternativa Vicente Nica

CEU Mass Mediator – *Central European University Mass Mediator*

COCONUT – *COLlection of Open Natural prodUcTs*

COOAPIVAJE – Cooperativa dos Apicultores do Vale do Jequitinhonha

DDA-FS – *Data-dependent acquisition full scan*

EIC – *Extracted ion chromatogram* (Cromatograma de Íon Extraído)

ESI – *Electrospray Ionization* (Ionização por Eletrospray)

FWHM – *Full Width at Half Maximum* (Largura Total à Meia Altura)

GC – *Gas Chromatography* (Cromatografia Gasosa)

GNPS – *Global Natural Products Social Molecular Networking*

HCA – *Hierarchical Cluster Analysis* (Análise de Agrupamento Hierárquico)

HILIC – *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*

IG – Indicação Geográfica

IQR – *Interquartile Range* (Intervalo interquartil)

LC-MS – *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry* (Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas)

MAPA – Ministério da Agricultura e Pecuária

m/z – Razão massa/carga (*mass-to-charge ratio*)

MRM – *Multiple Reaction Monitoring* (Monitoramento de Reações Múltiplas)

MS – *Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas)

MSI – *Metabolomics Standards Initiative*

MS/MS – Espectrometria de Massas com Dupla Etapa de Análise (*Tandem MS*)

NCE – *Normalized Collision Energy* (Energia de colisão normalizada)

OD – *Optical Density* (Densidade óptica)

PES – Polietersulfona

PCA – *Principal Component Analysis* (Análise de Componentes Principais)

PLS-DA – *Partial Least Squares Discriminant Analysis*

PS-MS – *Paper Spray Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas com Ionização por *Paper Spray*)

QC – *Quality Control* (Controle de Qualidade)

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RP – *Reverse Phase* (Fase Reversa)

RSD – *Relative Standard Deviation* (Desvio Padrão Relativo)

SD – *Standard Deviation* (Desvio Padrão)

TOF – *Time of Flight* (Tempo de Voo)

UHPLC – *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Própolis	21
1.1.1 Extrato de própolis: preparo, regulamentação e usos	22
1.1.2 Aspectos químicos e biológicos do própolis	24
1.2 Vale do Jequitinhonha	27
1.3 Metabolômica	30
1.3.1 Metabolômica Global	32
1.3.2 Delineamento Experimental	34
1.3.3 Coleta e preparo de amostras	34
1.3.4 Aquisição dos dados	35
1.3.5 Tratamento dos dados	37
1.4 Análise Estatística	38
1.4.1 Análise Univariada	39
1.4.2 Análise Multivariada	40
1.5 Anotação de Compostos	41
1.6 Interpretação Biológica	45
1.7 Caracterização do Própolis por Espectrofotometria de Absorção Molecular	45
2. OBJETIVOS	47
2.1 Objetivo geral:	47
2.2 Objetivos específicos:	47
3. METODOLOGIA	48
3.1 Reagentes e soluções	48
3.2 Amostras	48
3.3 Preparo das amostras	48
3.4 Análise das amostras por UHPLC-MS	49
3.5 Tratamento dos dados	51
3.6 Análise estatística e interpretação biológica	51

3.7	Análise das amostras por espectrofotometria de absorção molecular na região do visível.....	52
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.1	Avaliação da Estabilidade Analítica e Controle de Qualidade.....	54
4.2	Análise Estatística do Perfil Químico por LC-MS.....	59
4.2.1	Comparação do perfil metabólico entre Alto e Baixo Jequitinhonha.....	60
4.2.2	Comparação do perfil metabólico por Microrregiões	64
4.3	Avaliação da coloração	68
4.4	Comparação do perfil metabólico por coloração	84
5.	CONCLUSÕES.....	92
	REFERÊNCIAS	94
	APÊNDICE A	104

1. INTRODUÇÃO

1.1 Própolis

O própolis é uma resina natural produzida por abelhas a partir de fragmentos vegetais como brotos, cascas e outras partes de plantas, sendo enriquecida com enzimas salivares, ceras e mel.^{1,2} Dentro da colmeia, as abelhas o utilizam para proteger e selar frestas, garantindo estabilidade térmica e mantendo o ambiente asséptico.³ Além de seu papel ecológico, o própolis é amplamente utilizado na medicina popular devido a uma série de propriedades biológicas atribuídas a ele, como ações antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e antitumoral.⁴ Essas propriedades são explicadas, em grande parte, pela rica concentração de metabólitos derivados de plantas, como flavonoides, ácidos fenólicos e terpenos. Como resultado, o própolis apresenta uma grande complexidade química, e as variações nas suas propriedades biológicas estão diretamente relacionadas à composição, que é influenciada por diversos fatores ambientais e botânicos.

A composição química do própolis é complexa e variável, influenciada por fatores como a flora local, a espécie de abelha produtora, as condições ambientais e a região geográfica.⁵ Por isso, ele é classificado em diferentes tipos, sendo os própolis verde, vermelho e marrom os mais comuns no Brasil.⁶ Esses nomes são atribuídos principalmente em função da coloração típica observada tanto no própolis bruto quanto nos extratos obtidos por métodos como a extração etanólica, e refletem, de forma indireta, os constituintes químicos presentes em cada tipo.

O própolis verde, por exemplo, é originado da planta Alecrim do Campo (*Baccharis dracunculifolia*), apresenta coloração amarelada ou esverdeada e é conhecido pela presença do Artepillin C, um composto fenólico com propriedades antitumorais.^{7,8} O própolis vermelho é derivado das plantas Rabo-de-Bugio (*Dalbergia ecastaphyllum*) e Anani (conhecida também como guanandi ou bulandi, com nome científico *Symphonia globulifera*) e apresenta coloração avermelhada por causa da presença de pigmentos como as retusapurpurinas, derivadas da classe dos isoflavonoides.⁹⁻¹¹ O própolis verde é encontrado majoritariamente na região sudeste do Brasil, enquanto o vermelho é encontrado nas regiões norte e nordeste.

Já o própolis marrom possui origem botânica mais diversificada e apresenta variações em coloração que vão do marrom claro ao escuro, podendo ser associado a múltiplas fontes

vegetais. Além desses, há os tipos menos explorados, como o própolis amarelo, azul e o geoprópolis, cujas características químicas e propriedades biológicas são diversificadas.^{4,12}

1.1.1 Extrato de própolis: preparo, regulamentação e usos

Na linguagem popular, a menção ao consumo de própolis geralmente faz referência ao extrato alcoólico, que é a forma mais utilizada e conhecida no Brasil. O uso do própolis em sua forma bruta é pouco frequente e, em muitos casos, a população sequer reconhece sua aparência natural, que pode ser observada na Figura 1, que ilustra a resina antes do processamento. Tradicionalmente, o extrato é preparado de forma artesanal por apicultores, utilizando fragmentos de própolis bruto macerados em álcool de cereais.¹³ Uma receita bastante difundida, ensinada de forma didática pela professora Dra. Etelvina Conceição Almeida da Silva, do Instituto Abelha Nativa, recomenda utilizar cerca de 300 gramas de própolis para 700 mL de álcool a 70%. Caso o álcool disponível tenha graduação mais alta, ajusta-se o volume com água fervida até atingir a concentração ideal para uma extração eficiente dos compostos bioativos.¹⁴

Figura 1: Exemplos de amostras de própolis bruto incluídas no presente estudo antes do processamento: AP47, de tonalidade amarelada, e AP53, de tonalidade avermelhada.



Fonte: Foto da autora.

Do ponto de vista regulatório, o extrato de própolis é classificado no Brasil como um alimento funcional, utilizado como suplemento natural para auxiliar na promoção da saúde e na prevenção de doenças. Em outros países, como Japão e parte da Europa, o própolis é registrado e comercializado como medicamento fitoterápico, com uso documentado desde a antiguidade.

Registros históricos mostram que os egípcios empregavam o própolis em processos de embalsamamento devido às suas propriedades conservantes, enquanto a farmacopeia londrina do século XVII já o listava como medicamento oficial, especialmente por sua ação antibacteriana.¹⁵ Atualmente, além do extrato alcoólico, o própolis está disponível em diferentes formulações como cápsulas, sprays, enxaguantes bucais, pastilhas, cremes e pós para gargarejo ou ingestão.¹⁶⁻¹⁹ Apesar dessas opções, no Brasil, o extrato alcoólico permanece como a forma mais popular de consumo.

Há numerosas evidências na literatura que sustentam o uso do extrato alcoólico de própolis para diferentes finalidades terapêuticas, sobretudo devido às suas propriedades antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias e imunomoduladoras.^{1,5,15,20-23} Dentre as aplicações mais comuns, destacam-se o alívio de dores de garganta e o auxílio no tratamento de gripes e resfriados.^{24,25} O própolis também pode ser utilizado como suporte na cicatrização de feridas e da prevenção de infecções orais, como cáries dentárias.^{2,18,19,26} Revisões e estudos clínicos sugerem também efeitos positivos no combate a infecções fúngicas e na modulação do estresse oxidativo, além de investigações preliminares que indicam potencial atividade antitumoral em determinados contextos.^{27,28}

Apesar desses resultados promissores, a pesquisa sobre o própolis ainda enfrenta desafios consideráveis. A composição química do própolis varia amplamente conforme a região e a estação do ano em que é coletado, o que implica em diferenças significativas na concentração de compostos bioativos e, consequentemente, na eficácia terapêutica observada.²⁹ Essa variabilidade, somada à falta de padronização metodológica entre estudos e à ausência de informações detalhadas sobre a forma de administração do extrato em ensaios clínicos, dificulta a comparação de resultados e limita o estabelecimento de diretrizes de usos clínicos confiáveis.³⁰ Além disso, até o momento há lacunas no conhecimento sobre a biodisponibilidade dos compostos após a ingestão, ou seja, ainda não está completamente elucidado se os metabólitos presentes no extrato atingem os tecidos-alvo em concentrações eficazes após ingeridos.³¹⁻³³

Essas limitações reforçam a importância de aprofundar os estudos sobre a composição química do própolis e suas variações regionais e sazonais. A diversidade de compostos bioativos presentes também influencia diretamente a tonalidade dos extratos, cuja coloração pode variar de tons verde-amarelados a marrons e avermelhados, como ilustrado na Figura 2.

Essa característica visual reflete diretamente os constituintes químicos predominantes em cada tipo de própolis, os quais influenciam de forma significativa as propriedades biológicas atribuídas ao extrato. Assim, compreender a composição química em detalhe é essencial para explicar não apenas as variações de cor, mas também as diferentes atividades terapêuticas observadas.

Figura 2: Exemplos de amostras de própolis em fase de extração etanólica (70%), coletadas em diferentes municípios do Vale do Jequitinhonha, destacando a variação de coloração dos extratos, que reflete diferenças de composição química .



Fonte: Foto da autora.

1.1.2 Aspectos químicos e biológicos do própolis

Até o momento, mais de 300 compostos foram identificados em diferentes tipos de própolis, incluindo flavonoides, ácidos fenólicos, terpenos e compostos aromáticos, entre outros.^{34,35} Sua composição bruta é formada a partir de cerca de 50% de resinas de plantas, seguida de ceras, óleos essenciais e outros compostos orgânicos. O estudo detalhado de sua composição possui valor estratégico, pois permite agregar valor ao produto final, favorecendo a aplicação em setores como o farmacêutico, cosmético e alimentício.²²

Considerando essa diversidade química e os múltiplos usos já descritos na literatura, diversas pesquisas têm investigado o própolis sob diferentes enfoques, incluindo abordagens clínicas, analíticas e tecnológicas, com o objetivo de explorar de forma mais aprofundada suas potenciais atividades biológicas. Entre essas atividades, destaca-se, por exemplo, a ação antimicrobiana de amplo espectro, particularmente eficaz na prevenção e no tratamento de infecções do trato respiratório.²⁵ Essa propriedade está relacionada à presença de compostos naturais que não apenas inibem microrganismos patogênicos, mas também podem atuar de forma sinérgica com antibióticos convencionais, contribuindo para combater bactérias multirresistentes. Além disso, combinações de própolis com substâncias como o mel têm mostrado efeitos reforçados contra cepas bacterianas como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.³⁵

No caso do própolis verde brasileiro, análises químicas apontam que o extrato etanólico apresenta atividades antimicrobiana e antioxidante superiores quando comparado a outros tipos de extratos. Esse efeito tem sido atribuído, principalmente, à presença do Artepillin C em combinação com outros compostos fenólicos. Esse composto é considerado um dos principais marcadores químicos do própolis verde e tem mostrado resultados expressivos frente a cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*, incluindo variantes resistentes à metilicina, além de potencial antioxidante significativo.⁷

Além das aplicações mais comuns, como o uso no tratamento de infecções respiratórias, dores de garganta e suporte imunológico, o própolis também tem sido estudado por suas propriedades antioxidantes, cicatrizantes e potenciais efeitos antitumorais. Esses efeitos são atribuídos à complexa combinação de compostos bioativos, como flavonoides, ácidos fenólicos e terpenos, que atuam em múltiplos alvos biológicos, modulando processos inflamatórios e combatendo o estresse oxidativo.^{3,17,36}

No campo da pesquisa antifúngica, estudos indicam que o própolis apresenta potencial para inibir o crescimento de microrganismos associados a infecções de pele e doenças dermatológicas, como leveduras do gênero *Candida* e outros fungos oportunistas.³⁷ Essa ação reforça seu uso em formulações tópicas para auxiliar no tratamento de micoses, dermatites e feridas contaminadas. Além disso, o potencial cicatrizante do própolis vem sendo explorado em géis e pomadas, com resultados promissores na aceleração da regeneração da pele, no controle da inflamação e na redução da dor em lesões como queimaduras.¹⁶ Ensaios laboratoriais ainda

sugerem que o extrato pode induzir apoptose em células fúngicas, limitando sua proliferação em tecidos cutâneos infectados.³⁶

Na odontologia, o própolis tem se mostrado um recurso natural eficaz para auxiliar na prevenção e no controle de doenças bucais, atuando na redução de placa bacteriana, na melhora de inflamações gengivais e no manejo de lesões orais, como a mucosite em pacientes submetidos a quimioterapia e radioterapia. Essa ação terapêutica está relacionada à presença de compostos fenólicos e flavonoides identificados em diferentes estudos. Por exemplo, Halboub e colaboradores destacaram a galangina e a pinocembrina como principais responsáveis pela atividade antimicrobiana do própolis sobre patógenos orais;¹⁹ Chen-Chen Kuo e colaboradores relataram a ação moduladora de compostos fenólicos como o cafeato de fenetila na inflamação e cicatrização da mucosa;²⁶ e o estudo reportado por Stähli e colaboradores apontou a contribuição do Artepelin C para a inibição de bactérias e biofilmes dentários.³⁸ Esses compostos atuam de forma sinérgica, inibindo o crescimento microbiano, modulando a resposta inflamatória e favorecendo a regeneração de tecidos lesionados, o que reforça o potencial do própolis como adjuvante seguro na prática odontológica.

Em relação à atividade antiviral, Simoni e colaboradores avaliaram a ação *in vitro* de extratos de própolis verde, vermelho e de espécies de *Baccharis* contra vírus da herpes bovino, equino e suíno, observando atividade notável do própolis vermelho contra todos os vírus testados, enquanto o própolis verde foi eficaz contra os vírus da herpes equino e suíno. Esses resultados reforçam o potencial do própolis e de suas plantas fonte como agentes antivirais naturais promissores, ainda que sejam necessários estudos clínicos mais robustos para sua aplicação prática.³⁹

Em relação à composição química e atividade biológica dos própolis quando classificados por cores, estudos conduzidos por Bertolucci e colaboradores ressaltam que os própolis vermelhos contêm compostos bioativos com efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e osteoprotetores, com potencial aplicação na modulação da homeostase óssea. Por meio de análises químicas detalhadas desse tipo de própolis incluindo técnicas como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), foram identificados marcadores como vestitol e neovestitol, associados a propriedades que combatem distúrbios inflamatórios e degenerativos.⁴⁰ Além disso, abordagens *in silico* e *in vitro* têm ampliado o entendimento sobre

o potencial terapêutico do própolis vermelho, incluindo sua atividade leishmanicida, observada em amostras da região amazônica.⁴¹

Estudos comparativos, como o de Machado e colaboradores, destacam que própolis de diferentes cores (verde, vermelho, marrom e amarelo) apresentam perfis químicos distintos, com variações significativas quanto à presença de compostos fenólicos, terpenos e ácidos aromáticos. Esses fatores resultam em diferenças de eficácia antimicrobiana, atividade citotóxica e potencial terapêutico. O própolis verde e o vermelho, por exemplo, concentram a maior parte das evidências científicas, enquanto tipos como o amarelo ainda carecem de investigações aprofundadas para determinar suas aplicações mais adequadas.¹²

Apesar dos avanços, a literatura mostra que estabelecer um padrão de qualidade uniforme para o própolis ainda é um desafio, principalmente devido às variações regionais, botânicas e sazonais que afetam diretamente a concentração de compostos bioativos.² Essa realidade se reflete, por exemplo, no caso do própolis do Vale do Jequitinhonha, uma região de alta biodiversidade e tradição apícola, mas ainda pouco explorada cientificamente. Até o momento, apenas um estudo experimental, apresentado em congresso, abordou a atividade antibacteriana do extrato etanólico de própolis dessa região e seu efeito sinérgico com penicilina contra *Staphylococcus aureus*, mostrando resultados promissores como potencial adjuvante terapêutico.⁴²

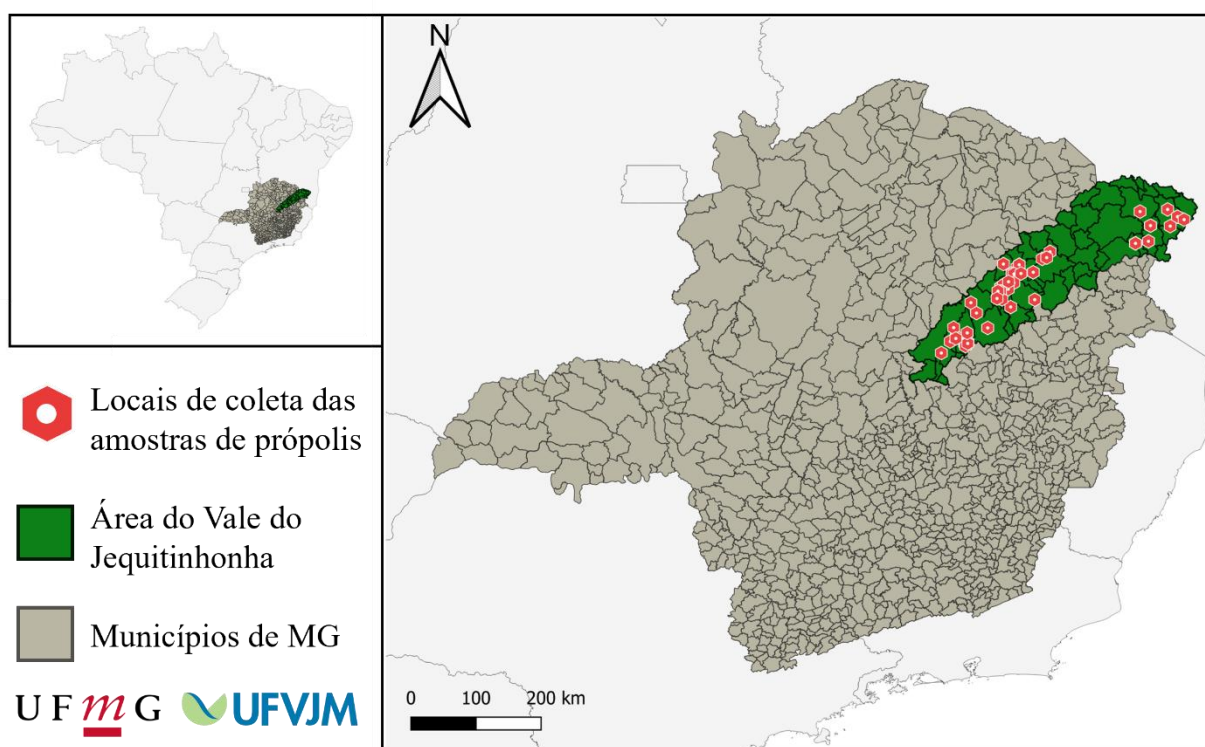
Assim, compreender a composição química do própolis em diferentes territórios é fundamental para validar suas aplicações e agregar valor à cadeia produtiva regional, que é extensamente baseada na agricultura familiar. No contexto do Vale do Jequitinhonha, esse conhecimento pode revelar perfis químicos únicos e ampliar as oportunidades de uso do própolis como recurso natural com relevância biotecnológica, econômica e social.

1.2 Vale do Jequitinhonha

O Vale do Jequitinhonha, situado no nordeste do estado de Minas Gerais (Figura 3), é uma das regiões mais extensas e singulares do território mineiro devido à sua diversidade cultural, ambiental e socioeconômica, ocupando aproximadamente 14,5% da área estadual e abrangendo cerca de 80 municípios. A região é tradicionalmente dividida em três grandes sub-

regiões: Alto, Médio e Baixo Jequitinhonha. Essa divisão considera principalmente a bacia hidrográfica do rio Jequitinhonha.^{43,44}

Figura 3: Mapa do estado de Minas Gerais, com destaque para microrregião do Vale do Jequitinhonha, indicando a localização regional dos pontos de coleta das amostras de própolis analisadas neste estudo.



Fonte: Elaborado pela autora utilizando o software QGIS.

Historicamente, o povoamento do Vale do Jequitinhonha se iniciou no século XVIII com a mineração de ouro e diamantes, especialmente no entorno do antigo arraial do Tijuco (atual Diamantina). A mineração impulsionou a urbanização inicial, mas foi seguida por instabilidades econômicas e isolamento social, levando a região a ser estigmatizada como “Vale da Miséria”.⁴⁵ Ainda assim, o século XX foi marcado pelo surgimento de novas formas de organização social e pela resiliência da agricultura familiar, impulsionada por movimentos sociais, sindicatos e organizações não governamentais como o Centro de Agricultura Alternativa Vicente Nica (CAV), que teve papel central na construção de alternativas produtivas e sustentáveis como a apicultura.^{46,47}

Apesar das adversidades, o Vale do Jequitinhonha abriga uma forte história, cultura e influência dentro de Minas Gerais, com destaque para a cerâmica, as festas religiosas e a música popular, que compõem um rico patrimônio.⁴⁸

No plano ambiental, a região se caracteriza por sua complexidade ecológica, resultado da sobreposição de diferentes biomas como a Mata Atlântica, o Cerrado e a Caatinga. Essa mistura se manifesta na presença de diversos tipos de vegetação, como os campos rupestres, florestas, matas de galeria, áreas de cerrado e formações de caatinga.^{49,50} A presença de solos calcíferos, clima árido e sazonalidade das chuvas, influenciam diretamente a vegetação e tornam o Vale do Jequitinhonha especialmente favorável à atividade apícola.^{47,51}

Em relação à sua vegetação, destacam-se as espécies nativas com potencial medicinal, alimentício e apícola, como a aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), cuja florada contribui para a produção de um mel monofloral com coloração escura, alto teor de compostos fenólicos e reconhecidas propriedades antimicrobianas e cicatrizantes.^{52,53} Estudos fitoquímicos com espécies do Cerrado no Alto Jequitinhonha também demonstram a presença de metabólitos com relevância biológica, como taninos, flavonoides, saponinas e alcaloides, o que sugere um potencial ainda inexplorado para a produção de própolis regionais diferenciados.⁵⁰

Embora a atividade apícola já represente uma alternativa relevante de renda para diversas famílias do Alto e Médio Jequitinhonha, estudos indicam que sua consolidação depende da superação de diversos desafios, como a ampliação da infraestrutura, a certificação sanitária e o acesso a mercados valorizados.⁵⁴ O avanço em direção à certificação por Indicação Geográfica (IG) do mel Jequitinhonha tem sido apontado como uma estratégia promissora para agregar valor ao produto e reconhecer a relação entre qualidade, origem e as habilidades próprias das comunidades produtoras.^{51,55}

Nas últimas décadas, a apicultura passou por um processo de transição social e técnica no Vale do Jequitinhonha, especialmente a partir do fortalecimento de redes comunitárias e da atuação de organizações como o CAV e da criação da Associação dos Apicultores do Vale do Jequitinhonha (AAPIVAJE) e da Cooperativa dos Apicultores do Vale do Jequitinhonha (COOAPIVAJE). Fundada em 2010, a COOAPIVAJE é uma entidade sem fins lucrativos que tem desempenhado papel essencial na estruturação da cadeia produtiva do mel regional, promovendo ações de capacitação técnica, acesso a mercados e beneficiamento do mel com certificação sanitária e rastreabilidade.^{56,57}

Diversos estudos vêm sendo conduzidos sobre o mel da região, com foco em suas características físico-químicas, sensoriais e botânicas, revelando um perfil diferenciado atribuído à flora local e às condições ecológicas do território.⁵² Além do mel de aroeira, também há produção de méis silvestres e multiflorais com atributos específicos de textura, coloração e aroma.

Apesar do avanço nos estudos sobre o mel, ainda são escassas as pesquisas sobre outros produtos apícolas da região, em especial o própolis. Este, por sua própria complexidade química e variação botânica, apresenta um vasto potencial biológico e comercial que permanece pouco explorado no contexto do Vale do Jequitinhonha.

1.3 Metabolômica

Metabolômica é o estudo abrangente dos metabólitos (i.e., de pequenas moléculas, com massa molecular de até 1500 Da, presentes em sistemas biológicos), com o objetivo de facilitar a compreensão de processos bioquímicos e fisiológicos ou descobrir biomarcadores de determinados estados ou condições biológicas.⁵⁸ Esse tipo de estudo pode ser aplicado a diferentes tipos de amostras de origem biológica, como biofluidos, tecidos, células, microorganismos, partes de plantas ou alimentos, entre outros. Os metabólitos compreendem classes diversas de compostos, como ácidos graxos, lipídios, peptídeos, aminoácidos, vitaminas, flavonoides e compostos fenólicos, sendo produzidos em resposta a estímulos biológicos endógenos ou a fatores exógenos, como dieta, estilo de vida, tratamentos farmacológicos, exposições ambientais ou condições climáticas.⁵⁹ A metabolômica permite investigar tanto as respostas a condições específicas (por exemplo, resposta metabólica a um tratamento farmacológico ou uma alteração dietética) quanto o funcionamento basal do organismo (condições fisiológicas normais ou não perturbadas), sendo amplamente utilizada em áreas como a detecção precoce de doenças, o estudo de biomarcadores e a avaliação de interações metabólicas em plantas.

O estudo dos metabólitos em sistemas biológicos existe há várias décadas porém a consolidação do termo “metabolômica” como uma área específica do conhecimento ocorreu no início dos anos 2000. O primeiro uso formal do termo "metabolômica" foi relatado em 2001 (enquanto o termo relacionado "metabonômica" surgiu em 1999), marcando o início de uma

abordagem mais sistemática e abrangente dessa disciplina em diversas áreas do conhecimento.⁶⁰ Em 1975, Francis Crick propôs o conceito do “dogma central” da biologia molecular, segundo o qual a informação biológica flui de genes para transcritos e, então, para proteínas. No entanto, em 2005, Dr. Schreiber apontou que as pequenas moléculas representavam o elo ausente nesse modelo, exercendo papel fundamental na regulação e integração dos processos biológicos.⁶¹ A importância dessas moléculas foi reconhecida também na área médica: em 2016, foi publicado o primeiro artigo recomendando a inclusão da metabolômica nas iniciativas de medicina de precisão.⁶²

A metabolômica pode ser separada em dois tipos: abordagens direcionadas (*targeted*) ou não direcionadas (*untargeted*), dependendo dos objetivos e do escopo da investigação. Segundo Canuto e colaboradores, existem diferentes denominações utilizadas na literatura em português para essas abordagens. A metabolômica *untargeted* pode ser denominada como global, não alvo ou não direcionada, enquanto a metabolômica *targeted* pode ser referida como alvo ou direcionada. Ao longo deste estudo, optou-se pelos termos metabolômica global para a abordagem *untargeted* e metabolômica alvo para a abordagem *targeted*.⁶³

A metabolômica alvo é utilizada na caracterização e quantificação de classes ou grupos específicos e pré-definidos de metabólitos na matriz biológica em estudo, enquanto a metabolômica global busca determinar de forma mais abrangente o maior número de metabólitos possível, com o objetivo de fazer um *fingerprint* de uma determinada matriz para entender sua composição de forma mais exploratória. O fluxo de trabalho para cada uma delas é diferente, principalmente no que diz respeito ao tratamento de dados.⁵⁸

Em relação à metabolômica alvo, a abordagem utilizada é focada na quantificação absoluta de conjuntos específicos de metabólitos previamente conhecidos, frequentemente pertencentes a uma mesma via metabólica ou classe funcional, como aminoácidos, lipídios, ou intermediários do ciclo do ácido cítrico, por exemplo.⁶⁴ Essa abordagem é especialmente útil para testar hipóteses biológicas já levantadas, validar biomarcadores ou monitorar alterações metabólicas esperadas em resposta a estímulos fisiológicos, intervenções dietéticas ou doenças. Seu uso tem sido essencial em áreas como medicina de precisão, toxicologia, nutrição e pesquisa clínica, oferecendo sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade superiores em relação à metabolômica global.⁶⁵

1.3.1 Metabolômica Global

A metabolômica global é uma abordagem exploratória que visa detectar o maior número possível de metabólitos em uma amostra biológica, sem a necessidade de pré-seleção de alvos específicos. Essa estratégia tem sido muito utilizada para a investigação de fenótipos metabólicos em larga escala, com aplicações em áreas como saúde humana, ecologia, toxicologia e biotecnologia vegetal.⁶³ Por ser um método de análise abrangente, a metabolômica global exige protocolos robustos de aquisição e controle de qualidade dos dados.

O fluxo de trabalho, como documentado na Figura 4, geralmente inclui uma etapa de preparo de amostras abrangente, aquisição instrumental dos dados, processamento de dados, análise estatística uni- e multivariada, anotação dos metabólitos e interpretação biológica. A variabilidade técnica, que pode ser introduzida já nas fases iniciais, como a coleta e armazenamento das amostras, deve ser minimizada garantindo que os procedimentos sejam tão padronizados quanto possível ao longo do estudo. Além disso, outros cuidados são também recomendados para minimizar os possíveis efeitos da variabilidade técnica, como a realização das análises em ordem aleatória, o uso de amostras de controle de qualidade (QC) e a adição de padrões internos.⁶⁶

Figura 4: Representação esquemática do fluxo de trabalho da abordagem de metabolômica global baseada em LC-MS.



Fonte: Elaboração própria utilizando a plataforma BioRender.com.

1.3.2 Delineamento Experimental

O delineamento experimental é uma etapa fundamental em estudos metabolômicos, pois garante que os dados obtidos possam responder de forma adequada às perguntas propostas. Nessa fase, definem-se claramente os grupos experimentais a serem comparados, o número de amostras por grupo, os critérios de inclusão e exclusão das amostras e as condições de coleta e armazenamento. Um delineamento bem estruturado é essencial para controlar fontes de variabilidade técnica e biológica, aumentando a reprodutibilidade e a validade estatística dos resultados. Além disso, a definição prévia de controles, réplicas e amostras de QC é recomendada para monitorar o desempenho analítico ao longo de todo o experimento.

1.3.3 Coleta e preparo de amostras

A etapa de coleta, armazenamento e preparo das amostras influencia diretamente na qualidade e na representatividade dos dados obtidos, sobretudo na abordagem global, que busca detectar o maior número possível de metabólitos com mínima interferência ou perda. Na coleta, é essencial seguir protocolos padronizados para evitar contaminações e minimizar alterações metabólicas pós-coleta. A correta rotulagem, o transporte em condições controladas (quando necessário), realização de *quenching* metabólico (quando aplicável para interromper a atividade enzimática) e o armazenamento em temperatura adequada são práticas recomendadas para preservar o perfil metabólico original.^{59,67}

Após a coleta, as amostras devem ser homogeneizadas de forma eficiente, geralmente por moagem ou trituração, no caso de amostras sólidas, para garantir a uniformidade do material e maximizar o contato com os solventes de extração. A secagem por liofilização é amplamente utilizada para reduzir a atividade enzimática e preservar compostos termossensíveis, sendo preferida em relação à secagem por calor. O armazenamento posterior deve ser feito em temperaturas adequadas (muitas vezes a -80 °C), para evitar a degradação dos metabólitos, embora esse valor possa variar de acordo com o tipo de matriz biológica.^{68,69}

A etapa de extração propriamente dita deve ser cuidadosamente planejada para possibilitar a recuperação de metabólitos representativos de diferentes classes químicas, tanto quanto possível. Técnicas assistidas, como a extração por banho de ultrassom, têm sido

empregadas para aumentar a eficiência, reduzir o tempo e minimizar o consumo de solventes orgânicos.⁷⁰ O banho de ultrassom promove cavitação, que rompe estruturas de matrizes biológicas sólidas ou semi-sólidas e favorece a difusão dos metabólitos para o solvente de extração. A escolha do protocolo depende também da plataforma analítica a ser utilizada na aquisição dos dados. Para análises por LC-MS, por exemplo, é comum empregar solventes compatíveis com a ionização por *eletrospray*, como metanol, acetonitrila e água acidificada, evitando componentes que possam causar supressão da ionização ou contaminação.⁷¹

Estudos demonstram a eficácia da extração assistida por ultrassom na análise de própolis e outras matrizes sólidas. Por exemplo, Liu e colaboradores destacaram que a extração assistida por banho de ultrassom, utilizando etanol 50%, resultou em extratos de própolis com maior atividade antioxidante e antimicrobiana em comparação a métodos convencionais, como a maceração.⁷⁰ De forma semelhante, Widelski e colaboradores, ao analisarem amostras de própolis do Cazaquistão, empregaram etanol 70% em proporção 1:10 (m/v), também com extração assistida por ultrassom, obtendo perfis fitoquímicos ricos em marcadores típicos do própolis tipo álamo-preto, como pinocembrina, galangina e ésteres de ácido cafeico.⁷²

Para garantir a consistência dos resultados analíticos, recomenda-se ainda a inclusão de amostras QC, adição de padrões internos e análise aleatória das amostras ao longo da sequência instrumental. Esses procedimentos auxiliam na minimização dos efeitos da variabilidade técnica nos resultados, bem como no monitoramento do desempenho analítico e na detecção de possíveis desvios ao longo da sequência analítica. Em geral, as amostras QC (do inglês, *pooled QC samples*) são preparadas como uma mistura, que é composta por alíquotas iguais de cada uma das amostras individuais incluídas no estudo, de forma a se obter uma amostra o mais representativa possível dos metabólitos presentes nas amostras do estudo como um todo.^{73,74} Essa mistura é submetida ao mesmo preparo das demais amostras e dividida em alíquotas, que são então analisadas intermitentemente no decorrer da sequência analítica para monitorar a variabilidade de origem não biológica.

1.3.4 Aquisição dos dados

A aquisição de dados envolve a escolha das técnicas analíticas a serem utilizadas para detectar e caracterizar os metabólitos presentes na amostra. As principais técnicas empregadas

são a ressonância magnética nuclear (RMN) e métodos hifenados que combinam técnicas de separação, como cromatografia líquida, cromatografia gasosa ou eletroforese capilar, acopladas à espectrometria de massas (MS). Em conjunto com ferramentas de tratamento de dados e abordagens estatísticas uni- e multivariadas, essas técnicas permitem explorar de forma abrangente a composição química dos sistemas biológicos.⁷⁵

A RMN possibilita um estudo aprofundado da estrutura molecular dos metabólitos e apresenta como vantagens o preparo de amostras relativamente simples, a robustez operacional (sem contato direto das amostras com partes internas do equipamento que exijam limpeza frequente) e a possibilidade de realizar quantificação absoluta de compostos de forma relativamente simples. No entanto, sua principal limitação é a baixa sensibilidade em comparação à espectrometria de massas, o que dificulta a detecção de metabólitos presentes em baixas concentrações. Além disso, Coen e colaboradores destacam que, especialmente em estudos de metabolômica global, a RMN pode demandar etapas de intenso processamento de dados para matrizes complexas.⁷⁶

Por sua vez, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) é uma das principais abordagens analíticas utilizadas em estudos de metabolômica, especialmente na modalidade global. Essa técnica combina o poder de separação da cromatografia líquida com a alta sensibilidade e seletividade da espectrometria de massas, permitindo a caracterização de uma ampla gama de metabólitos presentes em matrizes biológicas complexas.

Na etapa cromatográfica, geralmente emprega-se o modo de fase reversa (RP), com colunas C18, para a retenção de compostos moderadamente polares a apolares. Para compostos mais polares, frequentemente mal retidos em RP, utiliza-se a cromatografia por interação hidrofílica (HILIC). A combinação de diferentes modos cromatográficos é desejável para ampliar a cobertura do metaboloma, uma vez que um único método de separação não é capaz de abranger a grande diversidade química das amostras analisadas.⁷⁷

A detecção por espectrometria de massas, por sua vez, se inicia com a etapa de a ionização dos compostos eluídos da coluna cromatográfica. A ionização por *eletrospray* (ESI) é a mais comumente utilizada em LC-MS, tanto em modo positivo quanto negativo, sendo possível também utilizar fontes como a ionização química em pressão atmosférica (APCI) para compostos menos polares.⁷⁸ A escolha do modo de ionização influencia diretamente no número e no tipo de metabólitos detectados.

Na metabolômica global, são comumente utilizados analisadores de baixa resolução, como triplos quadrupolos, operando em modo MRM (monitoramento de reações múltiplas) e *ion trap*, onde a detecção é feita com base em padrões analíticos previamente conhecidos. Essa abordagem oferece elevada sensibilidade e robustez, mas depende de uma lista restrita de metabólitos previamente definidos.

Já a metabolômica global exige o uso de analisadores de alta resolução, como os analisadores por tempo de voo (TOF), Orbitrap e por transformada de Fourier e ressonância ciclônica de íons (FT-ICR). Isso se deve ao fato de que, na ausência de padrões de referência, a determinação do m/z com precisão é essencial para a anotação de compostos com base em bancos de dados ou ferramentas de predição estrutural.^{64,77}

Dentre os analisadores de alta resolução, o Orbitrap se destaca pela sua sensibilidade, elevada resolução espectral (podendo ultrapassar 100.000 FWHM) e estabilidade operacional. Essas características o tornam especialmente apropriado para estudos de metabolômica global, em que a exatidão nas medidas de valores de m/z é fundamental para a identificação dos metabólitos. Além disso, o Orbitrap apresenta boa sensibilidade, compatibilidade com modos de aquisição *full MS* e MS^2 , e integração eficiente com cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC).

Estudos utilizando TOF-MS,⁷⁹ Orbitrap^{80,81} e combinações cromatográficas distintas demonstram que a LC-MS permite a distinção entre diferentes tipos de amostras naturais, como méis, extratos de própolis e resinas vegetais, com base no perfil metabólico. Essas investigações empregam quimiometria e redes metabólicas para identificar biomarcadores relacionados à origem botânica e geográfica, à atividade biológica ou à presença de contaminantes.

Ainda que a capacidade da LC-MS seja reconhecida, desafios permanecem em relação à padronização de métodos, variabilidade instrumental, interferência de matriz e dificuldades na anotação de metabólitos.

1.3.5 Tratamento dos dados

O tratamento dos dados constitui uma etapa no fluxo de trabalho da metabolômica, especialmente na abordagem global, na qual se busca detectar os sinais associados aos

metabólitos presentes na amostra e obter uma matriz de dados bidimensional contendo informações sobre suas abundâncias relativas em cada uma das amostras do estudo. Após a aquisição instrumental, os dados brutos passam por processos de detecção de picos, correção do tempo de retenção e agrupamento. Esses procedimentos são fundamentais para gerar a matriz de dados bidimensional, que é necessária para fazer a análise estatística.

Em seguida, uma série de etapas matemáticas são aplicadas para preparar o conjunto de dados para as análises posteriores, como filtragem baseada no desvio padrão relativo (RSD) das amostras de QC, imputação de valores ausentes (como a substituição do zero por 1/5 do menor valor detectado) e normalização, que pode ser realizada em relação à massa da amostra, ao total de íons detectados ou utilizando fatores internos, a depender do tipo de matriz. Por exemplo, em estudos com a matriz urina, é comum a normalização por creatinina, já em matrizes sólidas ou extratos, frequentemente utiliza-se a normalização pela massa pesada.

Antes de prosseguir para a análise estatística, métodos de transformação (por logaritmo ou raiz quadrada, por exemplo) podem ser aplicados para aproximar a distribuição dos dados da normalidade. Em seguida, o escalonamento dos dados é realizado para equalizar a influência das variáveis. Os métodos mais comuns são o autoescalamento, que consiste em subtrair a média e dividir pelo desvio padrão de cada variável, e o escalonamento de Pareto, que utiliza a raiz quadrada do desvio padrão como fator de escala.

A escolha adequada dos métodos de processamento dos dados garante maior robustez estatística e melhor interpretação dos resultados, sendo uma etapa indispensável para a qualidade final das conclusões obtidas em estudos metabolômicos.

1.4 Análise Estatística

A análise estatística é uma etapa fundamental em estudos de metabolômica global, permitindo a identificação de compostos ou grupos de compostos com variações significativas entre diferentes condições experimentais. Devido ao grande volume de dados gerados por técnicas como LC-MS e RMN, recomenda-se o uso de métodos tanto univariados quanto multivariados, para extrair informações confiáveis e biologicamente relevantes.⁸²

Ferramentas como o MetaboAnalyst oferecem um ambiente integrado para processamento de dados, normalização e execução de análises estatísticas, facilitando a geração de gráficos interpretativos e relatórios automatizados. Essas etapas são essenciais para garantir a qualidade e a confiabilidade dos resultados, maximizando a identificação correta de potenciais biomarcadores e a interpretação biológica adequada dos dados metabolômicos obtidos.⁸³⁻⁸⁵

1.4.1 Análise Univariada

A análise estatística univariada é amplamente empregada como etapa inicial em estudos de metabolômica global, permitindo avaliar individualmente cada metabólito para verificar se suas abundâncias diferem significativamente entre grupos experimentais. Essa abordagem é fundamental para identificar potenciais biomarcadores ou compostos discriminantes entre as condições analisadas.

Para estudos envolvendo dois grupos, o teste mais utilizado é o teste t de Student, que avalia se as médias dos dois grupos são estatisticamente diferentes, assumindo que os dados seguem uma distribuição normal e possuem variâncias homogêneas. Quando esses pressupostos não são atendidos, utiliza-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney, que compara as medianas das distribuições.

Em experimentos que envolvem três ou mais grupos, o teste mais comum é a Análise de Variância (ANOVA). A ANOVA é um método estatístico que compara as médias de três ou mais grupos simultaneamente para verificar se ao menos uma delas difere das demais. O princípio central da ANOVA é decompor a variância total dos dados em duas fontes: a variância entre os grupos (devida a diferenças nas médias) e a variância dentro dos grupos (devida ao erro experimental ou flutuações aleatórias). O teste avalia a razão entre essas variâncias para determinar se as diferenças observadas entre os grupos são maiores do que as que seriam esperadas ao acaso. O resultado é dado pelo valor de p (p -value): quando esse valor é menor que o nível de significância adotado (por exemplo, 0,05), rejeita-se a hipótese nula de igualdade entre as médias, indicando que pelo menos um grupo apresenta comportamento diferente. Caso os dados não atendam aos pressupostos de normalidade ou homogeneidade de variâncias, recorre-se ao teste de Kruskal-Wallis, que é uma alternativa não paramétrica.⁸⁶

Devido ao grande número de metabólitos analisados simultaneamente em estudos de metabolômica global, a análise univariada também requer atenção especial à interpretação dos resultados, considerando potenciais falsos positivos que podem surgir devido à realização de múltiplos testes em paralelo.

Além dos resultados estatísticos, visualizações gráficas desempenham papel fundamental na interpretação dos dados. O *volcano plot* é amplamente utilizado para integrar, em um único gráfico, a significância estatística ($-\log_{10}$ p-valor) e a magnitude da variação ($\log_2$ *fold change*), permitindo destacar metabólitos que apresentam simultaneamente grande diferença entre grupos e alta significância. *Boxplots* facilitam a visualização da distribuição dos valores nos diferentes grupos, auxiliando na detecção de padrões, amplitude do efeito e identificação de *outliers*. Já os *heatmaps* (mapas de calor) possibilitam a visualização de padrões globais de abundância entre metabólitos e amostras, sugerindo tendências que podem ser exploradas em análises multivariadas.

Assim, a análise univariada fornece um panorama inicial das alterações metabólicas entre condições experimentais, orientando a seleção de compostos para validação biológica e para análises estatísticas mais avançadas.⁸²

1.4.2 Análise Multivariada

Diferentemente da abordagem univariada, a análise estatística multivariada permite examinar simultaneamente um grande número de variáveis, sendo fundamental para revelar padrões complexos, correlações internas e agrupamentos naturais em dados de metabolômica. As técnicas multivariadas são divididas em dois grandes grupos: não supervisionadas e supervisionadas.^{87,88}

Entre os métodos não supervisionados, destaca-se a Análise de Componentes Principais (PCA), amplamente utilizada em estudos metabolômicos para reduzir a dimensionalidade dos dados e facilitar a visualização de tendências globais. A PCA transforma o conjunto original de variáveis em componentes principais, que explicam a maior parte da variabilidade dos dados, possibilitando a identificação de agrupamentos, separação entre grupos experimentais e detecção de outliers por meio de gráficos de escores (*score plots*). Outra técnica bastante utilizada é a Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA), que agrupa amostras com base em

sua similaridade e apresenta os resultados em um dendrograma. O uso de *heatmaps* integrados ao HCA permite visualizar padrões de abundância de metabólitos entre as amostras, facilitando a identificação de perfis metabólicos distintos ou semelhantes.

Já os métodos supervisionados, como a Análise Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais (PLS-DA) e o *Random Forest*, utilizam informações prévias sobre os grupos das amostras para maximizar a separação entre as classes e identificar os metabólitos mais relevantes para a discriminação. É fundamental validar esses modelos para evitar sobreajuste (*overfitting*), por meio de estratégias como validação cruzada, testes de permutação e análise de curvas ROC.

Plataformas como o MetaboAnalyst e softwares especializados, como SIMCA e pacotes do R, oferecem ferramentas completas para construção, validação e interpretação desses modelos multivariados, produzindo gráficos interpretativos como *score plots*, dendrogramas, *heatmaps* e rankings de importância das variáveis (*VIP scores*).

Portanto, a aplicação combinada de métodos uni- e multivariados amplia a compreensão dos dados metabolômicos, permitindo não apenas detectar diferenças estatísticas, mas também visualizar relações biológicas relevantes e gerar hipóteses para investigações futuras.^{82,87,89}

1.5 Anotação de Compostos

A anotação de compostos é uma das etapas mais desafiadoras em estudos de metabolômica global. Diferentemente da metabolômica alvo, na qual a identificação parte da comparação com padrões conhecidos, a abordagem global frequentemente resulta em milhares de sinais para os quais a identificação inequívoca não é trivial. Isso ocorre devido à enorme diversidade estrutural dos metabólitos, à limitação de padrões comerciais e à incompletude dos bancos de dados espectrais, tornando a maioria dos estudos dependente de abordagens de anotação, e não de identificação estrita.

A distinção entre anotação e identificação é muito importante para entender quais níveis de confiança um estudo usou para nomear os compostos presentes numa amostra. A identificação, no sentido mais estrito, implica a confirmação exata da estrutura química de um metabólito com base em dados experimentais completos, geralmente por comparação com um padrão analítico puro, levando em conta a massa exata, o tempo de retenção, o espectro de

fragmentação e outras propriedades. Já a anotação refere-se à associação provisória de uma ou mais estruturas prováveis a um sinal detectado, com base em critérios como similaridade de espectros, predição *in silico* e/ou características químicas esperadas para aquela classe de compostos.⁹⁰

Segundo Alseekh e colaboradores, essa distinção é essencial para garantir a transparência e a reprodutibilidade dos estudos metabolômicos. O uso indiscriminado do termo “identificação” para compostos não confirmados pode levar a interpretações errôneas e dificultar comparações entre experimentos. Portanto, a recomendação das boas práticas é utilizar o termo “anotação” sempre que a estrutura não tiver sido confirmada por padrão analítico, mesmo que a correspondência espectral ou de banco de dados seja alta.⁶⁴

Para padronizar o grau de certeza das atribuições, a Metabolomics Standards Initiative (MSI)⁹¹ propôs uma classificação, recentemente revisada pela Metabolomics Society,⁹² que atualmente compreende cinco níveis de confiança:

- Nível 0: Estrutura 3D inequívoca: determinação completa, incluindo estereoquímica absoluta, por isolamento do composto puro e elucidação por técnicas como RMN multidimensional.
- Nível 1: Estrutura 2D confiável ou Identificação confirmada: atribuição da estrutura com base em comparação direta com um padrão analítico puro, considerando ao menos dois parâmetros ortogonais, como tempo de retenção e espectro de fragmentação.
- Nível 2: Estrutura provável ou Anotação putativa: identificação provável com base em similaridade de fragmentação e/ou massa exata, utilizando bancos de dados experimentais ou predições *in silico*, mas sem confirmação com padrão.
- Nível 3: Estrutura ou classe possível: atribuição a uma família ou classe química (por exemplo, flavonoide, terpeno) com base em fragmentos diagnósticos ou características espectrais típicas.
- Nível 4: Sinal desconhecido: composto detectado, mas sem informações suficientes para qualquer tipo de anotação estrutural.

A fragmentação por MS/MS é importante porque a obtenção de espectros de fragmentação permite comparar experimentalmente os íons com bancos de dados referenciais (como MassBank, GNPS, NIST) ou utilizar algoritmos preditivos *in silico*, sendo essencial para

distinguir certos tipos de isômeros e alcançar níveis mais elevados de confiança na anotação. Algumas das principais ferramentas computacionais utilizadas para esse processo em metabolômica estão descritas na Tabela 1.

Vale ressaltar que essas ferramentas raramente são empregadas de forma isolada, já que cada uma possui funções e vantagens específicas. Por exemplo, o MSConvert é amplamente utilizado para converter arquivos brutos de espectrometria de massas em formatos abertos, como *.mzML*, tornando possível o processamento posterior em plataformas como o MZmine ou o XCMS. Para a anotação, o MetFrag é muito utilizado para buscar estruturas candidatas e comparar sua fragmentação *in silico* com a fragmentação experimental consultada, ou seja, a partir da lista de *m/z* e intensidades do espectro de fragmentação. Entretanto, é relativamente restrito quanto ao número de adutos suportados. Por outro lado, o CEU Mass Mediator complementa essa etapa ao permitir buscas considerando uma gama muito maior de adutos, embora seja mais limitado em termos de buscas por espectros de fragmentação. Assim, a escolha e a combinação das ferramentas dependem do objetivo da análise, do tipo de dado gerado e dos recursos disponíveis.

De modo geral, a metabolômica global se beneficia enormemente dessa integração de softwares, que permite explorar o máximo de informações extraídas dos dados. No entanto, essa estratégia demanda tempo, uma vez que o processamento e anotação dos compostos em grandes conjuntos de dados exige a realização de verificações sobre a plausibilidade da identificação na amostra utilizada, do tempo de retenção em relação às propriedades químicas da estrutura proposta, do espectro de fragmentação e do perfil de distribuição isotópica, para garantir a confiabilidade da anotação.

Tabela 1: Principais ferramentas computacionais utilizadas para anotação em estudos de metabolômica, com destaque para suas principais funções e características.

Ferramenta	Tipo	Principais Funções	Formato Suportado	Comentários	Ref
Compound Discoverer	Software proprietário (Thermo)	Processamento de dados <i>.raw</i> , alinhamento, normalização, anotação automática, estatística.	<i>.raw</i> (Thermo)	<i>Workflow</i> completo e integrado para equipamentos Thermo. Software pago.	93
XCMS Online	<i>Web-based</i>	Deteção de picos, alinhamento, correção de tempo, estatísticas uni/multivariadas, anotação inicial.	<i>.mzML</i> , <i>.cdf</i> , <i>.mzXML</i>	Interface amigável, integração com bancos públicos, compartilhamento de projetos.	94,95
MZmine	Código aberto	Deteção de picos, alinhamento, deconvolução, normalização, visualização, anotação.	<i>.mzML</i> , <i>.cdf</i> , <i>.mzXML</i> , <i>.raw</i> , etc.	Flexível, compatível com múltiplos formatos, integração com GNPS.	96–98
GNPS	<i>Web-based</i>	Anotação de compostos, construção de redes moleculares, busca em bibliotecas espectrais.	<i>.mzML</i> , <i>.mzXML</i>	Permite inferir famílias de compostos; forte para naturais.	99
SIRIUS/ CSI:FingerID	Código aberto	Predição de fórmulas moleculares, fragmentação teórica, classificação.	<i>.ms</i> , <i>.mgf</i> , <i>.mzML</i> , etc.	Alta performance para anotação <i>in silico</i> e estrutura provável.	100
MetFrag	<i>Web-based</i>	Busca <i>in silico</i> por estruturas e fragmentações, anotação putativa.	<i>.csv</i> , <i>.mgf</i>	Pesquisa automatizada em bancos como PubChem, HMDB.	101
CEU Mass Mediator	<i>Web-based</i>	Consulta simultânea em múltiplos bancos de dados por <i>m/z</i> .	texto	Facilita a anotação manual, uso complementar.	102

1.6 Interpretação Biológica

A interpretação biológica é a etapa final do estudo metabolômico, na qual as alterações nos perfis de metabólitos são associadas a rotas metabólicas, funções biológicas e potenciais implicações fenotípicas. Para isso, utiliza-se tanto a consulta à literatura especializada quanto ferramentas automatizadas de análise de vias, como MetaboAnalyst, KEGG e o GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking), que permite não apenas a anotação de compostos, mas também a visualização de redes moleculares e associação dos metabólitos com rotas bioquímicas conhecidas.^{85,98,103}

A utilização de bases de dados públicas é fundamental para essa etapa. O COCONUT 2.0 (COLleCtion of Open Natural prodUCts), por exemplo, é uma das maiores coleções abertas de produtos naturais, oferecendo milhares de estruturas moleculares, metadados detalhados sobre origem, taxonomia, aplicações medicinais e localização geográfica dos compostos, além de ser frequentemente utilizada para busca, comparação e contextualização de metabólitos em estudos de produtos naturais.¹⁰⁴

Ao integrar dados experimentais, ferramentas de análise de rotas e bancos de dados abertos, é possível construir hipóteses mais robustas sobre os papéis biológicos dos metabólitos identificados, contribuindo para o avanço do conhecimento sobre os sistemas biológicos estudados.

1.7 Caracterização do Própolis por Espectrofotometria de Absorção Molecular

A espectrofotometria de absorção molecular é uma técnica analítica amplamente empregada para caracterizar compostos presentes em matrizes naturais, incluindo extratos de própolis. O método baseia-se na absorção de radiação eletromagnética por moléculas, resultando em transições eletrônicas entre níveis de energia. O espectrofotômetro UV-Vis possibilita registrar espectros de absorção em uma ampla faixa, que normalmente vai de 200 a 800 nm, abrangendo tanto a região ultravioleta (UV) quanto o visível (VIS) do espectro eletromagnético.¹⁰⁵

A absorção observada em determinada região está relacionada à presença de sistemas conjugados (como duplas ligações alternadas) nas moléculas analisadas. Compostos fenólicos

e flavonoides, abundantes no própolis, absorvem tipicamente entre 200 e 400 nm, e é justamente essa faixa que a legislação brasileira preconiza como comprovação qualitativa para a presença dessas classes de compostos em extratos comerciais de própolis.¹⁰⁶

No entanto, a análise da região visível (acima de 400 nm) é pouco explorada em estudos sobre própolis, apesar de ter potencial para fornecer informações sobre pigmentos naturais, como carotenoides, antocianinas e clorofilas, que influenciam diretamente a coloração do extrato.¹⁰⁷ A cor percebida do extrato está intimamente relacionada ao padrão de absorção no visível: moléculas absorvem luz em certos comprimento de onda e refletem em outros de forma que a cor observada é correspondente à luz transmitida. Por exemplo, um extrato de coloração verde absorve principalmente luz nas regiões do vermelho e violeta (entre ~600–750 nm e ~400 nm), enquanto um extrato avermelhado absorve predominantemente na região do verde (em torno de 500–570 nm).¹⁰⁵

Na literatura sobre extratos naturais, a análise UV-Vis já é utilizada para distinguir pigmentos e correlacionar características químicas à cor. No estudo de Sullivan e colaboradores, por exemplo, extratos vegetais foram caracterizados no visível para selecionar misturas de pigmentos com diferentes faixas de absorção e, conseqüentemente, cores variadas. Essa abordagem permitiu otimizar aplicações em dispositivos, como células solares, mas também reforça o potencial da espectrofotometria de absorção no visível para identificar padrões de coloração e composição em extratos complexos.¹⁰⁸

No caso do própolis, poucos estudos abordam detalhadamente o espectro visível para fins de caracterização. Sabe-se, porém, que o própolis verde tende a apresentar bandas de absorção mais intensas entre 600–750 nm (vermelho), devido à presença de clorofilas e compostos fenólicos específicos, enquanto o própolis vermelho mostra absorção significativa entre 480–560 nm (verde-azulado), correlacionando-se com sua coloração típica.

Portanto, a avaliação da cor do própolis por espectrofotometria de absorção molecular não só complementa a identificação de classes químicas de interesse, mas também permite correlacionar objetivamente a cor do extrato ao espectro de absorção no visível, contribuindo para a classificação e valorização de produtos naturais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

O objetivo principal deste estudo foi realizar uma investigação sobre a composição química dos própolis provenientes da região do Vale do Jequitinhonha, a fim de identificar os principais compostos presentes nesses própolis, visando compreender melhor sua complexidade química e possíveis propriedades biológicas, associadas à origem geográfica e à diversidade do ambiente dessa região.

2.2 Objetivos específicos:

- Coletar e preparar amostras de própolis proveniente de diferentes localidades do Vale do Jequitinhonha;
- Realizar a aquisição de dados por LC-MS em abordagem metabolômica global;
- Processar os dados obtidos para gerar uma matriz de dados bidimensionais que possa ser submetida à análise estatística;
- Aplicar métodos estatísticos para investigar padrões químicos e identificar possíveis compostos relacionados à origem geográfica dos própolis;
- Anotar os compostos mais relevantes por meio de buscas em bancos de dados, bibliotecas espectrais e ferramentas *in silico*;
- Avaliar a coloração dos extratos de própolis por espectrofotometria de absorção molecular;
- Verificar a presença de compostos característicos de própolis vermelho e verde nas amostras em estudo;
- Realizar análise estatística dos perfis químicos para as amostras agrupadas de acordo com os resultados da espectroscopia de absorção molecular.

3. METODOLOGIA

3.1 Reagentes e soluções

Foram utilizados metanol grau HPLC da Merck (Darmstadt, Alemanha) e da VWR Chemicals (USA), etanol grau P.A. com 95% de pureza da NEON (Brasil), ácido fórmico a 85% adquirido da CRQ Química (Diadema, São Paulo, Brasil) e p-fluorofenilalanina (F-Phe) da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). A água utilizada foi ultrapura, obtida em sistema Gehaka MS3000 Master System (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil).

3.2 Amostras

As amostras de própolis foram coletadas em diferentes localidades do Vale do Jequitinhonha, no Estado de Minas Gerais, por meio de colaboração com o Prof. Dr. André Rodrigo Rech e sua aluna Ms. Mayra Conceição Meira Silva, que intermediaram o contato com apicultores da região e a coleta das amostras, com apoio da COOAPIVAJE. As amostras foram acondicionadas em tubos Falcon de 50 mL, transportadas em temperatura ambiente para o Laboratório de Química Analítica e Espectrometria de Massas da UFMG (LACMass) e então mantidas sob refrigeração (-20 °C) até o preparo.

Cada amostra foi georreferenciada com base nas informações fornecidas pelos apicultores, registrando cidade, bairro e/ou comunidade, além de coordenadas geográficas (quando disponíveis), nomes e contatos dos produtores. As informações foram organizadas em planilhas do Excel para possibilitar o mapeamento geográfico das amostras.

3.3 Preparo das amostras

O preparo das amostras foi realizado em ordem aleatória. Foram pesados 1,2 g de cada amostra de própolis bruto, os quais foram colocados em tubos de vidro contendo 2,8 mL de etanol 70%. As amostras foram então submetidas à agitação em vórtex por 10 segundos, seguidas de banho ultrassônico por 30 min e centrifugação a 4000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e armazenado a -20 °C.

No dia seguinte, os sobrenadantes foram novamente centrifugados para remoção de resíduos cerosos. Em seguida, o sobrenadante resultante foi filtrado utilizando filtros de seringa

de 22 μm , com membrana de polietersulfona (PES), e transferido para frascos de vidro (*vials*) identificados individualmente. Esse extrato filtrado foi considerado pronto para análise.

Para a análise por LC-MS, os extratos foram diluídos da seguinte forma: 20 μL do extrato foram misturados a 1980 μL de metanol 30%, com adição do padrão interno *p*-fluorofenilalanina (F-Phe), resultando em uma concentração final de 0,1 mg/L do padrão interno. A F-Phe foi escolhida como padrão interno por apresentar estrutura aromática e polaridade comparáveis a compostos fenólicos do própolis, não ocorrer naturalmente nessa matriz e já ter sido utilizada em análises metabolômicas por LC-MS como aminoácido marcador.¹⁰⁹

As amostras QC foram preparadas a partir da mistura de 20 μL de cada extrato individual, produzindo uma amostra *pool*. Essa mistura também foi diluída conforme o mesmo protocolo aplicado às amostras individuais do estudo. Além disso, uma amostra “branco” foi preparada com etanol 70% e diluída da mesma forma.

3.4 Análise das amostras por UHPLC-MS

As análises foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC) modelo Vanquish Horizon, equipado com bomba binária (VF-P10-A-01), amostrador automático (VF-A10-A-02) e compartimento de coluna termostatizado (VH-C10-A-02), acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução com fonte de ionização por eletrospray (ESI), modelo Q Exactive Plus (Thermo Scientific, EUA).

A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Kinetex F5 (Phenomenex, EUA), com dimensões de 150 x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μm e poros de 100 Å. A temperatura da coluna foi mantida em 30 °C e o volume de injeção foi de 5 μL .

A fase móvel foi composta por água contendo 0,1% de ácido fórmico (A) e metanol contendo 0,1% de ácido fórmico (B), empregando um gradiente de eluição conforme descrito na Tabela 2 a uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min.

Tabela 2: Gradiente utilizado na separação cromatográfica

Tempo (min)	%B
0,0	1,0
12,0	95,0
16,0	95,0
16,1	1,0
20,0	1,0

A aquisição dos dados foi feita nos modos de ionização positiva e negativa, separadamente, com faixa de detecção de m/z 100 a 1500. A fonte de ionização operou com os seguintes parâmetros: voltagem do capilar de 4,0 kV, fluxo de gás de nebulização de 30 unidades arbitrárias, fluxo de gás auxiliar de 5 unidades arbitrárias e temperatura do capilar de 300 °C.

Os dados foram adquiridos no modo *data-dependent acquisition full scan* (DDA-FS) com espectros obtidos no modo centroide. Os parâmetros do modo *Full MS* foram: faixa de varredura de m/z 100 a 1500, resolução de 70.000, tempo máximo de injeção (Max IT) de 100 ms.

Para aquisição dos espectros MS/MS, utilizou-se o modo *fullMS/DDA (data dependent analysis)* com TOP N = 5, resolução de 17.500, tempo máximo de injeção (Max IT) de 50 ms, janela de isolamento de 1,0 m/z , spectrum data em modo centroide, energia de colisão normalizada (NCE) escalonada em 20, 40 e 60 eV, exclusão dinâmica de 10 s, *apex trigger* entre 0,2 e 0,5 s e exclusão isotópica ativada.

A sequência de injeção seguiu o padrão de inicialização com uma amostra branco, seguida por dez injeções consecutivas de amostras de QC para estabilização do sistema. Em seguida, as amostras foram injetadas em ordem aleatória, intercaladas com uma amostra QC a cada 10 amostras analisadas, finalizando a sequência com mais uma amostra QC e uma segunda amostra branco para verificar possíveis contaminações residuais ou deriva instrumental.

Essa estratégia de sequência visou minimizar viés experimental e monitorar a estabilidade instrumental ao longo das análises.

3.5 Tratamento dos dados

Os dados brutos obtidos por LC-MS foram processados no software Compound Discoverer™ 3.3 (Thermo Scientific), utilizando o workflow *Untargeted Metabolomics with Statistic Detect Unknowns with ID using Online Databases and mzLogic*. Esse fluxo de trabalho automatiza o alinhamento dos tempos de retenção, a detecção e agrupamento de compostos desconhecidos, a deconvolução dos espectros, a remoção de sinais de *background* (amostras em branco) e a previsão de fórmulas moleculares. A identificação putativa foi realizada por busca em bibliotecas como mzCloud, ChemSpider e Metabolika, com priorização das anotações pelo algoritmo mzLogic.

Como parte da verificação de qualidade dos dados, o software Xcalibur™ (Thermo Scientific) foi utilizado para inspeção individual de cada amostra, permitindo a visualização de espectros de massas, verificação de espectros MS/MS e construção de cromatogramas de íons extraídos (EICs) específicos para monitorar o comportamento de compostos-chave ao longo das análises.

Para a construção de gráficos de área de picos cromatográficos de compostos específicos e avaliação detalhada de diferentes adutos, foi utilizado o software Skyline. O Skyline associa o m/z atribuído a cada íon com as respectivas áreas de picos cromatográficos em todas as amostras, gerando gráficos quantitativos.

Em etapas complementares de visualização e processamento, parte dos arquivos de dados brutos foi convertida do formato proprietário (.raw) para o formato aberto .mzML utilizando o software MSConvert (ProteoWizard). Esses arquivos foram então processados no MZmine, empregado para geração de EICs, inspeção de picos cromatográficos e construção de gráficos exploratórios adicionais.

Por fim, os resultados do Compound Discoverer™ foram exportados como matrizes de dados (compostos vs. amostras, com áreas normalizadas) e organizados no Microsoft Excel® para filtragem de sinais de baixa frequência e preparação para análise estatística.

3.6 Análise estatística e interpretação biológica

A matriz de dados contendo os íons detectados (*features*) e suas intensidades relativas foi submetida ao MetaboAnalyst 5.0, utilizando o módulo *Statistical Analysis (one factor)*.

Como etapa inicial, aplicou-se filtragem de confiabilidade técnica, excluindo-se compostos com coeficiente de variação superior a 25% nas amostras de QC e removendo as variáveis menos informativas com base no intervalo interquartil (IQR), filtrando 40% dos valores de maior variância.

Para uniformizar a escala das variáveis, os dados foram submetidos a autoescalamamento (centralização na média e divisão pelo desvio padrão de cada variável).

Após o tratamento, os dados foram submetidos à Análise de Componentes Principais (PCA) para inspeção de agrupamentos e avaliação de variações globais entre amostras. Em seguida, aplicou-se análise univariada por ANOVA (p valor $< 0,05$) para seleção de íons com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Os íons discriminantes identificados foram utilizados na construção de *boxplots* e *heatmaps* para auxiliar as análises comparativas entre as amostras de própolis do Vale do Jequitinhonha.

Por fim, a interpretação biológica foi conduzida com base em revisão da literatura, considerando para cada composto anotado putativamente sua função bioquímica descrita e registros prévios de ocorrência em própolis e plantas de diferentes origens botânicas. Também foram levados em conta aspectos da flora local predominante, permitindo discutir possíveis relações ecológicas entre os metabólitos identificados e a vegetação disponível para coleta pelas abelhas na região de estudo.

3.7 Análise das amostras por espectrofotometria de absorção molecular na região do visível

As análises espectrofotométricas foram realizadas utilizando o leitor de microplacas SpectraMax ID3 (Molecular Devices), operado por meio do software SoftMax Pro. Para cada leitura, foram depositados 200 μ L de cada extrato etanólico em microplacas de 96 poços transparentes de fundo plano, tipo Greiner.

Os extratos foram analisados em sua forma pura, com exceção das amostras AP21 e AP53, que apresentaram alta absorbância nos testes preliminares e, por isso, foram previamente diluídas em 1:100 com etanol 70% (v/v). O equipamento opera com faixa de leitura de 0 a 4

unidades de absorbância (AU), sendo que, após a leitura, as amostras diluídas tiveram seus valores corrigidos pelo respectivo fator de diluição.

As leituras espectrais foram realizadas na faixa de 400 a 800 nm, com incremento de 1 nm. Os espectros obtidos foram empregados para caracterizar o padrão de absorção dos extratos e complementar as análises feitas por LC-MS.

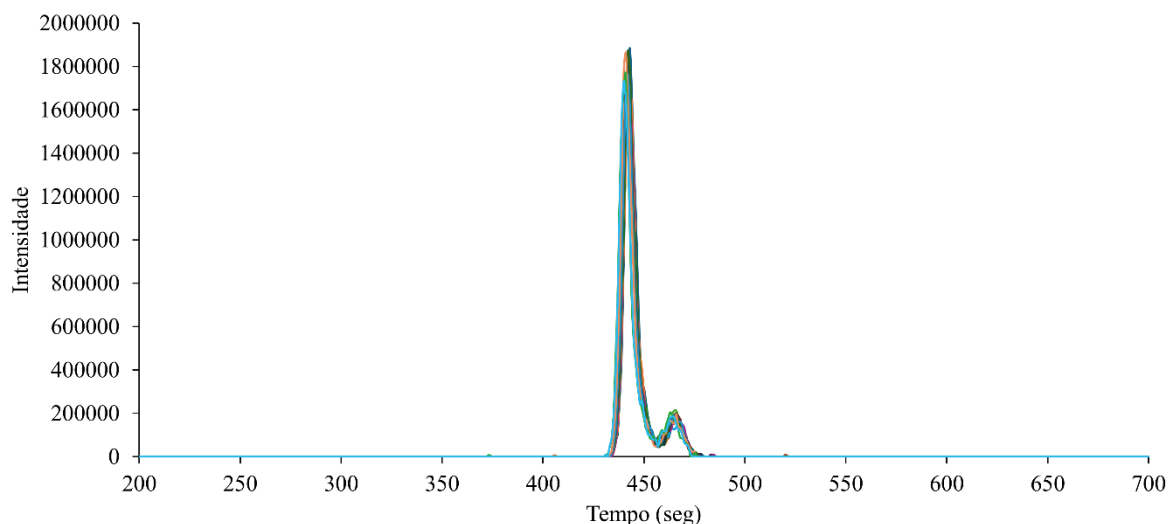
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da Estabilidade Analítica e Controle de Qualidade

A verificação da estabilidade instrumental ao longo da corrida analítica é uma etapa essencial em estudos metabolômicos untargeted, uma vez que variações sistemáticas podem comprometer a confiabilidade dos resultados. Para identificar possíveis desvios relacionados à ordem de análise e fundamentar decisões quanto à normalização dos dados, recomenda-se fazer a inspeção da resposta dos compostos ao longo da ordem de injeção, especialmente usando as amostras de QC.¹¹⁰

Neste estudo, a estabilidade da resposta foi avaliada a partir do monitoramento da área do pico do padrão interno 4-fluorofenilalanina, F-Phe, inserido em todas as amostras e QCs. Na Figura 5, observa-se o Cromatograma de Íon Extraído (EIC) referente ao íon de m/z 183,0623, correspondente à F-Phe no modo de ionização negativo. Os cromatogramas foram obtidos a partir dos arquivos brutos, antes da etapa de alinhamento, e mostram picos bem definidos e consistentemente alinhados para todas as amostras de QC, indicando boa reprodutibilidade e estabilidade do sistema analítico durante a aquisição dos dados.

Figura 5: Cromatograma de Íon Extraído (EIC) sobreposto das amostras de QC para o íon F-Phe (m/z 182.0623) no modo de ionização negativo.



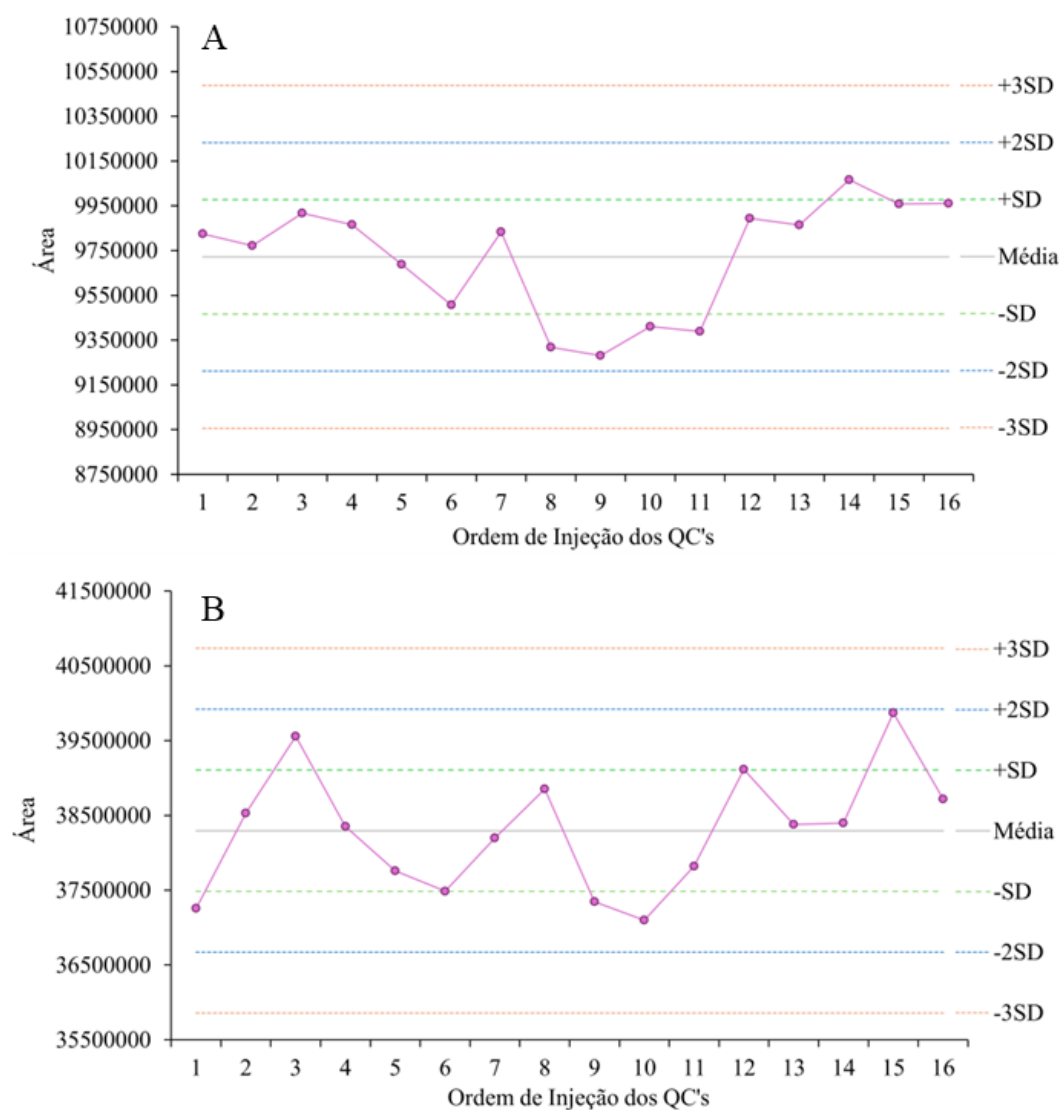
Com o EIC, observa-se que os tempos de retenção do íon da F-Phe se mantiveram muito próximos entre os QCs, mesmo sem nenhuma aplicação de alinhamento prévio, visto que a figura foi construída a partir dos dados brutos fornecidos pelo equipamento.

O segundo critério para avaliar a qualidade da análise cromatográfica foi a construção de um gráfico de controle, no qual a área do pico cromatográfico da F-Phe foi plotada em função da ordem de injeção das amostras QCs. As faixas de variação foram determinadas com base na média, acrescida e decrescida de múltiplos do desvio padrão (SD). Considera-se aceitável a variação quando nenhuma amostra de QC ultrapassa o limite de média $\pm 3SD$; não há duas amostras consecutivas acima de $\pm 2SD$; não há seis amostras consecutivas do mesmo lado da média com valores acima de $\pm 1SD$ e não há oito amostras consecutivas em tendência.^{73,74}

No modo de ionização negativo, observou-se que todos os valores permaneceram dentro do intervalo de ± 3 desvios padrão em relação à média, como observado na Figura 6, o que evidencia a boa repetibilidade do sistema. Observou-se um grupo de quatro QCs consecutivos com valores entre a média $- 1SD$ e média $+1SD$, e um ponto isolado com valor ligeiramente superior à média $+ 1SD$. No entanto, nenhum dos pontos ultrapassou o limite de $\pm 3SD$, tampouco foram observadas sequências que caracterizassem falha analítica.

De maneira semelhante, no modo de ionização positivo, a variação observada também permaneceu dentro dos limites aceitáveis, confirmando a estabilidade do sistema analítico.

Figura 6: Gráficos de controle para as áreas de pico do padrão interno F-Phe nos modos negativo (A) e positivo (B) nas amostras de QC.

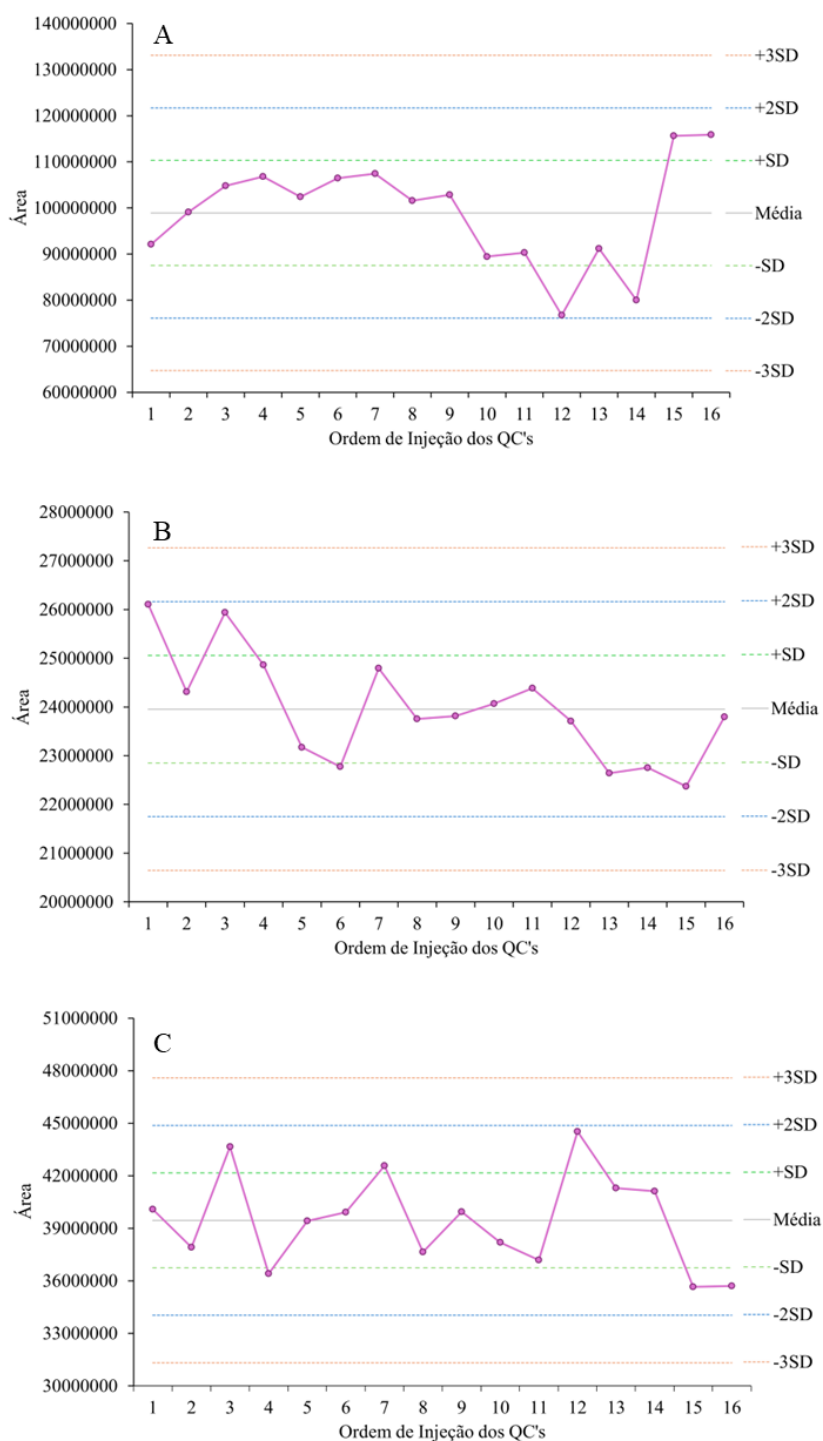


Além da avaliação do padrão interno, íons representativos da composição química do própolis foram selecionados para verificar a consistência das respostas instrumentais ao longo da ordem de injeção. Foram analisadas as áreas dos picos da quercetina (modo de ionização positivo), do ácido p-cumárico e do ácido cafeico (modo negativo) nos cromatogramas de íons extraídos dos QCs.

Os compostos fenólicos selecionados são conhecidos marcadores do própolis e, por isso, representam bons indicadores da estabilidade analítica. Os gráficos de controle gerados para

cada um deles, observados na Figura 7, mostraram boa estabilidade dos sinais ao longo da corrida, com a maioria dos pontos distribuída dentro do intervalo de ± 1 SD da média e sem indícios de tendência sistemática.

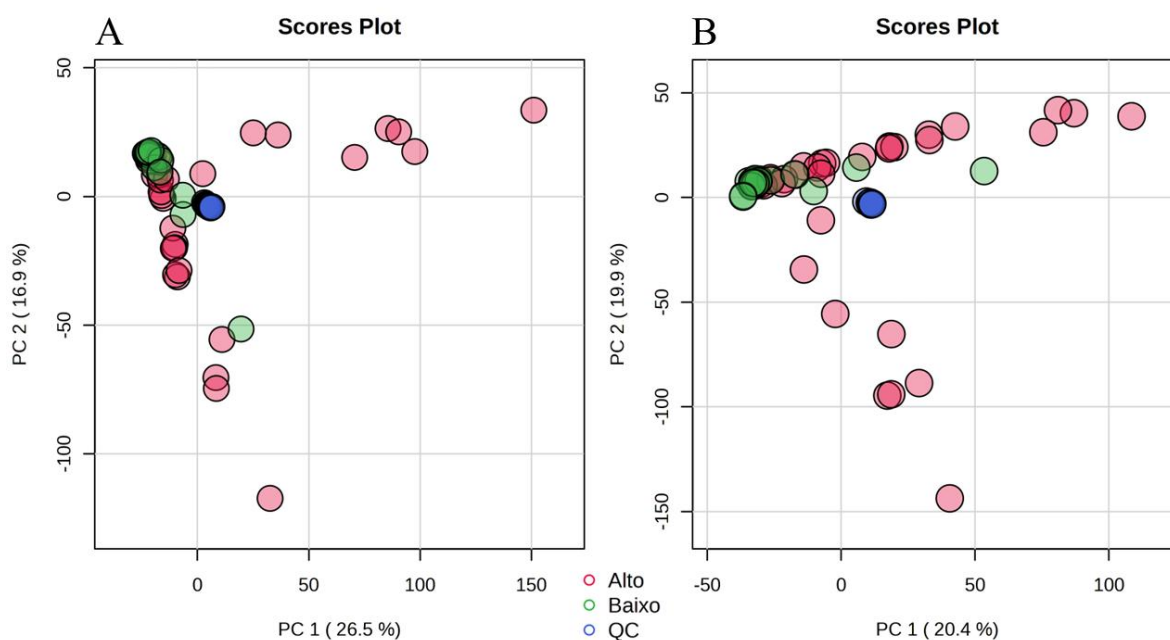
Figura 7: Gráficos de controle para as áreas de pico da quercetina (A), ácido p-cumárico (B) e ácido cafeico (C) nas amostras de QC.



A análise da distribuição das amostras QC em um gráfico de análise de componentes principais (PCA) representa uma etapa complementar na verificação da estabilidade do sistema analítico. Como os QCs foram preparados a partir da mistura de todas as amostras de extrato de própolis, espera-se que eles representem um perfil químico abrangente e consistente, refletindo a média global da matriz.

No gráfico de escores da PCA é desejável que essas amostras se concentrem de forma coesa, sem dispersão excessiva, e próximas ao centro da distribuição geral, indicando ausência de variabilidade sistemática introduzida pela ordem de injeção, por instabilidades instrumentais ou por erros no preparo dos QCs. A Figura 8 apresenta os resultados obtidos a partir da matriz de dados metabolômicos gerada pelas áreas dos picos cromatográficos de LC-MS, para os modos de ionização negativo (A) e positivo (B). As amostras de QC, indicadas na cor azul, mostram um agrupamento claro e compacto, evidenciando a boa repetibilidade e robustez das análises realizadas.

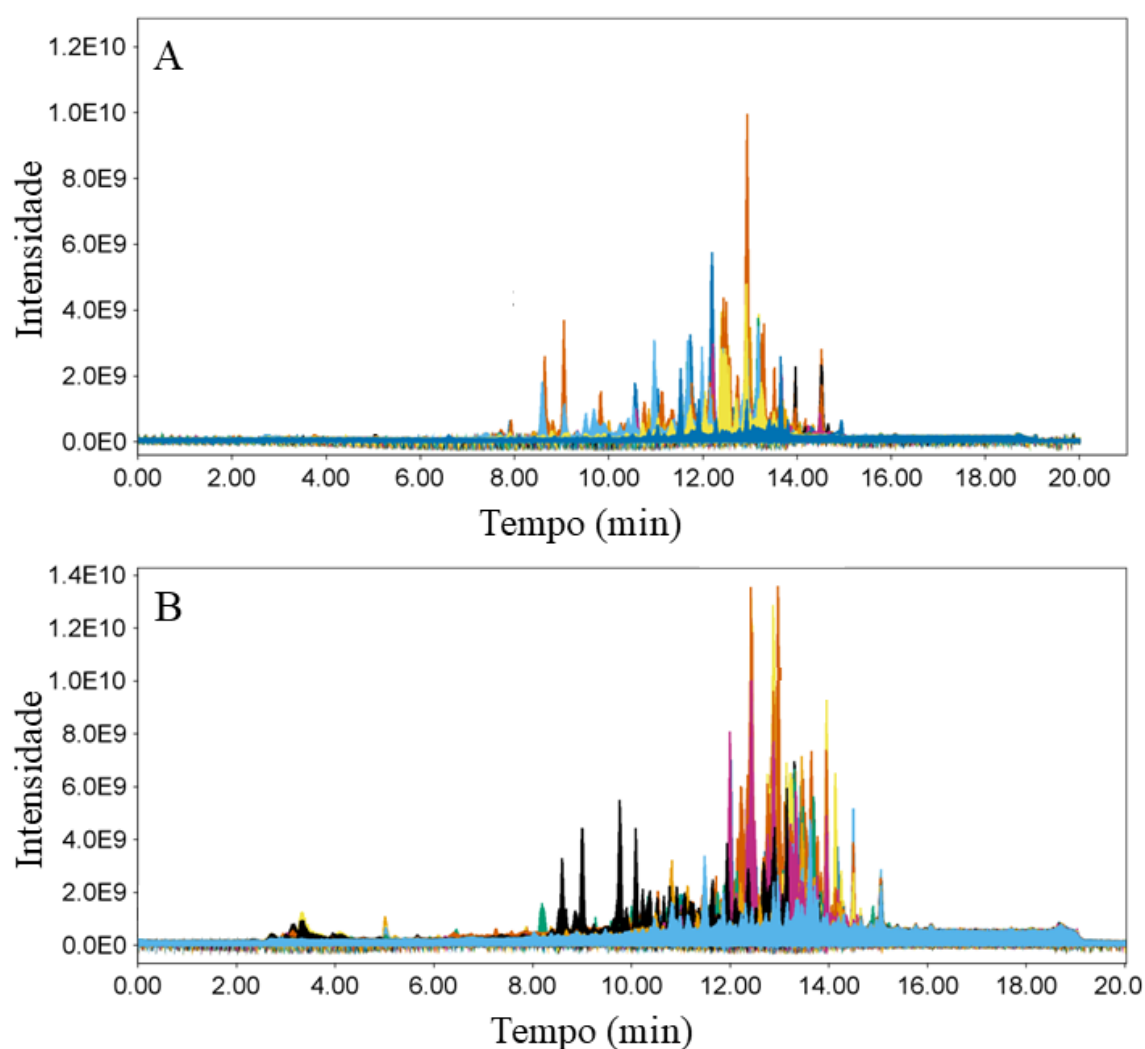
Figura 8: Gráfico de escores da PCA para os QCs nos modos de ionização negativo (A) e positivo (B).



4.2 Análise Estatística do Perfil Químico por LC-MS

A sobreposição dos cromatogramas de íons totais (TIC) obtidos nos modos negativo (A) e positivo (B) de ionização evidencia diferenças expressivas entre os perfis químicos das amostras de própolis analisadas, como observado na Figura 9. As variações observadas tanto na intensidade quanto na distribuição dos sinais ao longo do tempo de retenção indicam uma diversidade composicional relevante entre os extratos provenientes das distintas localidades do Vale do Jequitinhonha.

Figura 9: Cromatogramas de íons totais (TIC) sobrepostos obtidos nos modos negativo (A) e positivo (B) de ionização para as amostras de própolis do Vale do Jequitinhonha.

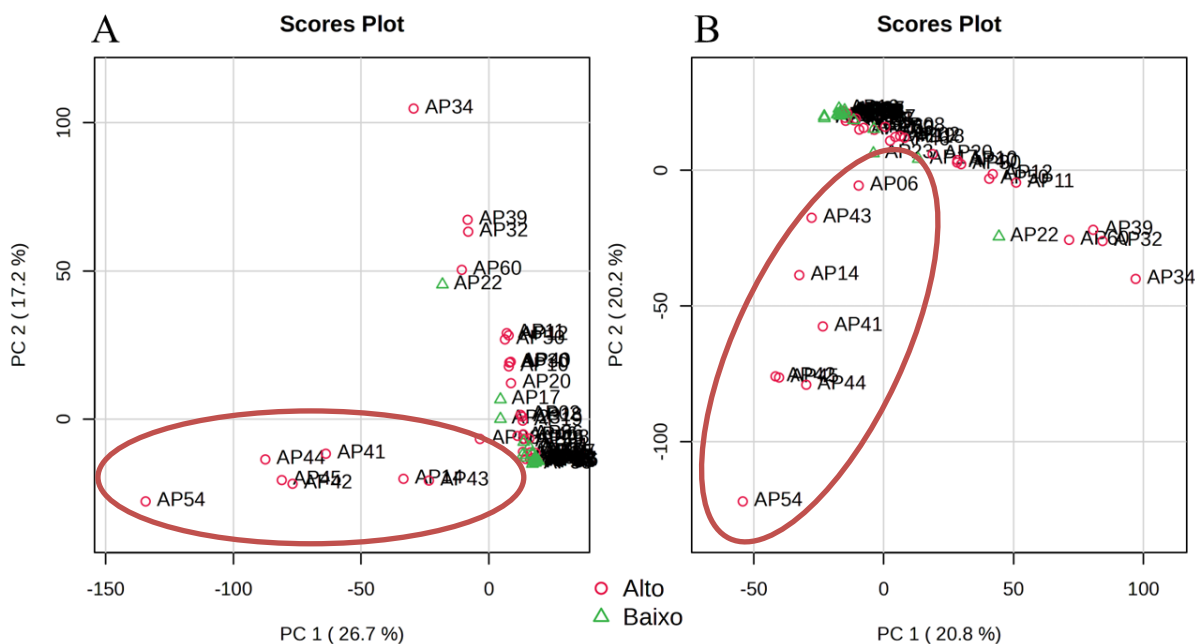


4.2.1 Comparação do perfil metabólico entre Alto e Baixo Jequitinhonha

A Figura 10 apresenta os gráficos de escores da PCA, relacionando os componentes principais PC1 e PC2, gerados a partir da matriz de dados de LC-MS nos modos de ionização negativo (A) e positivo (B). A variância explicada pelas duas primeiras componentes foi de 26,7% e 17,2% para o modo negativo, e de 20,8% e 20,2% para o modo positivo. As análises foram conduzidas na plataforma MetaboAnalyst. Trata-se da mesma análise de PCA mostrada nas demais classificações, diferenciando-se apenas pelo critério de agrupamento aplicado.

Inicialmente, optou-se por utilizar a divisão geográfica entre Alto e Baixo Jequitinhonha como critério de agrupamento. No entanto, os resultados dos gráficos de PCA indicaram que essa segmentação não foi suficiente para representar adequadamente a variabilidade química observada. Embora um subconjunto de amostras oriundas de Diamantina, pertencentes ao Alto Jequitinhonha, tenha apresentado um agrupamento claro (destacado na Figura 10), a maioria das amostras mostrou sobreposição significativa, sem separação nítida entre os grupos.

Figura 10: Gráfico de escores da PCA (PC1 vs PC2) das amostras agrupadas em Alto e Baixo Jequitinhonha, modos negativo (A) e positivo (B). As elipses vermelhas foram traçadas manualmente para destacar o agrupamento das amostras de Diamantina.

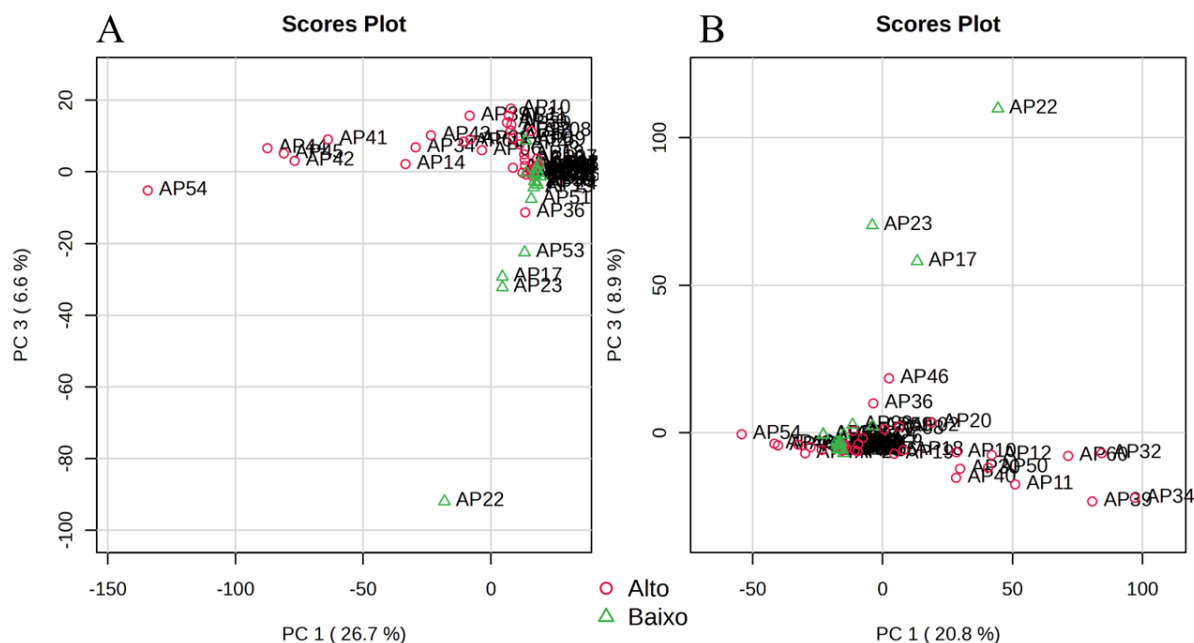


Esse comportamento sugere que fatores geográficos amplos, como a divisão em Alto e Baixo, podem não ser os principais determinantes da composição química do própolis na região.

Aspectos mais específicos, como a vegetação local, altitude, práticas apícolas ou microclimas, provavelmente desempenham um papel mais relevante na definição do perfil metabólico.

Com o intuito de investigar possíveis padrões de agrupamento adicionais, também foram exploradas outras combinações de componentes principais. A Figura 11 mostra os gráficos de PCA com a projeção das amostras nos eixos PC1 e PC3, tanto para o modo negativo (A) quanto para o positivo (B).

Figura 11: Gráfico de escores da PCA (PC1 vs PC3) das amostras agrupadas em Alto e Baixo Jequitinhonha, modos negativo (A) e positivo (B).



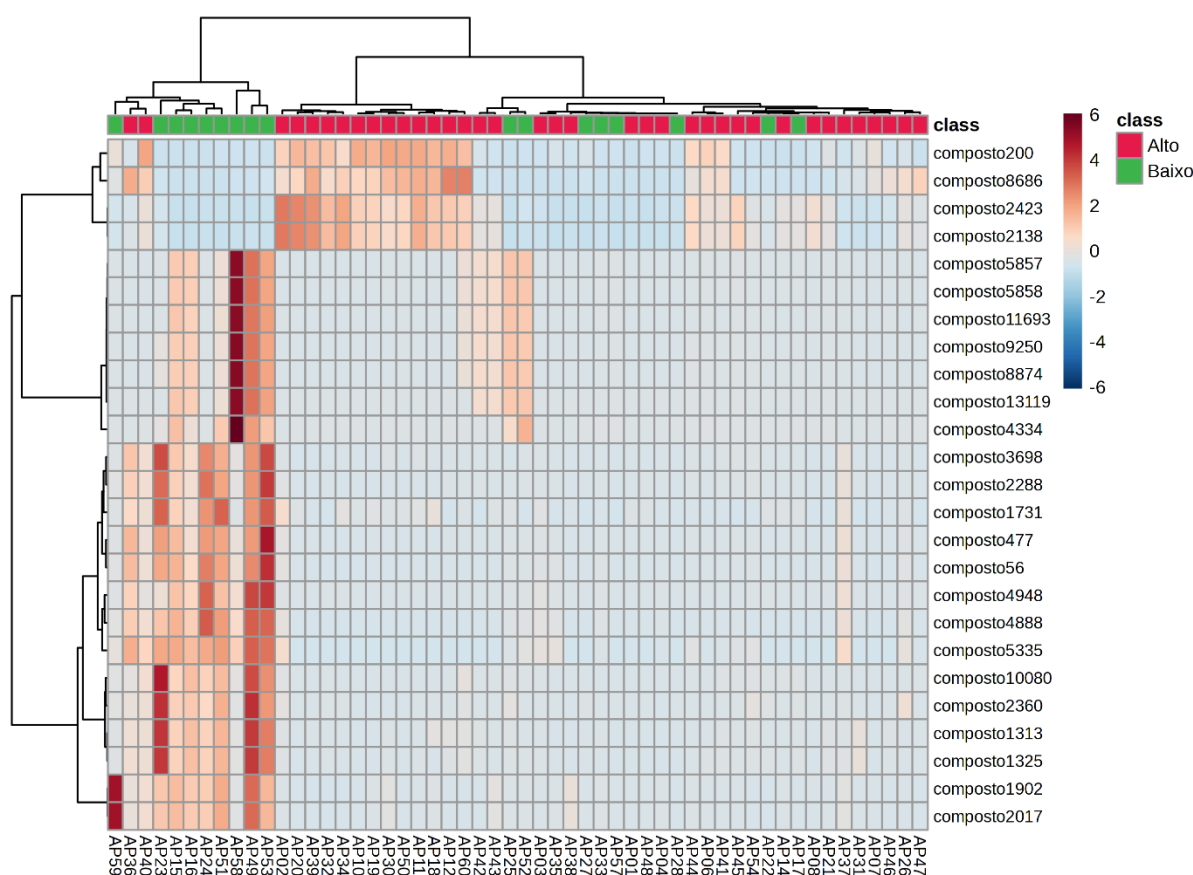
Nos resultados obtidos para o modo negativo de ionização, observa-se uma separação evidente de algumas amostras oriundas da microrregião Diamantina (AP54, AP41, AP45, AP44, AP42, AP14), que permanecem agrupadas de forma coesa. Além disso, amostras de Almenara, especificamente AP22, AP23, AP17 e AP53, também se destacam por sua distribuição mais afastada das demais, principalmente ao longo da PC3, que explica 6,6% da variância total.

Já no modo positivo de ionização, observa-se uma inversão no comportamento: as amostras de Diamantina deixam de formar um agrupamento claro, enquanto as amostras de

No modo negativo (Figura 12), observa-se à esquerda do mapa a formação de um agrupamento bem definido, composto principalmente por amostras da microrregião de Capelinha (AP34, AP32, AP07, AP18, AP19, AP20, AP39, AP11, AP30, AP50, AP40, AP10 e AP12) e algumas de Diamantina (AP60, AP41 e AP06), ambas pertencentes ao Alto Jequitinhonha. No centro do mapa, destaca-se outro grupo formado majoritariamente por

amostras de Almenara (AP22, AP58, AP16, AP49, AP24, AP23, AP15, AP51 e AP53), todas do Baixo Jequitinhonha, além da amostra AP36, de Capelinha, integrada a esse agrupamento. Já na região central do mapa, observa-se um perfil influenciado especialmente pelo composto 1649, envolvendo as amostras AP26 e AP46 (Capelinha) e AP14, AP42, AP45, AP44 e AP54 (Diamantina), todas do Alto Jequitinhonha.

Figura 13: *Heatmap* das amostras classificadas por Alto e Baixo Jequitinhonha no modo positivo de ionização.



No modo positivo (Figura 13), observa-se à esquerda do dendrograma um agrupamento predominante de amostras do Baixo Jequitinhonha (AP59, AP23, AP15, AP16, AP24, AP51, AP58, AP49 e AP53), acompanhado das amostras AP36 e AP40, de Capelinha (Alto Jequitinhonha). Já na região central do dendrograma, destaca-se um grupo formado principalmente por amostras de Capelinha (AP02, AP20, AP39, AP32, AP34, AP10, AP19, AP30, AP50, AP11, AP18 e AP12) e por AP60, de Diamantina (todas Alto Jequitinhonha). Assim como observado no modo negativo, o agrupamento reflete tanto a proximidade

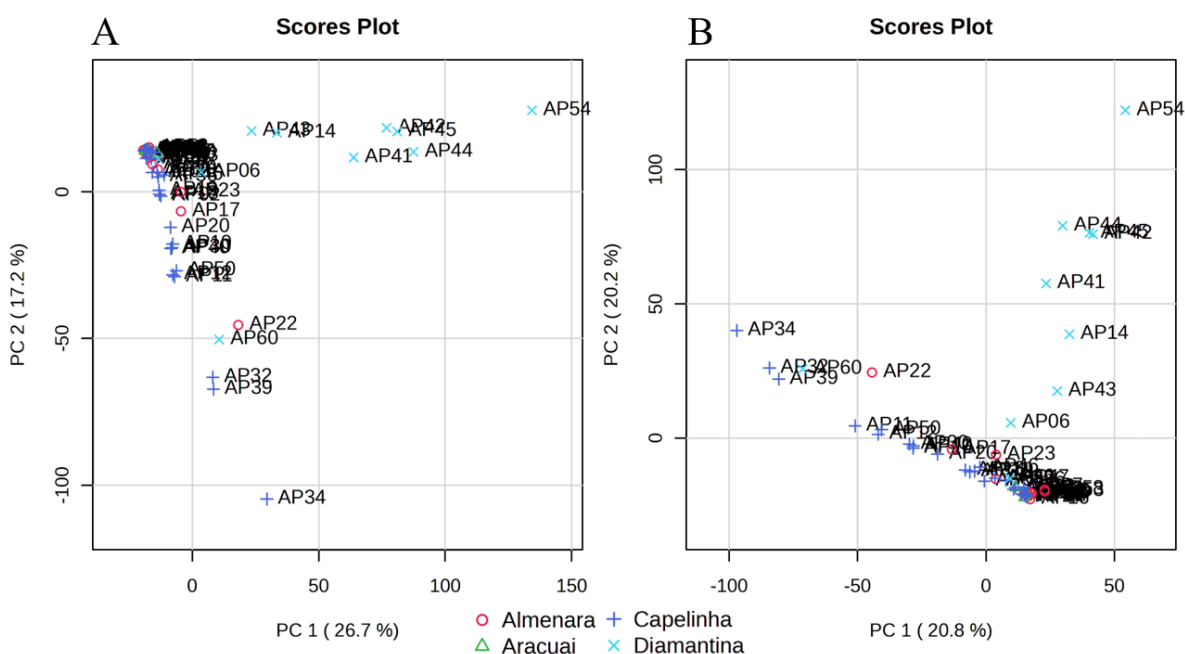
geográfica quanto padrões químicos compartilhados entre as amostras, embora haja pequenas diferenças na distribuição de algumas amostras entre os modos de ionização.

Esses resultados indicam que, mais do que a divisão ampla entre Alto e Baixo Jequitinhonha, fatores associados às microrregiões de origem das amostras parecem exercer maior influência sobre o perfil químico do própolis da região.

4.2.2 Comparação do perfil metabólico por Microrregiões

Considerando os resultados apresentados anteriormente, realizou-se a comparação dos compostos presentes nas amostras quando separadas por microrregiões, incluindo: Almenara, Aracuaí, Capelinha e Diamantina. Foram gerados os gráficos de PCA para os modos de ionização negativo (A) e positivo (B), apresentados na Figura 14.

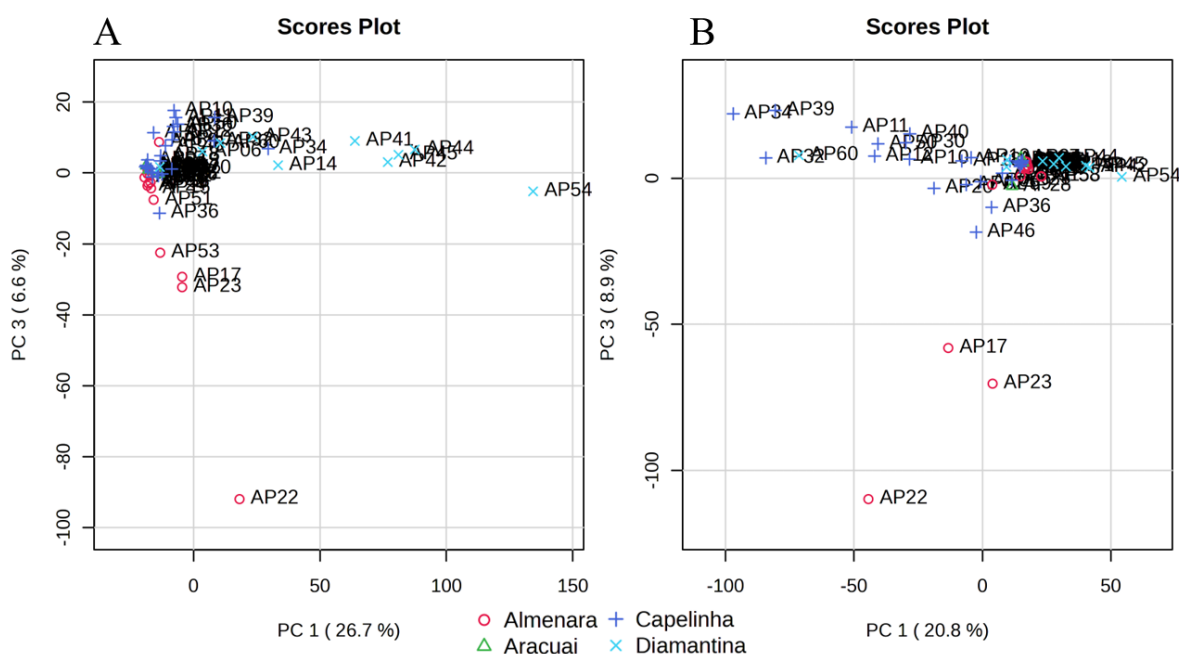
Figura 14: Gráfico de escores da PCA relacionando PC1 vs PC2 para os dados adquiridos no modo negativo (A) e positivo (B) de ionização, na comparação entre as microrregiões de Almenara, Araçuaí, Capelinha e Diamantina. Variância explicada: (A) PC1 = 26,7%, PC2 = 17,2%. (B) PC1 = 20,8%, PC2 = 20,2%.



No modo negativo, observa-se que praticamente todas as amostras provenientes de Diamantina (destacadas em azul ciano) apresentaram valores positivos em PC1 e PC2, indicando um perfil químico característico e distinto para essa microrregião. A maioria dessas amostras foi explicada principalmente pela PC1, com exceção da amostra AP60, que se posicionou no lado positivo de PC1 e negativo de PC2, sendo explicada pela PC2, em conjunto com outras amostras de diferentes localidades, como AP22, AP32, AP34 e AP39. As demais amostras de própolis apresentaram distribuição mais próxima da origem, sem formação de grupos bem definidos.

De forma similar, na PCA do modo positivo, as amostras de Diamantina também se agruparam majoritariamente no lado positivo de PC1 e PC2, com exceção da amostra AP60, que apresentou valor negativo em PC1 e positivo em PC2, repetindo o padrão observado no modo negativo. Esse comportamento reforça a tendência de dispersão para alguns extratos específicos. Com o objetivo de explorar possíveis padrões adicionais, foi avaliada também a PCA combinando PC1 e PC3 para ambos os modos de ionização: negativo (A) e positivo (B), indicada na Figura 15.

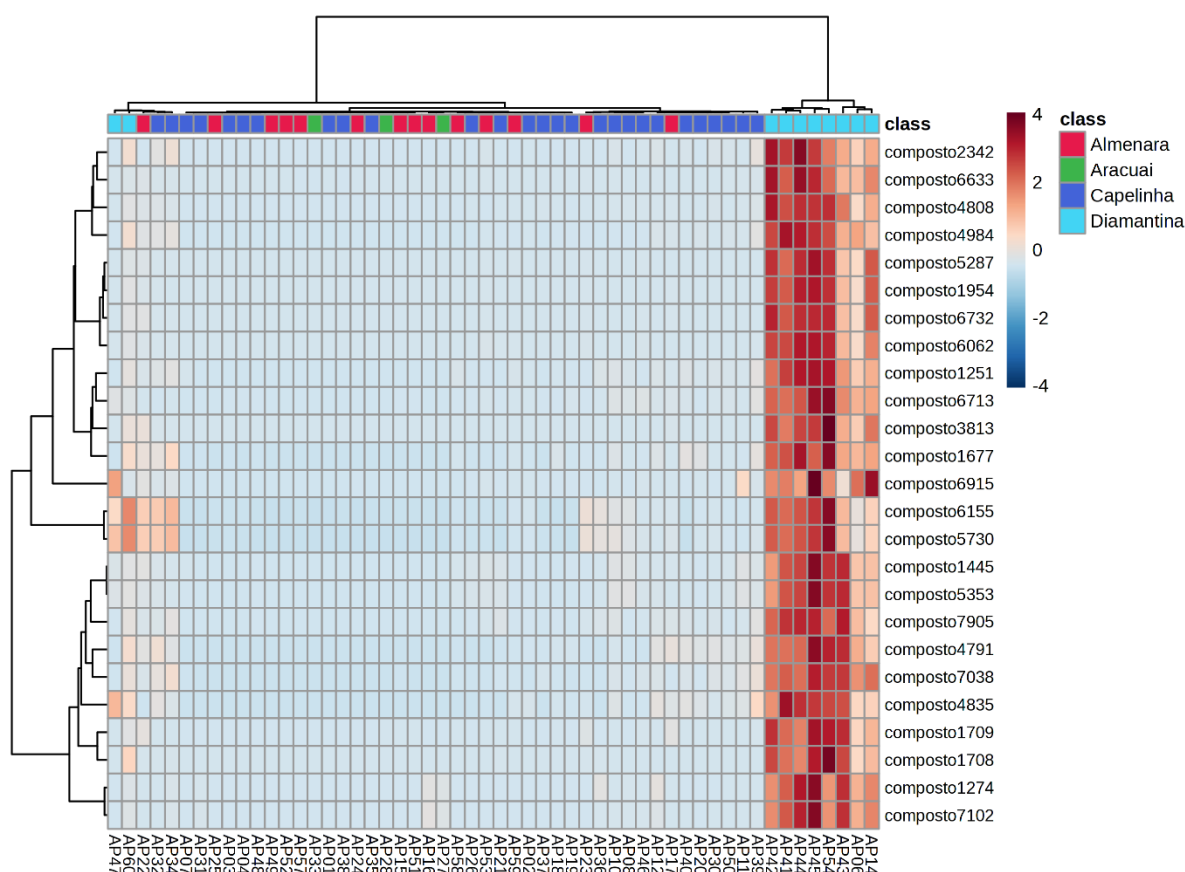
Figura 15: Gráfico de escores da PCA relacionando PC1 vs PC3 para os dados adquiridos no modo negativo (A) e positivo (B) de ionização, na comparação entre as microrregiões de Almenara, Araçuaí, Capelinha e Diamantina. Variância explicada: (A) PC1 = 26,7%, PC3 = 6,6%. (B) PC1 = 20,8%, PC3 = 8,9%.



Na projeção PC1 $\times$ PC3 do modo negativo, destaca-se a separação marcante da amostra AP22, que apresentou valores positivos de PC1 e negativos de PC3, posicionando-se de forma isolada em relação às demais amostras. Um comportamento semelhante foi observado para o modo positivo, em que a mesma amostra se posicionou à parte do agrupamento principal. Além disso, verifica-se que as amostras AP17 e AP23 também se distanciaram consideravelmente das demais, indicando perfis químicos peculiares que podem estar relacionados a outros fatores ou características específicas de sua produção.

Para aprofundar a interpretação dos agrupamentos observados nas análises de PCA, foram construídos também os *heatmaps* para os dados obtidos nos modos de ionização negativo (Figura 16) e positivo (Figura 17).

Figura 16: *Heatmap* das amostras classificadas por microrregião (Almenara, Araçuaí, Capelinha e Diamantina) no modo negativo de ionização.

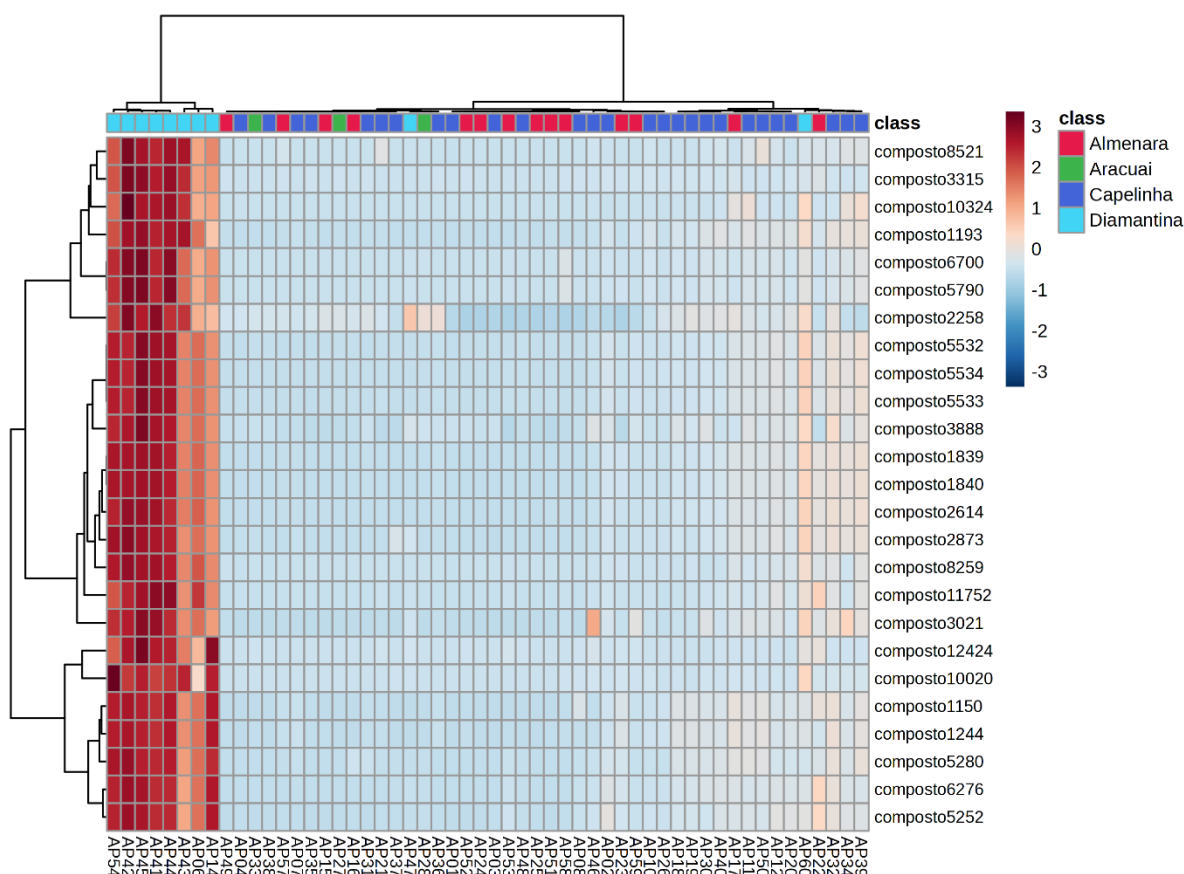


No modo negativo, nota-se que duas amostras de Diamantina, AP47 e AP60, foram alocadas no início do dendrograma, distantes das demais amostras da mesma microrregião, que se agruparam predominantemente no lado direito do dendrograma. Já as amostras provenientes

das demais regiões do Vale do Jequitinhonha não apresentaram um agrupamento bem definido, sugerindo que seus perfis químicos são mais homogêneos entre si ou menos discriminantes para o modelo estatístico utilizado.

Um aspecto relevante é a forte contribuição dos *features* identificados como 6155 e 5730, que exibiram concentrações elevadas não apenas em AP47 e AP60 (Diamantina), mas também em amostras de outras localidades, como AP22, AP32 e AP34, reforçando a hipótese de compostos compartilhados ou de origem botânica semelhante.

Figura 17: *Heatmap* das amostras classificadas por microrregião (Almenara, Araçuaí, Capelinha e Diamantina) no modo positivo de ionização.



No modo positivo, observa-se um padrão parcialmente semelhante: as amostras de Diamantina se agruparam majoritariamente no lado esquerdo do dendrograma, com exceção de AP47, posicionada no centro do dendrograma, e AP60, deslocada para a extremidade esquerda. A distribuição das intensidades no *heatmap* destaca que múltiplos compostos influenciaram de

forma significativa o modelo de agrupamento, evidenciando, em especial, o papel da amostra AP60 na variabilidade geral do conjunto de dados.

Esses resultados reforçam que, mais do que a divisão macro entre Alto e Baixo Jequitinhonha, fatores locais específicos, como a microrregião de origem, exercem maior influência sobre o perfil metabolômico do própolis analisado. Entretanto, essa abordagem geográfica ainda não explica completamente a variabilidade observada em algumas amostras, particularmente em relação ao comportamento atípico de AP47 e AP60, que, embora pertencentes à mesma microrregião, apresentam características químicas distintas das demais amostras locais.

É importante ressaltar que AP47 e AP60 são as únicas amostras provenientes da área urbana de Diamantina, enquanto as demais amostras atribuídas à microrregião de Diamantina (AP41, AP42, AP43, AP44 e AP45), provenientes do município de Felício dos Santos, situam-se em uma área de transição entre Cerrado e Mata Atlântica, mas com forte influência da vegetação campo rupestre. De acordo com o Projeto Arqueológico Alto Jequitinhonha (PAAJ) e os estudos sobre a Área Arqueológica de Serra Negra, esse território apresenta paisagens de altitudes elevadas, solos rasos e vegetação típica de campo rupestre, conhecida por abrigar uma grande diversidade de espécies da família Asteraceae, especialmente do gênero *Baccharis*.¹¹¹ Esse gênero de plantas é de interesse particular, uma vez que espécies como o alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) constituem a principal fonte botânica do própolis verde.

Os resultados obtidos a partir do agrupamento por localização geográfica, seja pela divisão em Alto e Baixo Jequitinhonha, seja pelas microrregiões, não se mostraram suficientes para explicar de forma consistente as variações observadas no perfil químico do própolis analisado. Diante dessa limitação, adotou-se como estratégia complementar a classificação exploratória das amostras com base na coloração do extrato, um critério amplamente utilizado na classificação de própolis.

4.3 Avaliação da coloração

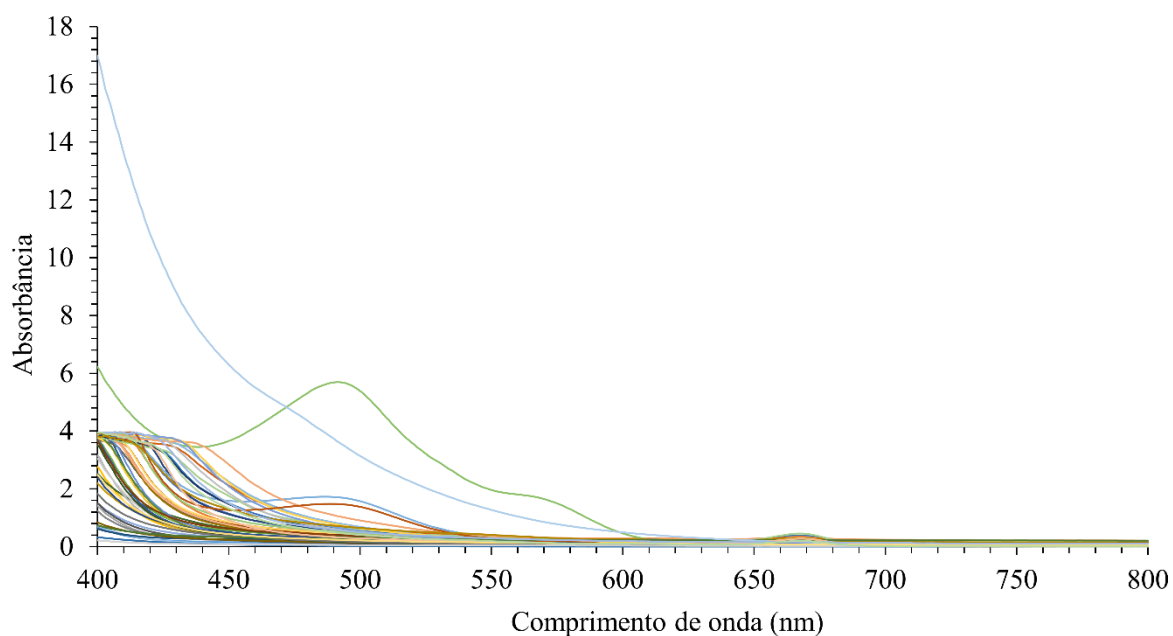
Considerando que a coloração dos própolis é a forma mais comum de se classificar um própolis, escolheu-se essa abordagem para prosseguir com os estudos, já que essa informação

pode agregar comercialmente. Segundo a legislação brasileira, os extratos de própolis devem apresentar bandas na região de 200 a 400 nm, correspondente a absorção de flavonoides. Sabendo que a análise dos própolis somente pelo espectro de absorção molecular na região do ultravioleta forneceriam informações majoritariamente acerca da presença dos núcleos comuns como benzopirona, escolheu-se, neste trabalho, analisar as amostras na região do visível para investigar bandas características associadas à colorações diferentes do própolis, como a região de 630 a 750 nm, relacionada ao própolis verde, e a região entre aproximadamente 450 e 600 nm, correspondente ao própolis vermelho.

Convém enfatizar que, conforme definido pelo Anexo Único da Portaria IMA nº 1603, de 18 de abril de 2016, a denominação de origem “Própolis Verde” refere-se exclusivamente a produtos provenientes de determinados municípios mineiros, oficialmente certificados.¹¹² Nenhuma das amostras deste estudo é oriunda desses municípios, motivo pelo qual não se pretende conferir a elas tal certificação. A designação “verde” é aqui empregada de forma descritiva e hipotética, fundamentada nos resultados obtidos pela espectrofotometria de absorção molecular.

A Figura 18 apresenta os espectros de absorção molecular sobrepostos, obtidos na faixa de 400 a 800 nm. As amostras AP21 e AP53 foram previamente diluídas para adequação à faixa linear do equipamento, 0 a 4 unidades de absorbância, e as intensidades foram posteriormente corrigidas de acordo com o fator de diluição. Em razão desse ajuste, os espectros correspondentes aparecem na Figura 18 com intensidades superiores a 4 AU quando comparados aos demais. Observa-se também que alguns espectros apresentam padrões de absorção diferenciados, com bandas em diferentes comprimentos de onda em relação às demais amostras.

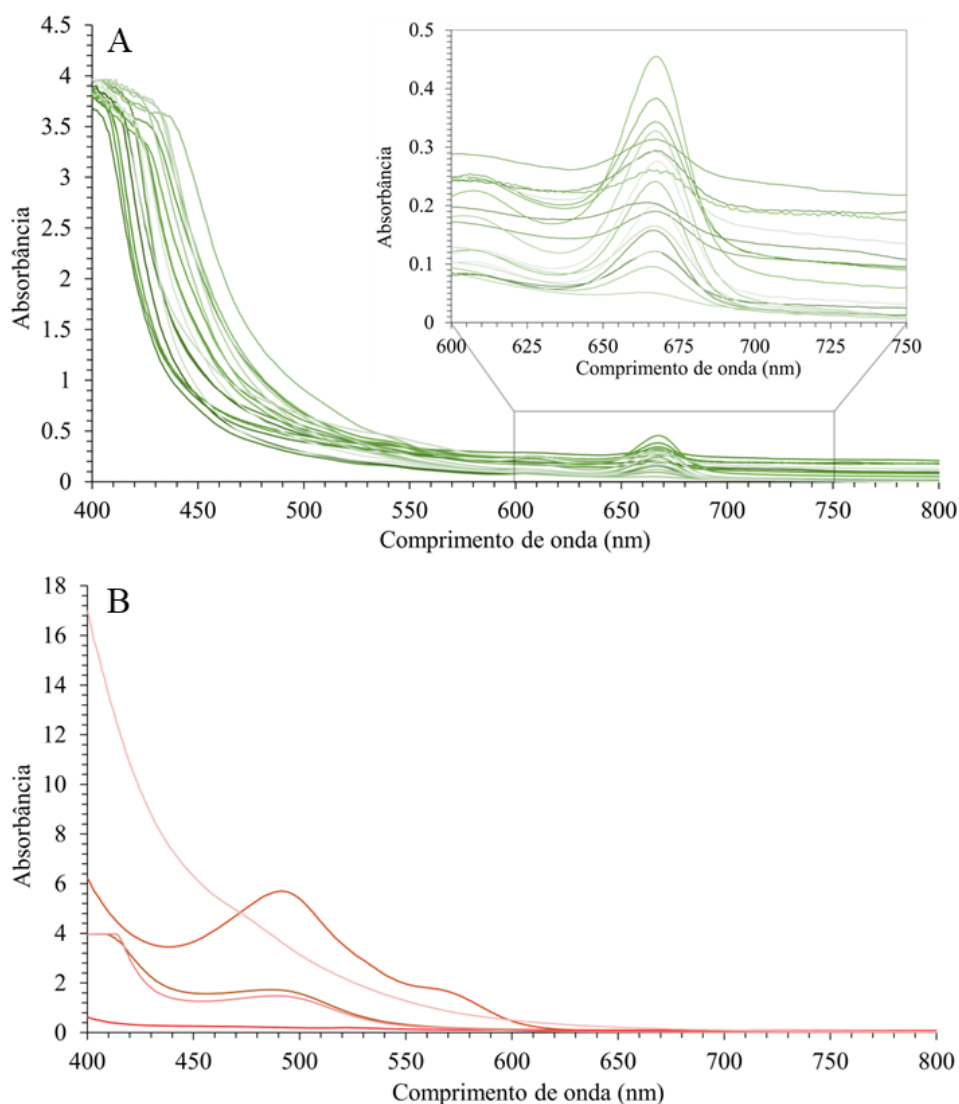
Figura 18: Espectros de absorção molecular na região do visível (400–800 nm) das amostras de própolis analisadas. As amostras AP21 e AP53, apresentadas com absorbâncias mais intensas, foram diluídas e corrigidas pelo fator de diluição.



A Figura 19A mostra espectros selecionados de amostras classificadas como própolis verde, destacando a presença de uma banda de absorção bem definida e concentrada na região de 630 a 700 nm. Em algumas amostras, essa banda se apresenta pouco intensa, motivo pelo qual foi incluído o espectro ampliado para melhor visualização. Nota-se que a maioria das amostras verdes apresenta esse padrão característico.

Já a Figura 19B reúne espectros de amostras de própolis vermelho, que exibem bandas de absorção distintas, geralmente localizadas entre 450 e 600 nm. Diferentemente do observado nas amostras verdes, a intensidade e a posição das bandas variam mais entre as amostras vermelhas, sendo comum a presença de um máximo de absorção próximo a 500 nm.

Figura 19: Espectros selecionados de amostras de própolis verde (A) e vermelho (B), obtidos por espectrofotometria de absorção molecular na região do visível.



Considerando, portanto, as bandas de absorção observadas nos espectros apresentados nas Figura 18 e 19, as amostras foram classificadas preliminarmente em três grupos, com base nas regiões de comprimento de onda características: a faixa entre 630 e 750 nm, associada ao própolis verde, e a faixa entre aproximadamente 450 e 600 nm, relacionada ao própolis vermelho. Assim, as amostras foram organizadas da seguinte forma:

- Própolis verde: AP02, AP06, AP10, AP11, AP14, AP17, AP22, AP23, AP32, AP34, AP39, AP41, AP42, AP43, AP44, AP45, AP50, AP54, AP60.
- Própolis vermelho: AP16, AP21, AP35, AP48, AP53.

- Sem classificação (Outros): AP01, AP03, AP04, AP07, AP08, AP12, AP15, AP18, AP19, AP20, AP24, AP25, AP26, AP27, AP28, AP30, AP31, AP33, AP36, AP37, AP38, AP40, AP46, AP47, AP49, AP51, AP52, AP57, AP58, AP59.

As demais amostras permaneceram agrupadas como Outros, uma vez que não apresentaram padrões de absorção claros ou suficientes para uma classificação conclusiva no contexto deste estudo preliminar.

Com base na classificação preliminar das amostras por meio dos espectros na região do visível, foi conduzida uma análise direcionada nos dados de espectrometria de massas, para verificar a presença de compostos reconhecidos como marcadores de própolis verde e vermelho, conforme descrições na literatura e especificações de produtos disponibilizados por diferentes empresas do setor. Ressalta-se que, além de apresentar determinados compostos fenólicos, o própolis verde genuíno, por exemplo, está necessariamente associado a áreas específicas do estado de Minas Gerais, devido à sua indicação geográfica.

Para apoiar a classificação inicial e refinar as interpretações, compostos de interesse foram selecionados com base em referências técnicas e incluídos no software Skyline, especificando-se a fórmula estrutural, o m/z teórico e o aduto correspondente. A partir disso, foram extraídos os cromatogramas de íons e determinadas as áreas relativas e os tempos de retenção em cada amostra. A confirmação foi complementada pela avaliação dos espectros de fragmentação, considerando níveis de similaridade, padrões de fragmentos e a massa exata, utilizando bases de dados experimentais e ferramentas de predição *in silico*.

Na Tabela 3, são apresentados os compostos de interesse selecionados e atribuídos utilizando o *software* Skyline, considerados marcadores indicativos para os própolis verdes e vermelhos.

Tabela 3: Compostos selecionados como marcadores de própolis verde e vermelho, conforme detectados pelo Skyline. (N/D: não definido)

Tipo de Própolis	Nome	Formula	Massa Exata	<i>m/z</i>	Espécie	Δ ppm	TR (min)
Verde	Ácido cafeico ^{b,113}	C ₉ H ₈ O ₄	180.0422	179.0350	[M-H] ⁻	-0.48	7.707
	Ácido p-cumárico ^c	C ₉ H ₈ O ₃	164.0473	163.0401	[M-H] ⁻	-0.55	8.597
	Ácido 3,5-dicafeoilquínico ^{*b,114}	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516.1268	515.1195	[M-H] ⁻	0.48	9.072
	Rutina ^c	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.1534	609.1461	[M-H] ⁻	1.16	9.474
	Ácido 4,5-dicafeoilquínico ^{*c}	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516.1268	515.1195	[M-H] ⁻	0.51	9.774
	Ácido cinâmico ^c	C ₉ H ₈ O ₂	148.0524	147.0452	[M-H] ⁻	-0.52	8.927
	Quercetina ^c	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.0426	301.0354	[M-H] ⁻	0.98	10.983
	Aromadendrina ^{b,115}	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288.0634	287.0561	[M-H] ⁻	0.51	9.520
	Drupanina ^{b116}	C ₁₄ H ₁₆ O ₃	232.1099	231.1027	[M-H] ⁻	-0.36	11.696
	Crisina ^c	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254.0579	253.0506	[M-H] ⁻	0.47	12.668
	Galangina ^{a,117}	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.0528	269.0455	[M-H] ⁻	0.48	11.771
Vermelho	Artepillin C ^{b,118,119}	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	300.1725	299.1653	[M-H] ⁻	0.26	13.191
	Liquiritigenina ^{*a116}	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	256.0735	255.0663	[M-H] ⁻	0.18	10.327
	Calicosina ^{a120}	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284.0685	283.0612	[M-H] ⁻	-0.99	12.757
	Isoliquiritigenina ^{*a116}	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	256.0735	255.0663	[M-H] ⁻	0.32	12.207
	Formononetina ^c	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	268.0735	267.0663	[M-H] ⁻	0.37	11.812
	Vestitol ^{*a116}	C ₁₆ H ₁₆ O ₄	272.1048	271.0976	[M-H] ⁻	0.16	11.139
	Neovestitol ^{*a116}	C ₁₆ H ₁₆ O ₄	272.1048	271.0976	[M-H] ⁻	0.25	11.503
	Medicarpina ^{b116}	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	270.0892	269.0819	[M-H] ⁻	0.34	13.282
	Biochanina A ^{a116,120}	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284.0685	283.0612	[M-H] ⁻	-1.23	10.739

N/D: não foi possível associar o *m/z* calculado a um pico cromatográfico no Skyline. O valor de Δ ppm corresponde ao maior erro de massa atribuído automaticamente pelo software em cada amostra. **a:** atribuição por massa exata e distribuição isotópica. **b:** atribuição por massa exata, distribuição isotópica e comparação com fragmentação descrita na literatura. **c:** atribuição por massa exata, distribuição isotópica e match com fragmentação pelo MzCloud. *: isômeros (Ácido 3,5-dicafeoilquínico e Ácido 4,5-dicafeoilquínico; Liquiritigenina e Isoiquiritigenina)

Além dos compostos apresentados na Tabela 3, que puderam ter seus picos cromatográficos extraídos e integrados utilizando o Skyline, também foram avaliados outros metabólitos de interesse descritos na literatura para o própolis, como Metilvestitol, Vestitol, Neovestitol, 3-hidroxi-8,9-dimetoxipterocarpano, Gutiferona A, Oblongifolina B e Bacharina. No entanto, não foi possível atribuir picos específicos a esses compostos, principalmente por se tratarem de isômeros estruturais.

Para contornar essa limitação, foram consultadas referências específicas, como o estudo de Silva e colaboradores, que investigou as atividades *in vitro* anti-periodontopatogênicas, anti-Chikungunya e a toxicidade *in vivo* de própolis vermelho brasileiro.¹²¹ Nesse trabalho, os autores descrevem a ordem de eluição de pterocarpanos sob condições cromatográficas similares, o que forneceu subsídios para uma atribuição putativa baseada nos tempos de retenção observados neste estudo. Ainda assim, é importante ressaltar que, por mais que os parâmetros instrumentais não sejam idênticos, essa comparação permitiu uma estimativa preliminar para diferenciar compostos isoméricos. A confirmação definitiva só é possível mediante a injeção de padrões de referência nas mesmas condições instrumentais.

No caso específico de compostos como Metilvestitol, Vestitol, Neovestitol e 3-hidroxi-8,9-dimetoxipterocarpano, todos compartilham o mesmo núcleo pterocarpano e apresentam fragmentação bastante semelhante. Dessa forma, não é possível afirmar com segurança qual estrutura corresponde a cada sinal detectado, sendo viável apenas sugerir possibilidades com base em tempos de retenção e literatura. Portanto, esses compostos foram tratados como candidatos putativos, sem atribuição conclusiva.

De forma semelhante, Gutiferona A e Oblongifolina B, ambos poliprenilados, apresentaram espectros de fragmentação complexos e parcialmente sobrepostos. Já no caso da Bacharina, não foi possível realizar uma atribuição confiável devido à ausência de fragmentos característicos nos espectros obtidos.

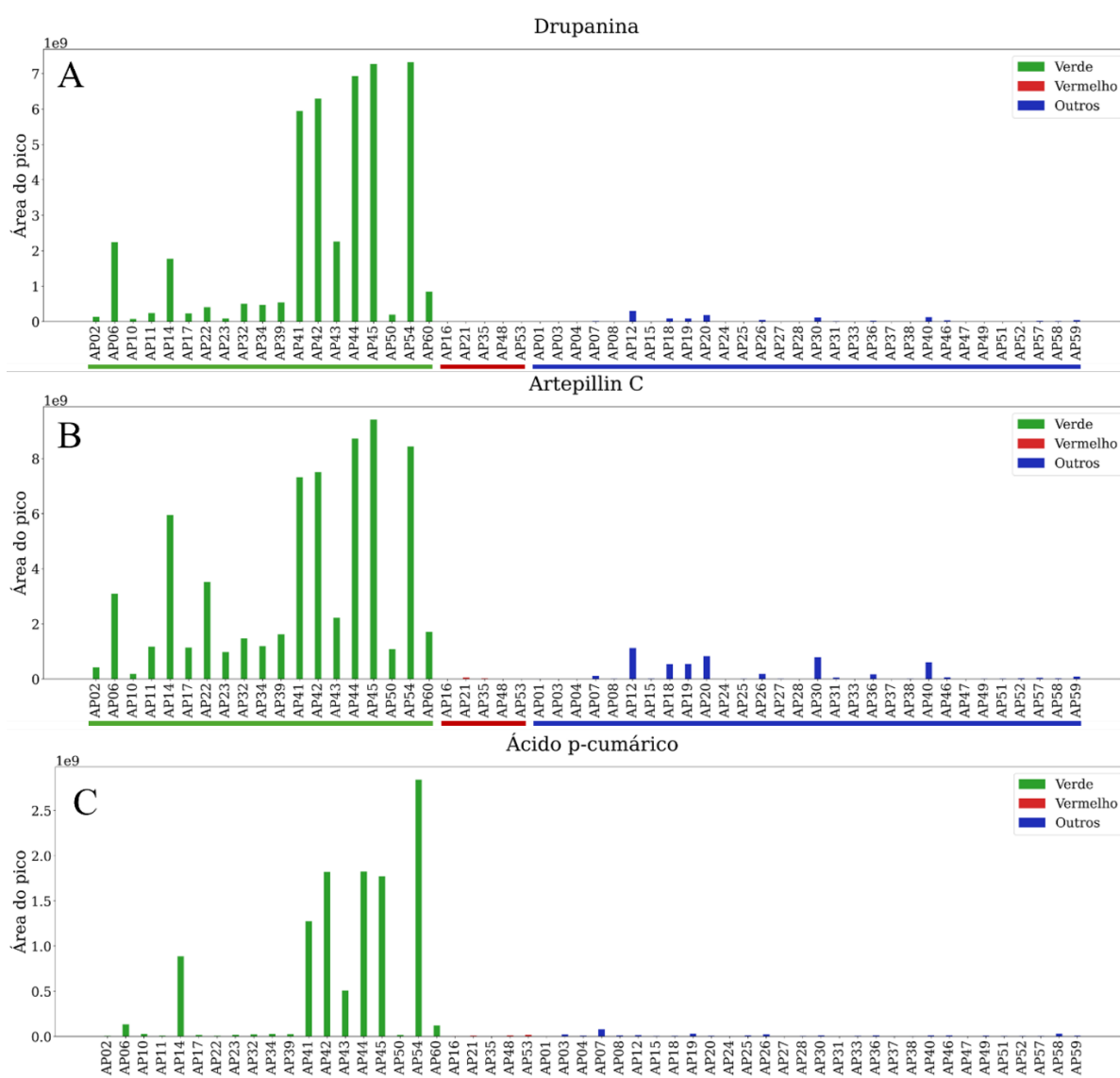
Assim, para esses compostos, não foi realizada nenhuma atribuição conclusiva, sendo recomendada a utilização de padrões analíticos em análises futuras para validação.

Com base nos resultados obtidos, observa-se que, de modo geral, os compostos selecionados como marcadores característicos dos própolis verde e vermelho apresentaram

perfis coerentes com a classificação preliminar proposta a partir dos espectros de absorção na região do visível.

Entre as amostras classificadas como própolis verde, destacam-se aquelas provenientes da microrregião de Diamantina e, especialmente, do município de Felício dos Santos (AP41, AP42, AP43, AP44 e AP45), as quais exibiram, de forma consistente, concentrações elevadas de compostos como Drupanina, Artepillin C e ácido *p*-cumárico, como observado na Figura 20. Todos amplamente relatados na literatura como marcadores do própolis verde oriundo do Alecrim do Campo (*Baccharis dracunculifolia*).

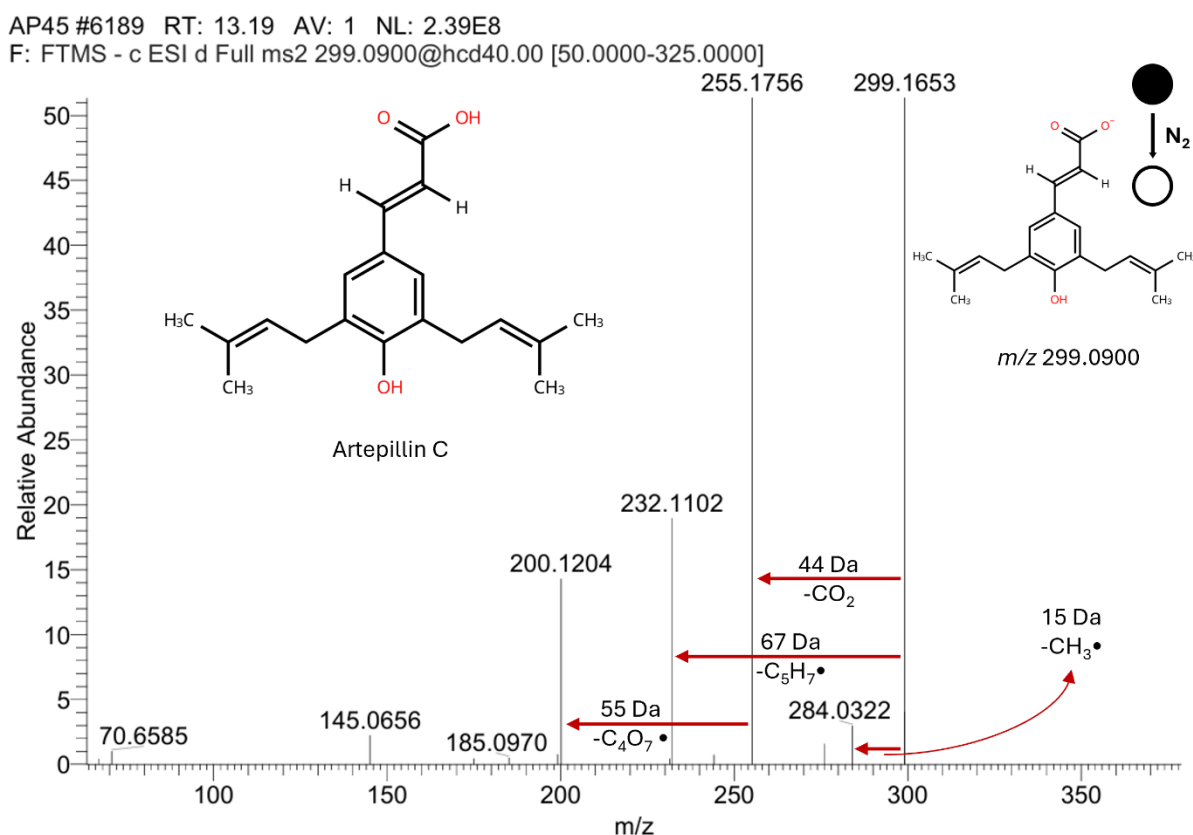
Figura 20: Áreas dos picos de Drupanina (A), Artepillin C (B) e Ácido *p*-cumárico (C) obtidas no modo de ionização negativo para todas as amostras de própolis, separadas entre verde, vermelho e outras.



Observando-se o gráfico do composto Artepillin C (Figura 20B) considerado o principal marcador do própolis verde brasileiro, nota-se que esse composto foi consistentemente detectado em praticamente todas as amostras classificadas como verde. No entanto, não foi possível confirmar sua identidade por meio do espectro de fragmentação, pois não houve correspondência com o banco de dados mzCloud e são raros os espectros de fragmentação públicos disponíveis para esse composto.

Apesar disso, tanto o padrão cromatográfico quanto o m/z observado coincidem com descrições da literatura. Segundo Xu e colaboradores, os principais íons de fragmentação para o Artepillin C ocorrem em 255.1750, 201.1238 e 145.0652,¹¹⁹ enquanto Zhang e colaboradores identificaram fragmentos em 299.8, 255.7 e 200.5.¹¹⁸ Esses valores corroboram o espectro de fragmentação apresentado na Figura 21, referente ao íon 299.0900 da amostra AP45, em que se observa a presença de diversos desses adutos, reforçando a anotação putativa do composto.

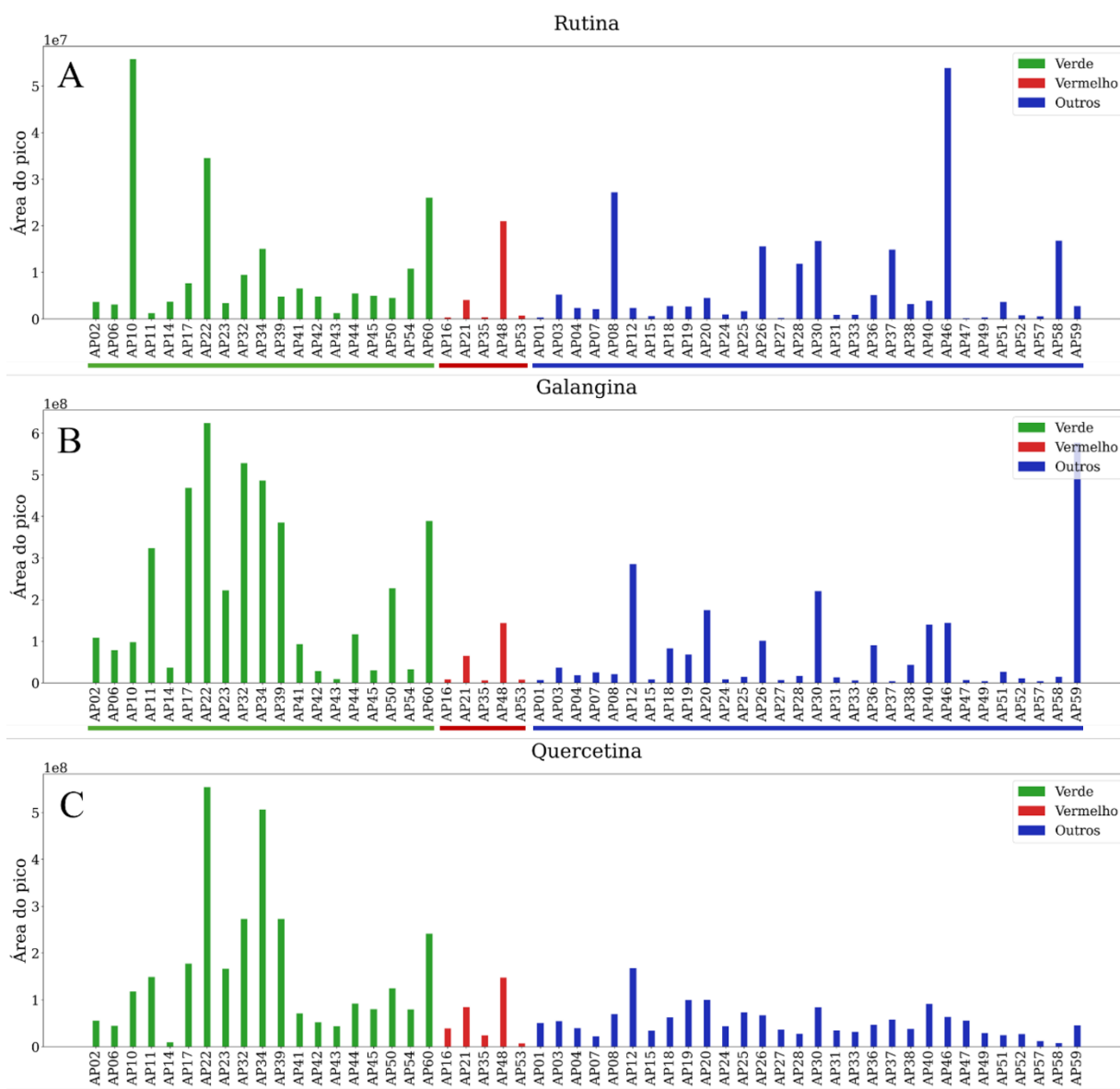
Figura 21: Espectro de fragmentação do íon de m/z 299.0900, atribuído ao Artepillin C, obtido em modo negativo para a amostra AP45.



O ácido *p*-cumárico (Figura 20C), outro marcador importante, evidenciou maior concentração especificamente nas amostras da microrregião de Diamantina, reforçando a hipótese de influência da vegetação local de campo rupestre, rica em *Asteraceae*, sobre o perfil químico, como evidenciado por Amaral e colaboradores.¹²² Curiosamente, a amostra AP47, ainda que originária da mesma microrregião, apresentou valores muito inferiores, corroborando o resultado observado pela espectrofotometria, que não indicou bandas típicas do própolis verde para essa amostra.

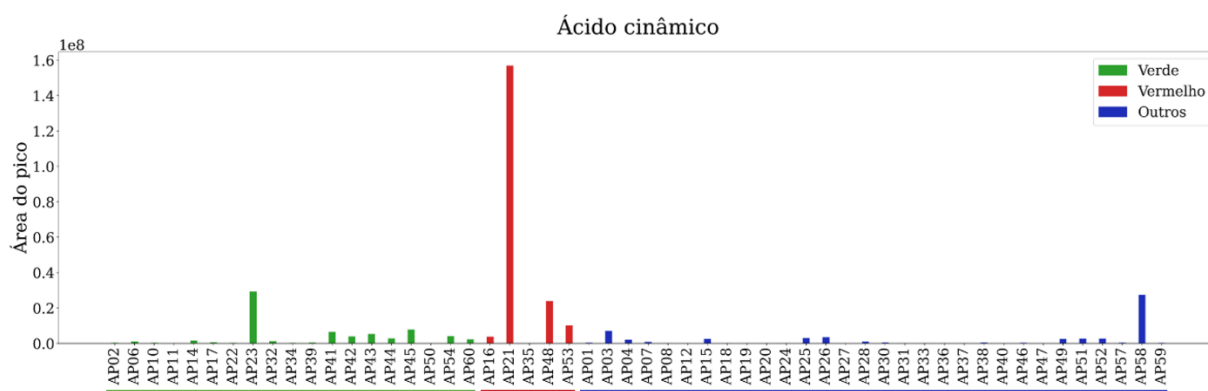
Contudo, alguns flavonóides, como rutina, galangina e quercetina, mostraram-se também presentes em amostras classificadas como própolis vermelho e as sem classificação definida, pois são metabólitos comuns em diversas espécies vegetais e não exclusivos da planta fonte do própolis verde, justificando sua ocorrência mais difusa, como visto na Figura 22. Além disso, esses flavonoides são conhecidos por diversas atividades benéficas à saúde, incluindo ação antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e de fortalecimento imunológico.¹²³

Figura 22: Áreas dos picos de rutina (A), galangina (B) e quercetina (C) obtidas no modo de ionização negativo para todas as amostras de própolis, separadas entre verde, vermelho e outras.



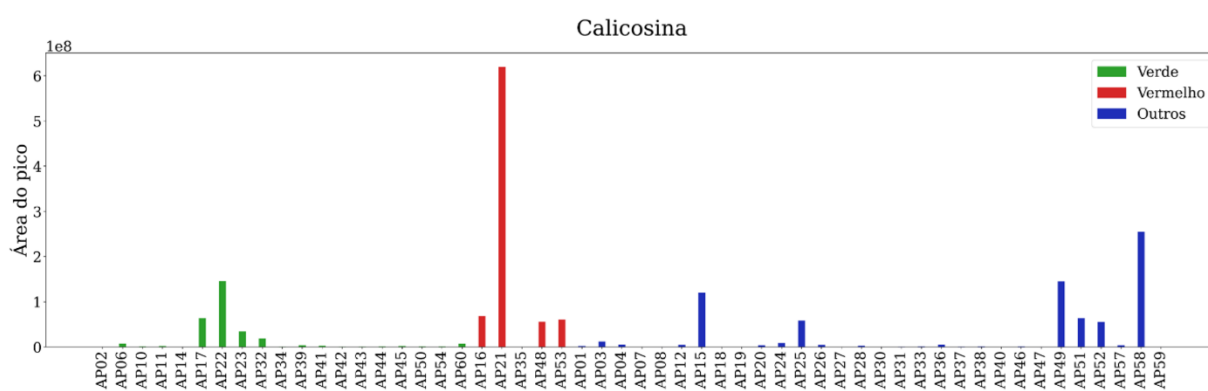
Por outro lado, o ácido cinâmico apresentou um padrão divergente do esperado: embora descrito como comum em própolis verde, foi detectado em maiores concentrações nos própolis classificados como vermelhos, como visto na Figura 23, e ainda apresentando concentração muito elevada na amostra AP21.

Figura 23: Área do pico de ácido cinâmico obtida no modo de ionização negativo para todas as amostras de própolis, separadas entre verde, vermelho e outras.



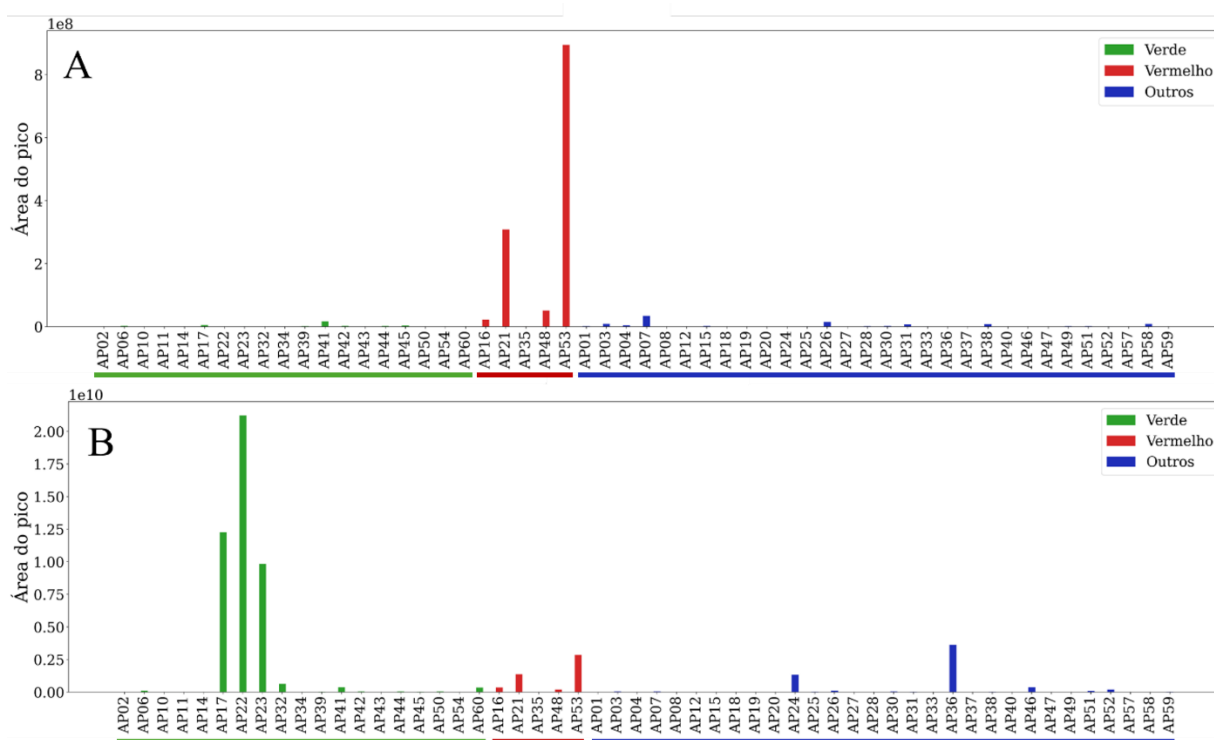
Entre os compostos tradicionalmente associados ao própolis vermelho, como calicosina, liquiritigenina, isoliquiritigenina, vestitol, medicarpina e gutiferona A, observou-se uma distribuição mais variável. A calicosina, cuja área do pico detectada em cada amostra está representada na Figura 24, apresentou presença consistente nas amostras classificadas como vermelhas, mas também foi detectada em concentrações relevantes em algumas amostras verdes (AP06, AP17, AP22, AP23, AP32) e em própolis sem classificação (AP49, AP58), sugerindo possível influência de fontes vegetais secundárias ou coletas mistas.

Figura 24: Área do pico de calicosina obtida no modo de ionização negativo para todas as amostras de própolis, separadas entre verde, vermelho e outras.



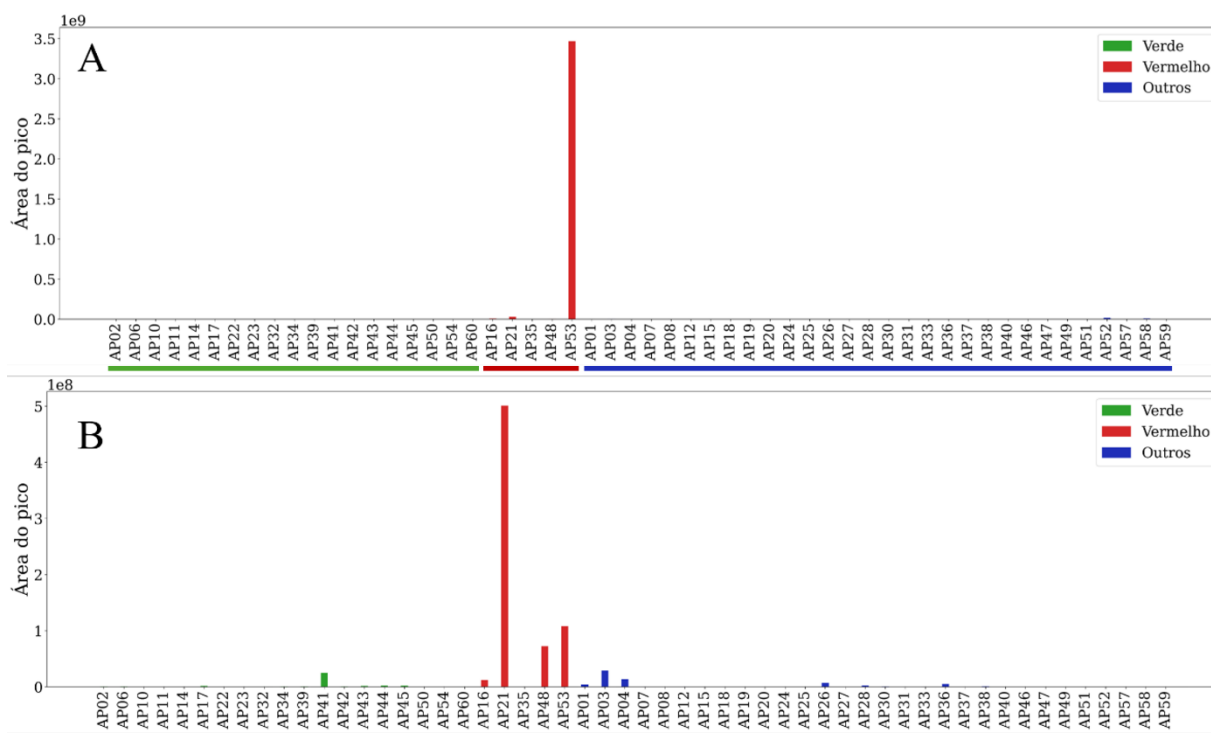
A liquiritigenina e sua forma isomérica, a isoliquiritigenina (Figura 25 A e B, respectivamente), mostraram-se concentradas principalmente nas amostras vermelhas, mas também com detecções pontuais em própolis verdes e sem classificação, reforçando a dificuldade de discriminação de isômeros sem uso de padrões.

Figura 25: Áreas dos picos de liquiritigenina (A) e isoliquiritigenina (B) obtidas no modo de ionização negativo para todas as amostras de própolis, separadas entre verde, vermelho e outras. Anotação putativa baseada na literatura.



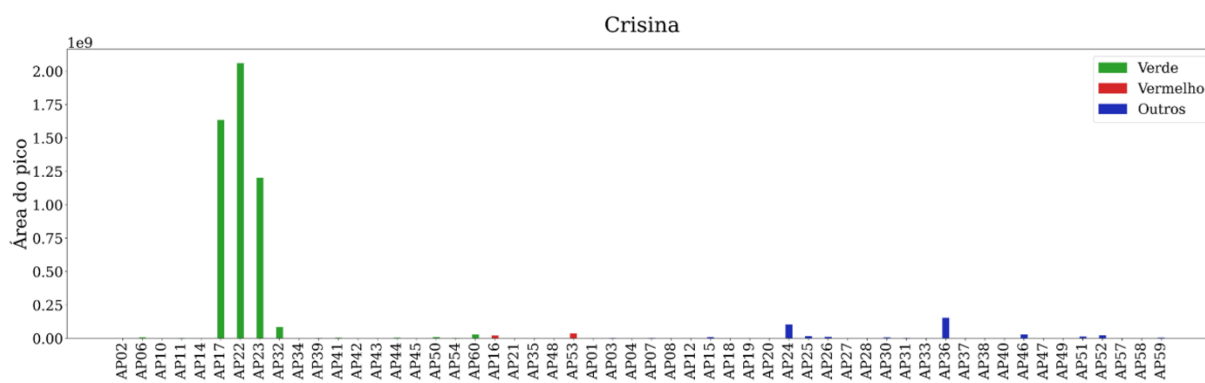
O vestitol (Figura 26A), um marcador clássico do própolis vermelho, destacou-se pela altíssima concentração na amostra AP53, enquanto o neovestitol (Figura 26B) foi mais abundante em AP21, mas também esteve presente em outros extratos vermelhos e, pontualmente, em amostras dos outros grupos. Estudos recentes demonstraram que ambos os compostos apresentam expressiva atividade antiviral, com taxas de inibição superiores a 90% em modelos experimentais, um resultado promissor frente a outros compostos naturais já testados, o que destaca o potencial funcional desses isômeros nessas amostras de própolis.¹²¹

Figura 26: Áreas dos picos de vestitol (A) e neovestitol (B) obtidas no modo de ionização negativo para todas as amostras de própolis, separadas entre verde, vermelho e outras. Anotação putativa baseada na literatura.



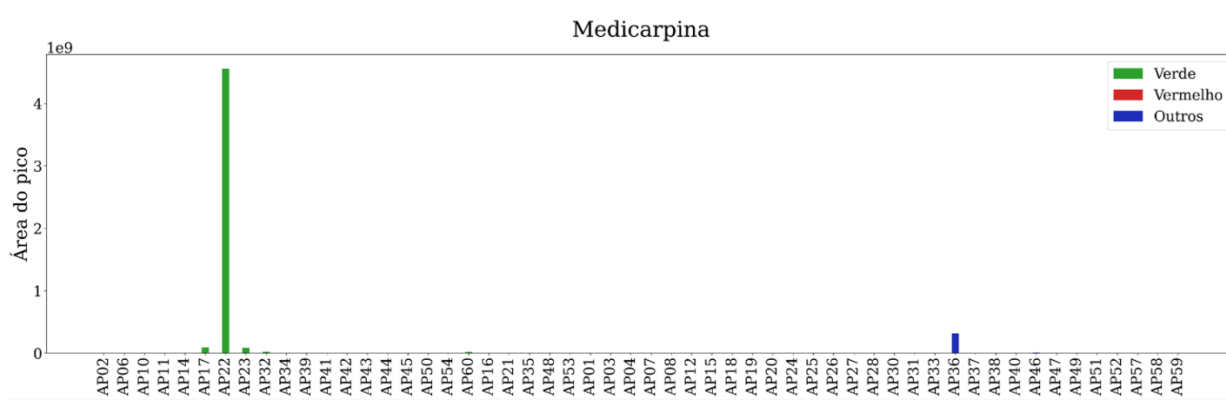
A crisina (Figura 27), comumente descrita em própolis verde, apresentou comportamento restrito: concentrou-se em algumas amostras verdes específicas (AP17, AP22, AP23), enquanto esteve ausente ou em níveis muito baixos em outros extratos. Esse padrão restrito, sem correlação geográfica evidente entre as amostras, indica que, até o momento, não é possível explicar o motivo dessa distribuição. Embora a crisina apresente baixa biodisponibilidade em humanos, estudos recentes destacam que sua formulação em cápsulas potencializa efeitos bioativos, especialmente propriedades anticarcinogênicas, além de ações antioxidante, antidiabética, antimicrobiana e neuroprotetora.¹²⁴

Figura 27: Área do pico de crisina obtida no modo de ionização negativo para todas as amostras de própolis, separadas entre verde, vermelho e outras.



Outro resultado relevante foi a medicarpina (Figura 28), um composto do própolis vermelho, que apresentou concentrações inusitadamente altas na amostra AP22, classificada como verde, além de níveis baixos em AP17, AP23 e AP36. Esse resultado reforça a hipótese de coleta mista de resinas. Aldana-Mejía e colaboradores destacaram a presença de medicarpina como composto relevante do própolis vermelho, indicando ainda que esse metabólito possui atividade contra linhagens celulares cancerígenas e eficácia contra *Cryptococcus neoformans*, levedura que pode causar doenças, especialmente em hospedeiros imunocomprometidos.¹¹

Figura 28: Área do pico de medicarpina obtida no modo de ionização negativo para todas as amostras de própolis, separadas entre verde, vermelho e outras.

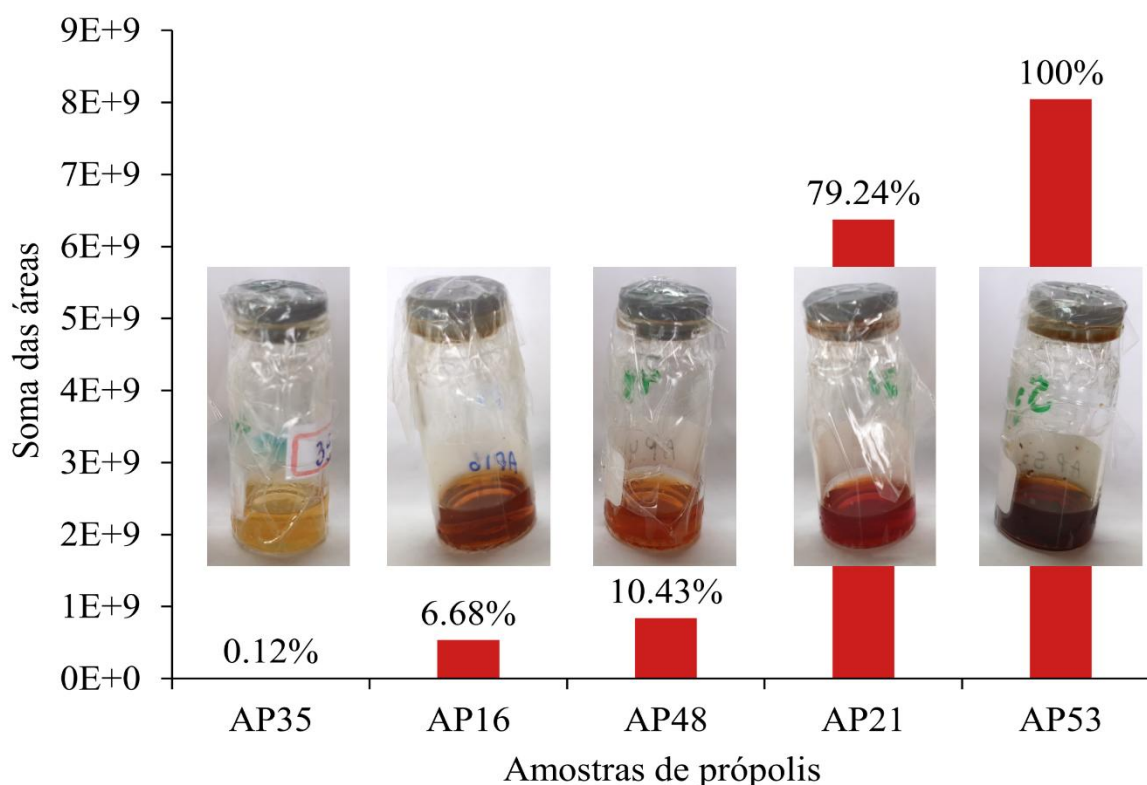


Apesar de terem sido classificadas como própolis vermelho com base nas bandas de absorção detectadas por espectrofotometria de absorção molecular na região do visível, as amostras AP16, AP35 e AP48 apresentaram concentrações consideravelmente mais baixas dos compostos marcadores típicos dessa tipologia quando comparadas às amostras AP21 e AP53.

Considerando a soma das áreas dos principais metabólitos característicos do própolis vermelho, verifica-se que AP16 e AP48 atingiram apenas cerca de 6,7% e 10,4%, respectivamente, do total registrado para AP53, enquanto AP21 alcançou aproximadamente 79,2% e AP35 ficou restrita a apenas 0,13%, evidenciando uma quantidade praticamente residual.

Para ilustrar essa discrepância, a Figura 29 apresenta fotos dos extratos etanólicos obtidos para cada uma dessas amostras e o gráfico de barras comparativo das somas das áreas obtidas para cada composto em relação às amostras. Observa-se que os extratos de AP21 e AP53 exibem coloração intensamente vermelha, compatível com o perfil químico detectado, enquanto AP16, AP35 e AP48 apresentam tonalidades mais alaranjadas ou avermelhadas, reforçando que a cor isoladamente pode não ser um indicador confiável da tipologia química.

Figura 29: Gráfico de barras das somas das áreas relativas dos compostos selecionados nas amostras de própolis AP35, AP16, AP48, AP21 e AP53, e imagens dos respectivos extratos etanólicos.



Em síntese, os resultados obtidos confirmam que a análise espectral na região do visível, embora limitada, pode fornecer indícios confiáveis sobre a tipologia do própolis quando combinada com a detecção de marcadores químicos por LC-MS. As diferenças observadas

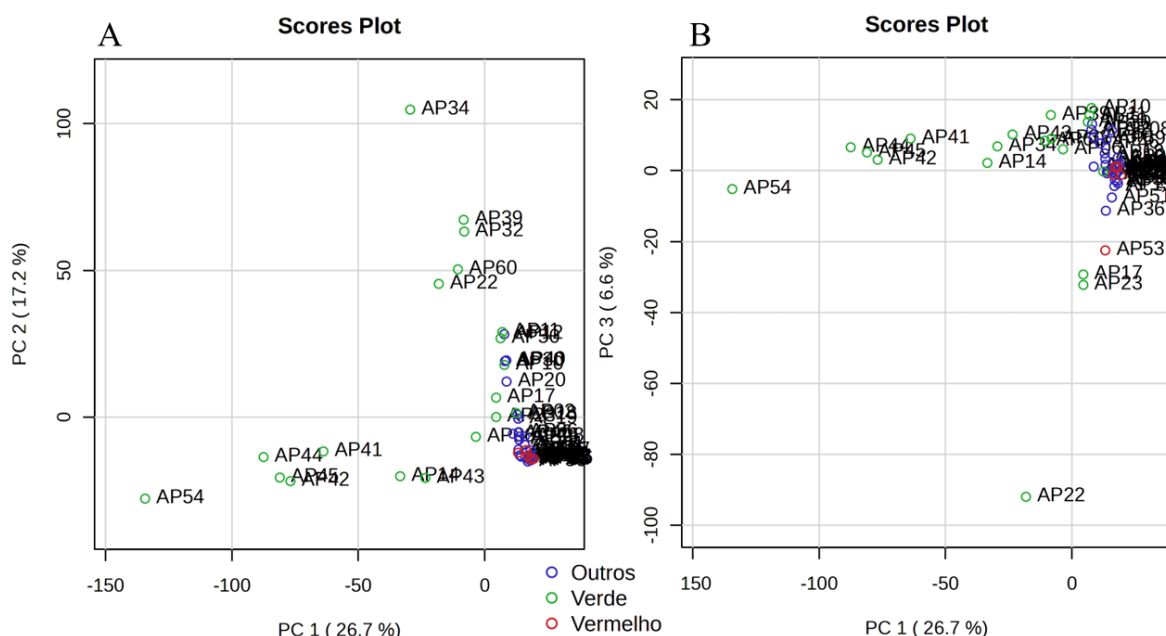
entre as amostras refletem a variabilidade natural do própolis, em função de suas múltiplas origens botânicas. Além disso, a atribuição de isômeros constitui um desafio inerente às análises por espectrometria de massas, sendo necessária a utilização de padrões de referência para alcançar confirmações conforme os níveis de anotação.

4.4 Comparação do perfil metabólico por coloração

Antes de apresentar os resultados detalhados, é importante ressaltar que a análise estatística multivariada foi repetida utilizando os mesmos dados de metabolômica global previamente empregados para a avaliação por agrupamentos geográficos (Alto e Baixo Jequitinhonha e microrregiões). Nesta etapa, porém, as amostras foram reagrupadas em três categorias baseadas na coloração observada nos extratos e nos espectros da região do visível: Verde, Vermelho e Outros (ou seja, amostras sem classificação definitiva de cor). Essa nova organização teve como objetivo explorar potenciais padrões químicos relacionados à coloração, verificando se os compostos detectados por LC-MS corroboram a tipificação cromática sugerida.

Com a reclassificação das amostras em Verde, Vermelho e Outros, tornou-se possível explorar como a coloração aparente se reflete no perfil metabolômico obtido por LC-MS. No modo negativo, apresentado na Figura 30A, a PCA evidenciou que as amostras classificadas como própolis vermelho, assim como a maioria das sem classificação (Outros), concentraram-se majoritariamente no lado positivo da PC1. Em contrapartida, o grupo de amostras verdes, especialmente aquelas provenientes de Felício dos Santos (AP41, AP42, AP43, AP44, AP45) e de Senador Modestino Gonçalves (AP54), situou-se predominantemente no lado negativo de PC1 e PC2, revelando um perfil químico relativamente mais homogêneo. Ao se observar a projeção PC1 vs PC3 (Figura 30B), destaca-se o isolamento da amostra AP22, posicionada de forma marcante no extremo negativo de PC3, o que sugere um comportamento químico atípico frente às demais.

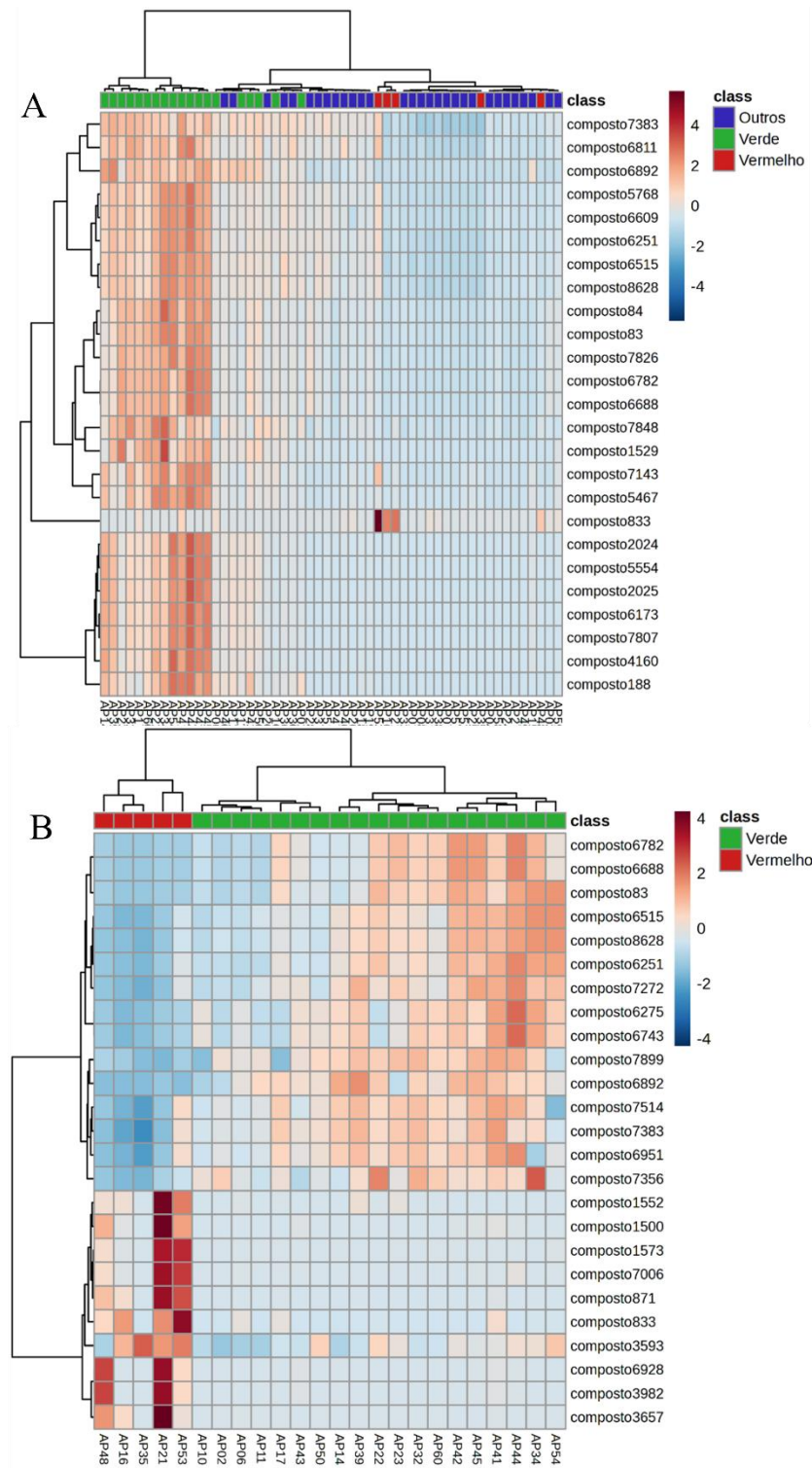
Figura 30: Gráfico de escores da PCA relacionando PC1 vs PC2 (A) e PC1 vs PC3 (B) para os dados adquiridos no modo negativo de ionização. Variância explicada: PC1 = 26,7%, PC2 = 17,2%, PC3 = 6,6%.



O *heatmap* correspondente, apresentado na Figura 31A, corrobora essa tendência. Nota-se que as amostras de própolis verde formaram um agrupamento coeso à esquerda do dendrograma, com exceções pontuais de amostras classificadas como Outros, como AP12 e AP40, inseridas entre os verdes, além de algumas amostras verdes (AP11, AP43 e AP50) que apresentaram leve dispersão fora do cluster principal. Entre os própolis vermelhos, observou-se um bloco relativamente compacto, composto por AP16, AP21 e AP53, com destaque para a amostra AP48, que concentrou níveis elevados do composto 833, indicando potencial relevância discriminante para este grupo.

Quando o *heatmap* é restrito apenas às amostras Verde e Vermelho (Figura 31B), a separação entre os grupos torna-se ainda mais evidente, com cada tipologia bem delimitada em cluster próprio. Além disso, embora a amostra AP35 tenha apresentado quantidades muito baixas dos compostos característicos do própolis vermelho (Figura 29), o *heatmap* mostra que ela compartilha pelo menos um composto em comum com as demais amostras desse grupo, como o composto 3593. Isso sugere que, apesar da baixa intensidade global, AP35 pode apresentar alguma similaridade química com os própolis vermelhos, além de somente a coloração e espectros de absorção molecular parecidos.

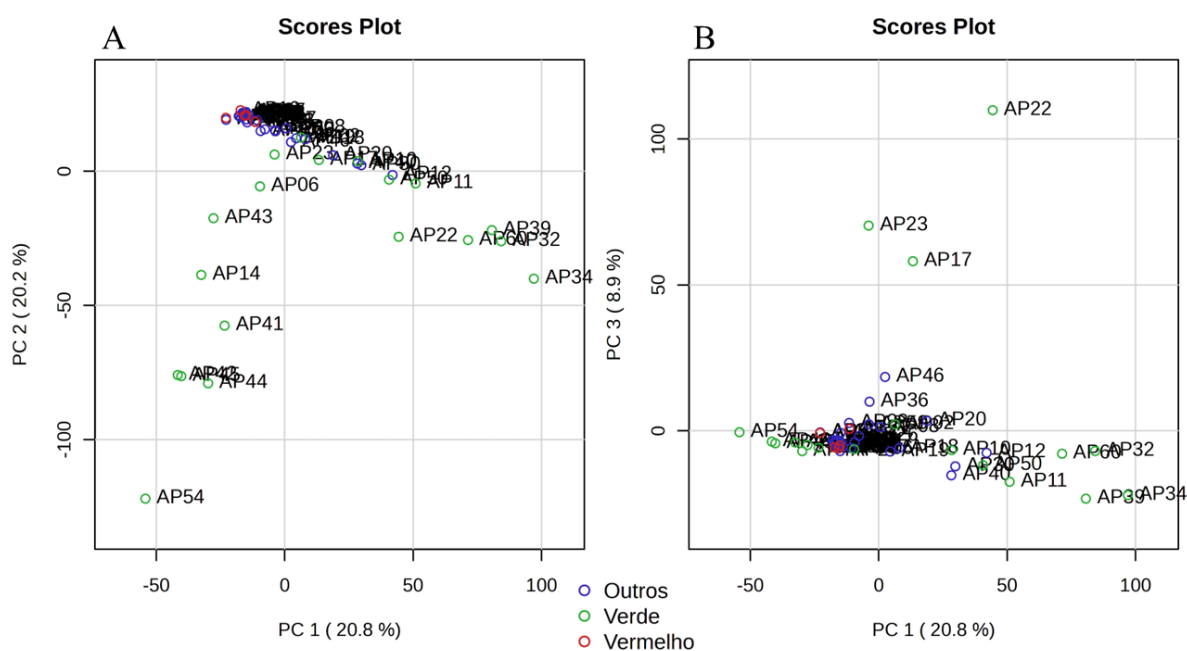
Figura 31: *Heatmap* do agrupamento considerando amostras verde, vermelho e outras (A) e somente verde e vermelho (B) para os dados do modo negativo de ionização.



No modo positivo, ilustrado na Figura 32A, a PCA seguiu o mesmo padrão observado no modo negativo, com algumas observações complementares. As amostras classificadas como

própolis verde, especialmente aquelas de Diamantina, mantiveram-se relativamente agrupadas na região negativa de PC1, destacando a coesão química dentro deste grupo. Em contrapartida, as amostras classificadas como Vermelho posicionaram-se preferencialmente no lado positivo de PC2, formando um agrupamento mais coeso quando consideradas sem as amostras Outros. Ainda assim, algumas amostras verdes (AP06 e AP60, ambas de Diamantina) apareceram dispersas entre os grupos, reforçando a influência de variações locais na composição química. A projeção PC1 vs PC3 (B) mostrou novamente o afastamento das amostras AP17, AP22 e AP23, que se posicionaram de forma isolada no lado positivo de PC3, sugerindo perfis específicos dentro do conjunto de amostras verdes.

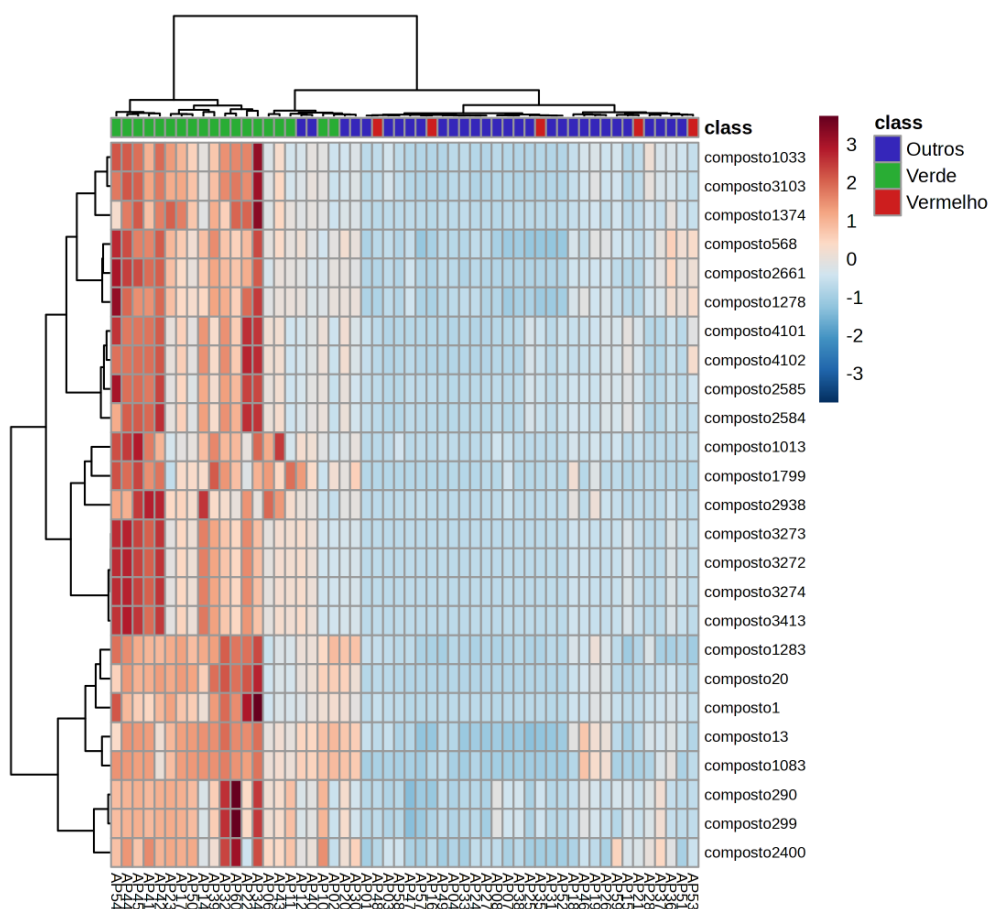
Figura 32: Gráfico de escores da PCA relacionando PC1 vs PC2 (A) e PC1 vs PC3 (B) para os dados do modo positivo de ionização. Variância explicada: PC1 = 20.8%, PC2 = 20.2%, PC3 = 8.9%. Amostras de própolis classificadas como verde, vermelho e outras.



O *heatmap* para o modo positivo, apresentado na Figura 33, complementa a análise multivariada ao revelar padrões de abundância para os compostos mais relevantes. Observa-se que praticamente todas as amostras de própolis verde agruparam-se coesas à direita do dendrograma, embora AP12 e AP40 (ambas classificadas como Outros) tenham sido intercaladas entre as verdes, assim como AP10 e AP02 (própolis verde) que se dispersaram marginalmente. As amostras classificadas como própolis vermelho exibiram maior dispersão entre os demais grupos, mas com um cluster bem definido no conjunto restrito apenas a verde

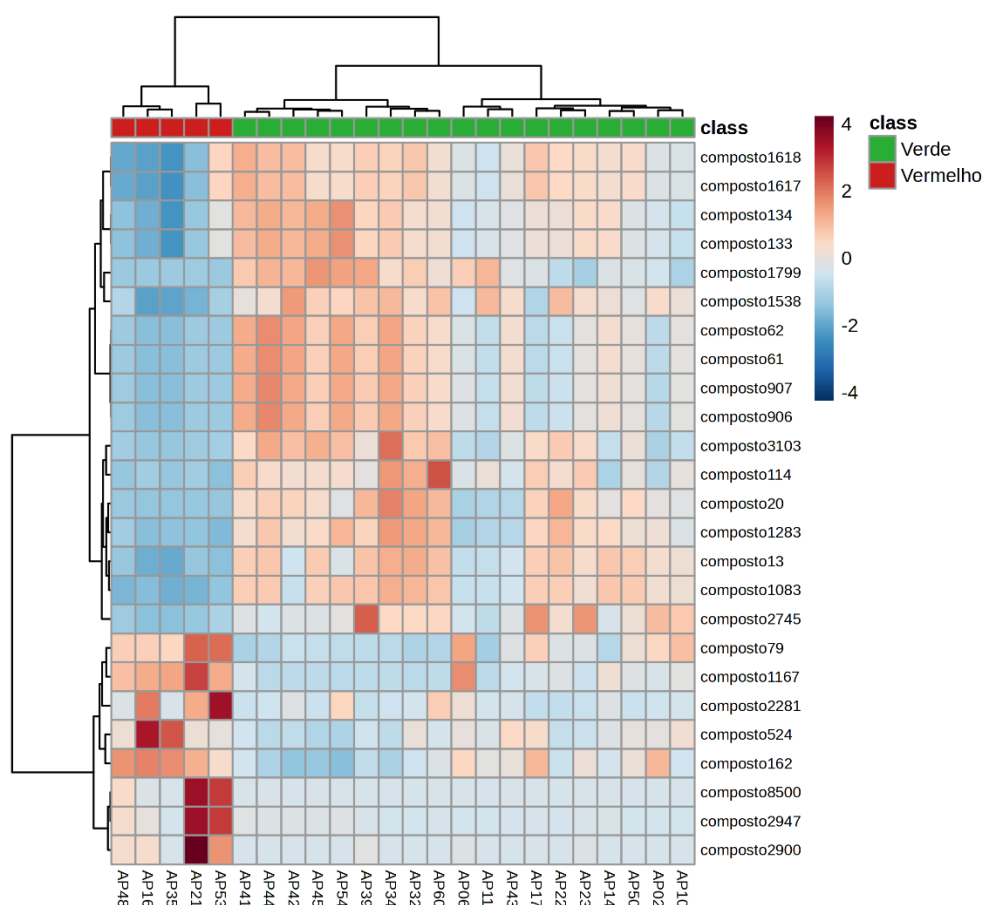
e vermelho. Neste recorte, destaca-se a forte influência de compostos específicos, como os 8500, 2947 e 2900, que se apresentaram em níveis expressivos nas amostras AP21 e AP53, com presença moderada em AP16, AP35 e AP48, reforçando o padrão químico associado ao própolis vermelho.

Figura 33: *Heatmap* do agrupamento considerando amostras verde, vermelho e outras para os dados do modo positivo de ionização.



Quando o *heatmap* é restrito apenas às amostras classificadas como Verde e Vermelho (Figura 34) a separação entre os grupos torna-se ainda mais clara, reproduzindo o padrão observado no modo negativo, com cada tipologia bem definida em cluster próprio.

Figura 34: *Heatmap* do agrupamento considerando apenas amostras verde e vermelho para os dados do modo positivo de ionização.

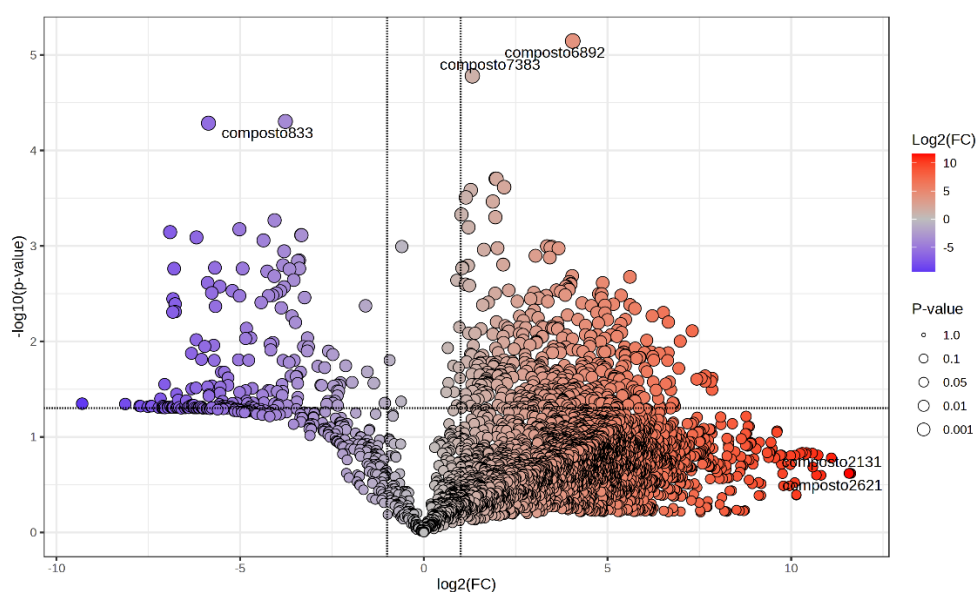


Além das análises multivariadas, foi conduzida uma avaliação univariada por meio do *Volcano Plot*, aplicada aos dados de ambos os modos de ionização, considerando apenas as amostras classificadas como Verde e Vermelho, portanto, excluindo o grupo Outros (pois o *volcano plot* só permite comparação entre dois grupos). Os parâmetros utilizados para a construção dos gráficos de *Volcano Plot* foram: análise não pareada, *threshold* de *fold change* (FC) de 2.0, direção de comparação definida como Verde/Vermelho, teste estatístico paramétrico, p-valor limite de 0,05 e variância entre grupos tratada como não igual.

Observando os *Volcano Plots* obtidos para os dados nos modos de ionização negativo e positivo (Figuras 35 e 36, respectivamente), nota-se que ambos os gráficos evidenciam um número expressivo de *features* importantes entre os grupos Verde e Vermelho. Em ambos os modos, o lado direito dos gráficos (região de valores positivos de $\log_2(\text{FC})$, em vermelho) concentra os íons mais característicos nos própolis classificados como Verde, enquanto o lado

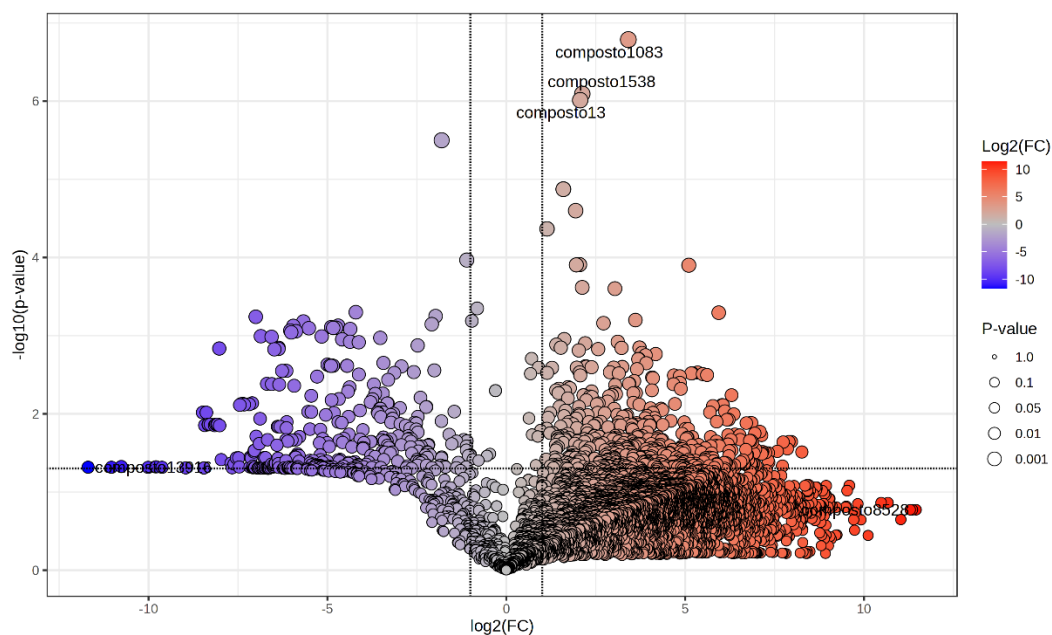
esquerdo (valores negativos de $\log_2(\text{FC})$, em azul) destaca os compostos mais característicos no própolis Vermelho.

Figura 35: *Volcano plot* obtido para os dados no modo de ionização negativo. Comparação entre amostras classificadas como verde e vermelho.



Embora o padrão geral seja consistente com predominância de compostos característicos do Verde, é interessante notar que o modo positivo apresentou uma variação de *fold change* mais acentuada e maior número absoluto de features significativos (344 mais influentes no vermelho e 515 no verde), em comparação com o negativo (191 e 480, respectivamente).

Figura 36: *Volcano plot* obtido para os dados no modo de ionização positivo. Comparação entre amostras classificadas como verde e vermelho.



Esperava-se uma maior eficiência de ionização dos compostos no modo negativo, visto que amostras de própolis em geral apresentam maior resposta para ácidos fenólicos e derivados de ácidos cafeoilquínicos nesse modo. No entanto, observou-se que o modo positivo apresentou não apenas um número maior de *features* detectados, mas também uma amplitude de *fold change* mais pronunciada entre as classes Verde e Vermelho. Essa dispersão mais ampla sugere a possível presença de flavonoides prenilados, isoflavonoides e outros metabólitos semi-polares de caráter levemente básico, que tendem a ser melhor ionizados no modo positivo e podem ter contribuído para o resultado observado.

5. CONCLUSÕES

Este estudo piloto permitiu uma avaliação inicial da composição química do própolis do Vale do Jequitinhonha, ainda pouco estudado cientificamente. Embora o objetivo inicial do presente trabalho fosse identificar padrões geográficos que influenciassem o perfil químico das amostras, as análises indicaram que, com exceção das amostras de Felício dos Santos e Diamantina, a região de coleta não foi determinante para a discriminação dos perfis metabólicos.

A classificação das amostras com base na coloração dos extratos e nos espectros de absorção na região visível mostrou-se mais eficaz para agrupar amostras com características químicas semelhantes, revelando a presença de bandas características de própolis verde e vermelho mesmo em amostras fora das áreas oficialmente associadas a esses tipos. Essa análise permitiu detectar diferenças claras nas abundâncias de diversos metabólitos entre os própolis classificados como verdes e vermelhos, incluindo compostos já reconhecidos como marcadores desses tipos na literatura. Foram tentativamente identificados, por exemplo, compostos como vestitol e neovestitol nas amostras classificadas como vermelho, e Artepillin C e ácido p-cumárico nas classificadas como verde, além de metabólitos como galangina, rutina e quercetina distribuídos em diferentes grupos.

Ainda assim, foi observada grande variabilidade para outros compostos, inclusive dentro de cada classificação. A crisina, apesar de ser um metabólito comum em plantas, esteve presente de forma restrita a poucas amostras. Já a medicarpina, com forte potencial antitumoral, era esperada nos própolis vermelhos, mas apareceu em abundância, de fato, em uma amostra classificada como verde. Esses resultados evidenciam a complexidade e a influência de fatores botânicos locais na composição química do própolis.

Esse padrão indica que, independentemente da demarcação geográfica, as abelhas podem coletar resinas de diferentes espécies vegetais, especialmente em uma região com presença de vegetação tão variada como o Vale do Jequitinhonha, resultando em extratos com características químicas típicas de múltiplas origens. A determinação, com precisão, de onde as abelhas coletaram as resinas e qual a flora realmente disponível no entorno dos apiários é muito difícil.

Os resultados deste estudo levantam hipóteses e questionamentos para investigações futuras. Em relação ao própolis verde, seria interessante que estudos posteriores avaliassem as diferenças e similaridades entre o própolis verde do Vale do Jequitinhonha e amostras provenientes de localidades já reconhecidas por indicação geográfica (IG). Essa comparação permitiria verificar se seria adequado propor, no futuro, uma ampliação dos critérios atuais de IG para o própolis verde.

No caso do própolis vermelho, permanecem dúvidas quanto aos fatores que influenciaram a coloração dessas amostras, assim como sobre as possíveis fontes vegetais. Considerando que não há registro da presença de *Dalbergia ecastaphyllum* (rabo de bugio) nem de *Symphonia globulifera* (anani/guanandi) na região, seria importante investigar quais plantas estariam envolvidas na produção do própolis vermelho encontrado no Vale do Jequitinhonha.

Destaca-se, ainda, a importância de avaliação da atividade biológica dos extratos e de sua comparação com outros tipos de própolis brasileiros. Estudos futuros sobre os metabólitos presentes na vegetação ao redor dos apiários serão fundamentais para elucidar a origem botânica e a diversidade química do própolis produzido na região. Além disso, a classificação por cor pode ser empregada em pesquisas futuras para investigar outros compostos que influenciam os modelos quimiométricos, permitindo identificar metabólitos ainda não descritos e aprofundar o conhecimento sobre os fatores que afetam a composição do própolis. Essas informações serão importantes tanto para o avanço científico quanto para orientar os apicultores sobre as particularidades e potencialidades dos seus produtos.

REFERÊNCIAS

1. Ożarowski, M., Karpiński, T. M., Alam, R. & Łochyńska, M. Antifungal Properties of Chemically Defined Propolis from Various Geographical Regions. *Microorganisms* **10**, (2022).
2. Nayak, G. *et al.* Therapeutic Uses, Chemical Compositions, With Special References to Oral Health Care, Market Values and Clinical Trial of Bee Propolis: An Updated Review. *International Research Journal of Multidisciplinary Scope* **5**, 317–335 (2024).
3. Alanazi, S., Alenzi, N., Alenazi, F., Tabassum, H. & Watson, D. Chemical characterization of Saudi propolis and its antiparasitic and anticancer properties. *Sci Rep* **11**, 5390 (2021).
4. Berretta, A. A. *et al.* Functional Properties of Brazilian Propolis: From Chemical Composition Until the Market. in *Superfood and Functional Food - An Overview of Their Processing and Utilization* (InTech, 2017). doi:10.5772/65932.
5. Anjum, S. I. *et al.* Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi J Biol Sci* **26**, 1695–1703 (2019).
6. Machado, B. A. S. *et al.* Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. *PLoS One* **11**, (2016).
7. Veiga, R. S. *et al.* Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *J Appl Microbiol* **122**, 911–920 (2017).
8. Kaul, A. *et al.* Molecular insights into the antistress potentials of brazilian green propolis extract and its constituent artepillin c. *Molecules* **27**, (2022).
9. Rufatto, L. C. *et al.* Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity. *Asian Pac J Trop Biomed* **7**, 591–598 (2017).
10. Salatino, A. Brazilian Red Propolis: Legitimate Name of the Plant Resin Source. *MOJ Food Processing & Technology* **6**, (2018).
11. Aldana-Mejía, J. A., Ribeiro, V. P., Meepagala, K. M., Bastos, J. K. & Ross, S. A. Bioactive metabolites of Brazilian Red Propolis: Cytotoxic, antimalarial, and antimicrobial properties. *Fitoterapia* **181**, (2025).

12. Machado, C. S. *et al.* Comparative Study of Chemical Composition and Biological Activity of Yellow, Green, Brown, and Red Brazilian Propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* **2016**, (2016).
13. FAASC, F. das A. de A. e M. de S. C. *Informativo ZUMZUM – Ano 54, Nº 374*. <https://faasc.com.br/wp-content/uploads/2024/01/ZumZum374-FINAL-em-baixa.pdf> (2020).
14. Silva, E. C. A. da. Preparo do extrato de própolis legal. *Instituto Abelha Nativa* <https://www.institutoabelhanativa.org/post/preparo-do-extrato-de-pr%C3%B3polis-legal?srsltid=AfmBOoqADizocjdDIfNT53cSq2A4IyNk2OXBCSvwGqqPKFuUyolInm6p> (2020).
15. Castaldo, S. & Capasso, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* **73**, 1–6 (2002).
16. Machado Velho, J. C. *et al.* Use of propolis for skin wound healing: systematic review and meta-analysis. *Arch Dermatol Res* **315**, 943–955 (2023).
17. Marquele, F. D. *et al.* Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal* **39**, 455–462 (2005).
18. Kuo, C. C., Wang, R. H., Wang, H. H. & Li, C. H. Meta-analysis of randomized controlled trials of the efficacy of propolis mouthwash in cancer therapy-induced oral mucositis. *Supportive Care in Cancer* **26**, 4001–4009 (2018).
19. Halboub, E. *et al.* Efficacy of propolis-based mouthwashes on dental plaque and gingival inflammation: A systematic review. *BMC Oral Health* **20**, (2020).
20. Almeida, E. C. De. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. *The Journal of venomous animals and toxins*. **8**, 191–212 (2002).
21. Zullkiflee, N., Taha, H. & Usman, A. Propolis: Its Role and Efficacy in Human Health and Diseases. *Molecules* **27**, (2022).
22. De Groot, A. C. Propolis: A review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects. *Dermatitis* **24**, 263–282 (2013).
23. da Silva Frozza, C. O. *et al.* Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and Chemical Toxicology* **52**, 137–142 (2013).
24. Zulhendri, F. *et al.* The Potential Use of Propolis as a Primary or an Adjunctive Therapy in

- Respiratory Tract-Related Diseases and Disorders: A Systematic Scoping Review. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **146**, (2022).
25. Ożarowski, M. & Karpiński, T. M. The Effects of Propolis on Viral Respiratory Diseases. *Molecules* **28**, (2023).
 26. Kuo, C. C., Wang, R. H., Wang, H. H. & Li, C. H. Meta-analysis of randomized controlled trials of the efficacy of propolis mouthwash in cancer therapy-induced oral mucositis. *Supportive Care in Cancer* **26**, 4001–4009 (2018).
 27. Carvalho, A. A. *et al.* In vivo antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. *Food Chem* **126**, 1239–1245 (2011).
 28. Nuzzo, G. *et al.* Antitumor Potential of Immunomodulatory Natural Products. *Mar Drugs* **20**, (2022).
 29. Katekhaye, S., Fearnley, H., Fearnley, J. & Paradkar, A. Gaps in propolis research: challenges posed to commercialization and the need for an holistic approach. *J Apic Res* **58**, 604–616 (2019).
 30. Kasote, D., Bankova, V. & Viljoen, A. M. Propolis: chemical diversity and challenges in quality control. *Phytochemistry Reviews* **21**, 1887–1911 (2022).
 31. Curti, V. *et al.* Bioavailability and in vivo antioxidant activity of a standardized polyphenol mixture extracted from brown propolis. *Int J Mol Sci* **20**, (2019).
 32. D’Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B. & Masella, R. Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies. *Int J Mol Sci* **11**, 1321–1342 (2010).
 33. Porrini, M. & Riso, P. Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: A critical appraisal. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **18**, 647–650 (2008).
 34. Kafantaris, I., Amoutzias, G. D. & Mossialos, D. Foodomics in bee product research: a systematic literature review. *European Food Research and Technology* **247**, 309–331 (2021).
 35. Almuhayawi, M. S. Propolis as a novel antibacterial agent. *Saudi J Biol Sci* **27**, 3079–3086 (2020).
 36. Oliveira, R. D. *et al.* Portuguese Propolis Antitumoral Activity in Melanoma Involves ROS Production and Induction of Apoptosis. *Molecules* **27**, (2022).
 37. Konsila, K., Assavalapsakul, W., Phuwapraisirisan, P. & Chanchao, C. Anti-Malassezia globosa

- (MYA-4889, ATCC) activity of Thai propolis from the stingless bee *Geniotrigona thoracica*. *Heliyon* **10**, (2024).
38. Stähli, A. *et al.* In vitro activity of propolis on oral microorganisms and biofilms. *Antibiotics* **10**, (2021).
 39. Simoni, I. C. *et al.* In vitro antiviral activity of propolis and *Baccharis* sp. extracts on animal herpesviruses. *Arq Inst Biol (Sao Paulo)* **85**, (2018).
 40. Bertolucci, V. *et al.* Bioactive Compounds from Propolis on Bone Homeostasis: A Narrative Review. *Antioxidants* **14**, (2025).
 41. Dutra, R. P. *et al.* Brazilian Amazon Red Propolis: Leishmanicidal Activity and Chemical Composition of a New Variety of Red Propolis. *Metabolites* **13**, (2023).
 42. Silva, A. I. R. da, Rodrigues Dos Santos, B., Saldanha da Silva, S. & Santos, F. A. Atividade antibacteriana da própolis do Vale do Jequitinhonha contra *Staphylococcus aureus* e efeito sinérgico com penicilina. in *VIII Semana da Integração: Ensino, Pesquisa e Extensão* (Anais da Semana de Integração: Ensino, Pesquisa e Extensão da UFVJM, Diamantina, 2022).
 43. Cordeiro Do Nascimento, E. Vale do Jequitinhonha: Entre a carência social e a riqueza cultural. *Revista de Artes e Humanidades* **4**, (2009).
 44. Lacerda, M. de O. Paisagem e Potencial Turístico no Vale do Jequitinhonha. (Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005).
 45. Miranda, L. C. Nos caminhos do Vale: O (des)envolvimento no Jequitinhonha. (Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013).
 46. Gomes, A. P. de M. A Reinvenção das Tradições na Agricultura Familiar: Produção de novidades e conhecimentos na trajetória da apicultura do Vale do Jequitinhonha. (Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, 2022).
 47. Santos, B. M. S. *et al.* Contribuições para a construção da indicação geográfica do mel Jequitinhonha. *Research, Society and Development* **12**, (2023).
 48. Matos, R. Populações do Vale do Jequitinhonha e Movimentos Migratórios. in *Anais do IX Seminário sobre a Economia Mineira* 885–904 (Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000).
 49. Douglas, A., Demier, M., Coelho De Oliveira, D. & Makishi, F. Doces matas do Norte de Minas

- Gerais: atores, instituições e construção da indicação geográfica do mel de aroeira. *Revista Espinhaço* **2020**, 61–70.
50. Rodrigues, D. A. Prospecção fitoquímica de plantas do Cerrado do alto Vale do Jequitinhonha - MG. (Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2013).
 51. Dias, M. M. *et al.* Knowing in Order to Value: Strategies To Publicize Beekeeping Activities in the Jequitinhonha River Valley. *Revista de Gestão Social e Ambiental* **19**, (2025).
 52. Pereira, J. R. Caracterização Físico-Química, Reológica e Sensorial de Méis Comercializados em Minas Gerais. (Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Rio Pomba, 2016).
 53. Silva, M. C. M. *et al.* Chemical fingerprints of the organic varietal aroeira honey supports geographical indication area expansion in Minas Gerais, Brazil. *J Apic Res* **1**, 1–10 (2024).
 54. Marinho, C. *et al.* Organização da produção, do manejo e da comercialização de produtos apícolas: um foco nas ações coletivas. *Research, Society and Development* **10**, (2021).
 55. Scholz, M. B. dos S. *et al.* Indication of the geographical origin of honey using its physicochemical characteristics and multivariate analysis. *J Food Sci Technol* **57**, 1896–1903 (2020).
 56. Alvarenga, D. J. & Dardengo, A. Reflexões sobre a economia solidária no cooperativismo apícola do Vale do Jequitinhonha. *Revista de Gestão e Organizações Cooperativas* **11**, (2025).
 57. COOAPIVAJE - Cooperativa dos Apicultores do Vale do Jequitinhonha. Mel Jequitinhonha. <http://www.meljequitinhonha.com.br/> (2010).
 58. Deidda, M., Piras, C., Bassareo, P. P., Dessalvi, C. & Mercuro, G. Metabolomics, a promising approach to translational research in cardiology. *IJC Metab Endocr* **9**, 31–38 (2015).
 59. Oh, S. W. *et al.* Approach strategies and application of metabolomics to biotechnology in plants. *Front Plant Sci* **14**, (2023).
 60. Clish, C. B. Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. *Molecular Case Studies* **1**, (2015).
 61. Santos, G., Renovato-Martins, M. & Brito, N. M. The remodel of the “central dogma”: a metabolomics interaction perspective. *Metabolomics* **17**, (2021).

62. Beger, R. D. *et al.* Metabolomics enables precision medicine: “A White Paper, Community Perspective”. *Metabolomics* **12**, (2016).
63. Canuto, G. A. B. *et al.* Metabolômica: Definições, estado-da-arte e aplicações representativas. *Quim Nova* **41**, 75–91 (2018).
64. Alseekh, S. *et al.* Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices. *Nat Methods* **18**, 747–756 (2021).
65. Roberts, L. D., Souza, A. L., Gerszten, R. E. & Clish, C. B. Targeted metabolomics. *Curr Protoc Mol Biol* **1**, (2012).
66. Broeckling, C. D. *et al.* Current Practices in LC-MS Untargeted Metabolomics: A Scoping Review on the Use of Pooled Quality Control Samples. *Anal Chem* **95**, 18645–18654 (2023).
67. Kim, H. K. & Verpoorte, R. Sample preparation for plant metabolomics. *Phytochemical Analysis* **21**, 4–13 (2010).
68. Naz, S., Moreira Dos Santos, D. C., García, A. & Barbas, C. Analytical protocols based on LC-MS, GC-MS and CE-MS for nontargeted metabolomics of biological tissues. *Bioanalysis* **6**, 1657–1677 (2014).
69. Peters, K. *et al.* Current challenges in plant Eco-Metabolomics. *Int J Mol Sci* **19**, (2018).
70. Liu, M. *et al.* Propolis as a promising functional ingredient: A comprehensive review on extraction, bioactive properties, bioavailability, and industrial applications. *Food Science and Human Wellness* **14**, (2025).
71. Souza, A. L. & Patti, G. J. A Protocol for Untargeted Metabolomic Analysis: From Sample Preparation to Data Processing. *Methods in Molecular Biology* **2276**, 357–382 (2021).
72. Widelski, J. *et al.* Phytochemical Profile and Antimicrobial Potential of Propolis Samples from Kazakhstan. *Molecules* **28**, (2023).
73. A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. *Clin Chem* **27**, 493–501 (1981).
74. Gika, H. G., Zisi, C., Theodoridis, G. & Wilson, I. D. Protocol for quality control in metabolic profiling of biological fluids by U(H)PLC-MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **1008**, 15–25 (2016).

75. Idle, J. R. & Gonzalez, F. J. Metabolomics. *Cell Metab* **6**, 348–351 (2007).
76. Coen, M., Holmes, E., Lindon, J. C. & Nicholson, J. K. NMR-based metabolic profiling and metabonomic approaches to problems in molecular toxicology. *Chem Res Toxicol* **21**, 9–27 (2008).
77. Theodoridis, G. A., Gika, H. G., Want, E. J. & Wilson, I. D. Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling: A review. *Anal Chim Acta* **711**, 7–16 (2012).
78. Allwood, J. W. *et al.* Unravelling plant responses to stress—the importance of targeted and untargeted metabolomics. *Metabolites* **11**, (2021).
79. Wilson, M. B., Spivak, M., Hegeman, A. D., Rendahl, A. & Cohen, J. D. Metabolomics Reveals the Origins of Antimicrobial Plant Resins Collected by Honey Bees. *PLoS One* **8**, (2013).
80. Stavropoulou, M. I. *et al.* Untargeted ultrahigh-performance liquid chromatography-hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometry (UHPLC-HRMS) metabolomics reveals propolis markers of greek and chinese origin. *Molecules* **26**, (2021).
81. Li, Y. *et al.* Strategy for comparative untargeted metabolomics reveals honey markers of different floral and geographic origins using ultrahigh-performance liquid chromatography-hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1499**, 78–89 (2017).
82. Saccenti, E., Hoefsloot, H. C. J., Smilde, A. K., Westerhuis, J. A. & Hendriks, M. M. W. B. Reflections on univariate and multivariate analysis of metabolomics data. *Metabolomics* **10**, 361–374 (2014).
83. Pang, Z. *et al.* MetaboAnalystR 4.0: a unified LC-MS workflow for global metabolomics. *Nat Commun* **15**, (2024).
84. Chong, J. & Xia, J. MetaboAnalystR: An R package for flexible and reproducible analysis of metabolomics data. *Bioinformatics* **34**, 4313–4314 (2018).
85. Xia, J., Psychogios, N., Young, N. & Wishart, D. S. MetaboAnalyst: A web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Res* **37**, (2009).
86. Stahle, L. & Wold, S. Analysis of Variance (ANOVA). *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **6**, 259–272 (1989).
87. Miller, J. N. & Miller, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. (Pearson, 2010).

88. Ferreira, M. *Quimiometria: Conceitos, Métodos e Aplicações*. (Editora da Unicamp, 2015).
89. Gemperline, Paul. *Practical Guide to Chemometrics*. (CRC/Taylor & Francis, 2006).
90. Chen, L. *et al.* Metabolite discovery through global annotation of untargeted metabolomics data. *Nat Methods* **18**, 1377–1385 (2021).
91. Fiehn, O. *et al.* The metabolomics standards initiative (MSI). *Metabolomics* **3**, 175–178 (2007).
92. Blaženović, I., Kind, T., Ji, J. & Fiehn, O. Software tools and approaches for compound identification of LC-MS/MS data in metabolomics. *Metabolites* **8**, (2018).
93. Cooper, B. & Yang, R. An assessment of AcquireX and Compound Discoverer software 3.3 for non-targeted metabolomics. *Sci Rep* **14**, (2024).
94. Tautenhahn, R., Patti, G. J., Rinehart, D. & Siuzdak, G. XCMS online: A web-based platform to process untargeted metabolomic data. *Anal Chem* **84**, 5035–5039 (2012).
95. Gowda, H. *et al.* Interactive XCMS online: Simplifying advanced metabolomic data processing and subsequent statistical analyses. *Anal Chem* **86**, 6931–6939 (2014).
96. Schmid, R. *et al.* Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. *Nat Biotechnol* **41**, 447–449 (2023).
97. Heuckeroth, S. *et al.* Reproducible mass spectrometry data processing and compound annotation in MZmine 3. *Nat Protoc* **19**, 2597–2641 (2024).
98. Nothias, L. F. *et al.* Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nat Methods* **17**, 905–908 (2020).
99. Wang, M. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat Biotechnol* **34**, 828–837 (2016).
100. Dührkop, K. *et al.* SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. *Nat Methods* **16**, 299–302 (2019).
101. Ruttkies, C., Schymanski, E. L., Wolf, S., Hollender, J. & Neumann, S. MetFrag relaunched: Incorporating strategies beyond in silico fragmentation. *J Cheminform* **8**, (2016).
102. Gil-De-La-Fuente, A. *et al.* CEU Mass Mediator 3.0: A Metabolite Annotation Tool. *J Proteome Res* **18**, 797–802 (2019).

103. Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Matsuura, Y. & Ishiguro-Watanabe, M. KEGG: biological systems database as a model of the real world. *Nucleic Acids Res* **53**, D672–D677 (2025).
104. Sorokina, M. & Steinbeck, C. Review on natural products databases: Where to find data in 2020. *J Cheminform* **12**, (2020).
105. Karuppaiah, S., Sermugapandian, N., Mohan, S. & Krishna, M. Application of UV-Visible Spectrophotometric Colour Analysis in Different Natural Product Identification. in *Advances in Colorimetry* (ed. Samanta, A. K.) (IntechOpen, 2024).
106. BRASIL. *Instrução Normativa Nº 3, de 19 de Janeiro de 2001*. (Brasil, 2001).
107. de Oliveira, V. R. & Nogueira, F. A. R. Spectrophotometric investigation of natural dyes of *Portulaca grandiflora* and *Catharanthus roseus* flowers. *Communication and Culture: Multidisciplinary Perspectives* **23**, (2024).
108. Sullivan, H., Wang, B. & Jiang, L. Investigation of tropical plant-based natural dyes combination and adsorption optimization for natural dye-sensitized solar cell. *Environ Prog Sustain Energy* **41**, (2022).
109. Pimenta, J. V. C., dos Santos, L. B., Almeida, M. R., Augusti, R. & de Macedo, A. N. Geographic origin characterization of Brazilian green coffee beans via untargeted metabolomics. *Food Chem* **464**, (2025).
110. González-Domínguez, Á., Estanyol-Torres, N., Brunius, C., Landberg, R. & González-Domínguez, R. QComics: Recommendations and Guidelines for Robust, Easily Implementable and Reportable Quality Control of Metabolomics Data. *Anal Chem* **96**, 1064–1072 (2024).
111. Fagundes, M. O Projeto Arqueológico Alto Jequitinhonha (PAAJ) e a Área Arqueológica De Serra Negra, Alto Araçuaí, Minas Gerais - Aspectos Gerais. *Revista Espinhaço* **2**, 68–95 (2013).
112. BRASIL. *Portaria IMA Nº 1603, de 18 de Abril de 2016*. (Brasil, 2016).
113. Otsuka, F. A. M. *et al.* Identification of caffeic acid and rutin by UHPLC MS/MS and antioxidant activity of *Commelina erecta* lineu. In cell culture. *An Acad Bras Cienc* **92**, 1–10 (2020).
114. Ramabulana, A. T., Steenkamp, P., Madala, N. & Dubery, I. A. Profiling of chlorogenic acids from *bidens pilosa* and differentiation of closely related positional isomers with the aid of UHPLC-QTOF-MS/MS-based in-source collision-induced dissociation. *Metabolites* **10**, (2020).

115. Álvarez-Fernández, M. A., Cerezo, A. B., Cañete-Rodríguez, A. M., Troncoso, A. M. & García-Parrilla, M. C. Composition of nonanthocyanin polyphenols in alcoholic-fermented strawberry products using LC-MS (QTRAP), high-resolution MS (UHPLC-Orbitrap-MS), LC-DAD, and antioxidant activity. *J Agric Food Chem* **63**, 2041–2051 (2015).
116. Vieira, A. L. S. *et al.* Evaluation of the Chemical Profile and Antioxidant Capacity of Green, Brown, and Dark Propolis. *Plants* **12**, (2023).
117. Balingui, C. F., Nyemb, J. N., Talla, E. & Martin, N. LC-MS Analysis, Total Phenolics Content, Phytochemical Study and DPPH Antiradical Scavenging Activity of Two Cameroonian Propolis Samples. **9**, 100 (2019).
118. Zhang, C. *et al.* Artepillin C, is it a good marker for quality control of Brazilian green propolis? *Nat Prod Res* **31**, 2441–2444 (2017).
119. Xu, X. *et al.* The chemical composition of brazilian green propolis and its protective effects on mouse aortic endothelial cells against inflammatory injury. *Molecules* **25**, (2020).
120. Morais, D. V. *et al.* Active antioxidant phenolics from brazilian red propolis: An optimization study for their recovery and identification by LC-ESI-QTOF-MS/MS. *Antioxidants* **10**, 1–16 (2021).
121. Silva, N. B. S. *et al.* Potential in vitro anti-periodontopathogenic, anti-Chikungunya activities and in vivo toxicity of Brazilian red propolis. *Sci Rep* **12**, (2022).
122. Amaral, C. S., Amaral, W. G., Pereira, I. M., Oliveira, P. A. & Machado, V. de M. Floristic-structural comparison of adults and regenerating strata in a mined area of Campo Rupestre, Diamantina, MG. *Cerne* **21**, 183–190 (2015).
123. Oršolić, N. Allergic Inflammation: Effect of Propolis and Its Flavonoids. *Molecules* **27**, (2022).
124. Filho, C., de Gomes, M. G., Kemmerich, M., de Deus, C. & de Menezes, C. R. Chrysin flavonoid encapsulation: a review about methodologies used and biological potential. *Ciencia Rural* **54**, (2024).

APÊNDICE A

Figura A1: Ácido cafeico. (A) Espectro de fragmentação em modo negativo do íon de m/z 179,0349 da amostra AP54; (B) distribuição isotópica do íon observado em AP54; (C) espectro de fragmentação correspondente reportado na literatura; (D) área do pico nas amostras analisadas.

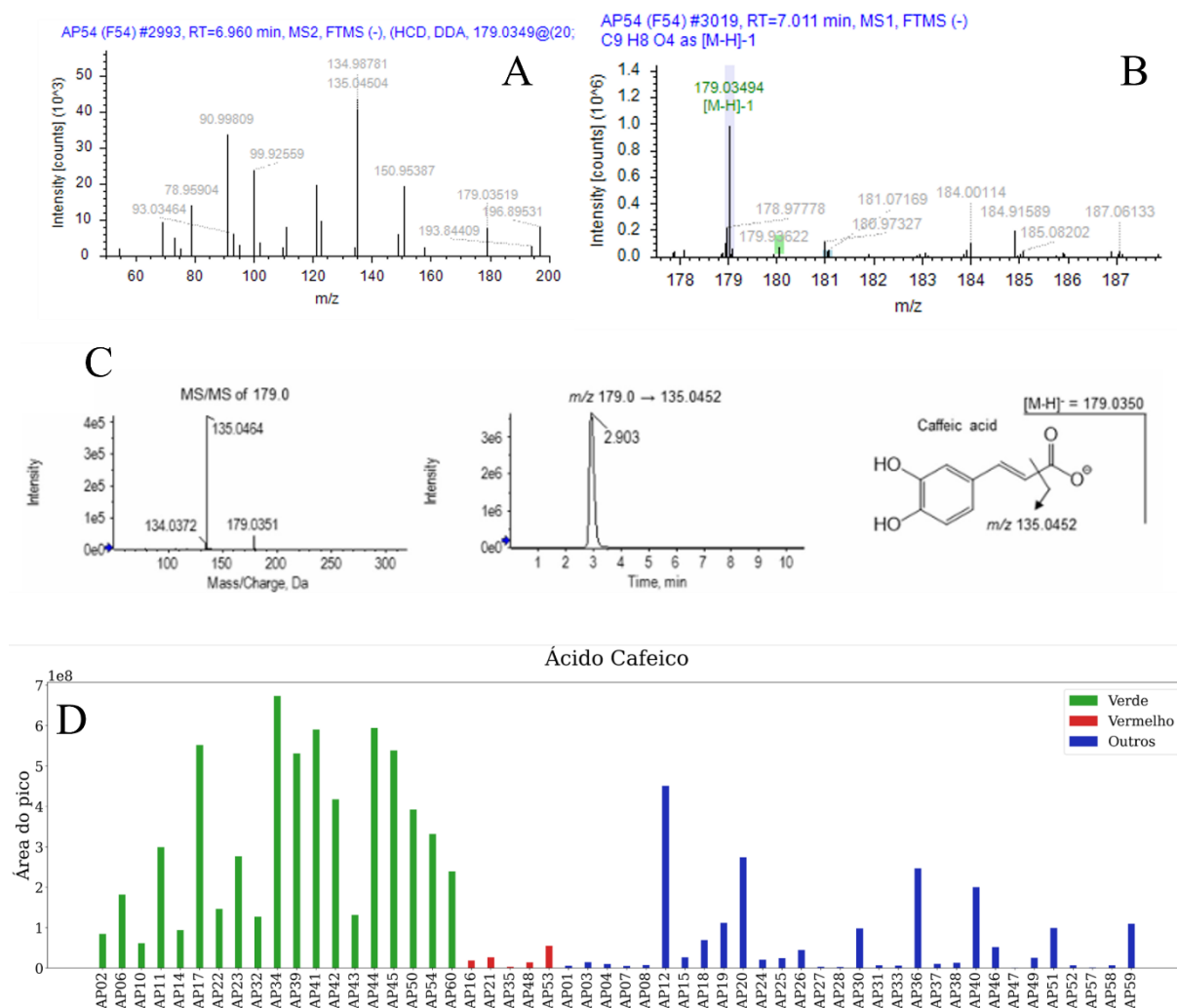


Figura A2: Ácido p-cumárico. (A) Espectro de fragmentação em modo negativo do íon de m/z 163,0399 da amostra AP54; (B) *boxplot* das áreas do pico entre as amostras de própolis verde, vermelho e outras (em azul); (C) espelho comparando a fragmentação experimental com o espectro de 4-coumaric acid disponível no MzCloud.

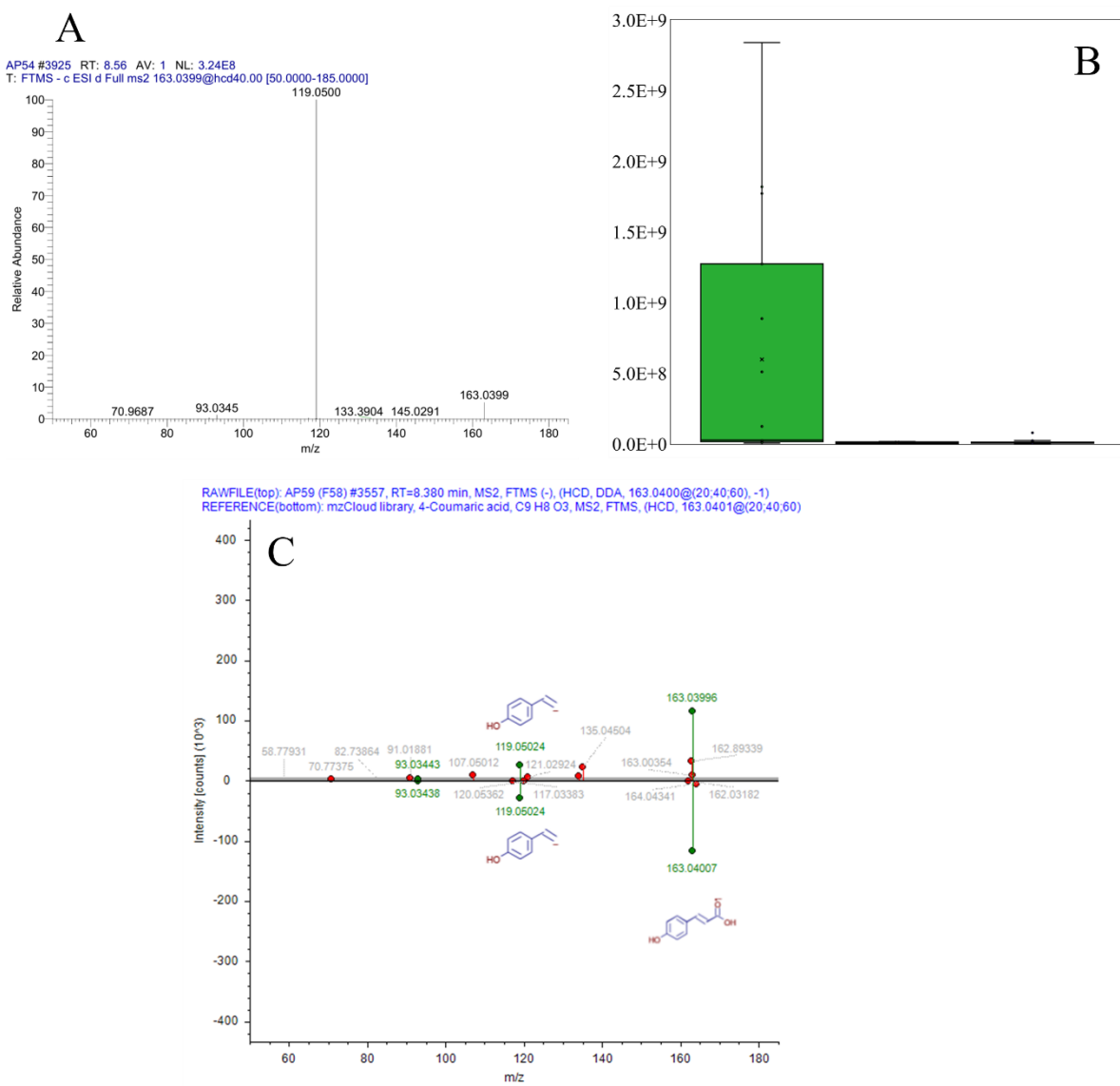


Figura A3: Ácido 3,5-dicafeoilquínico. (A) Full scan da amostra AP54 em modo negativo; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 515,11957; (C) espectro de fragmentação do íon de m/z 515,1195 na amostra AP54; (D) *boxplot* das áreas do pico nas diferentes classes de própolis; (E) espectro de fragmentação do ácido 3,5-dicafeoilquínico reportado na literatura.

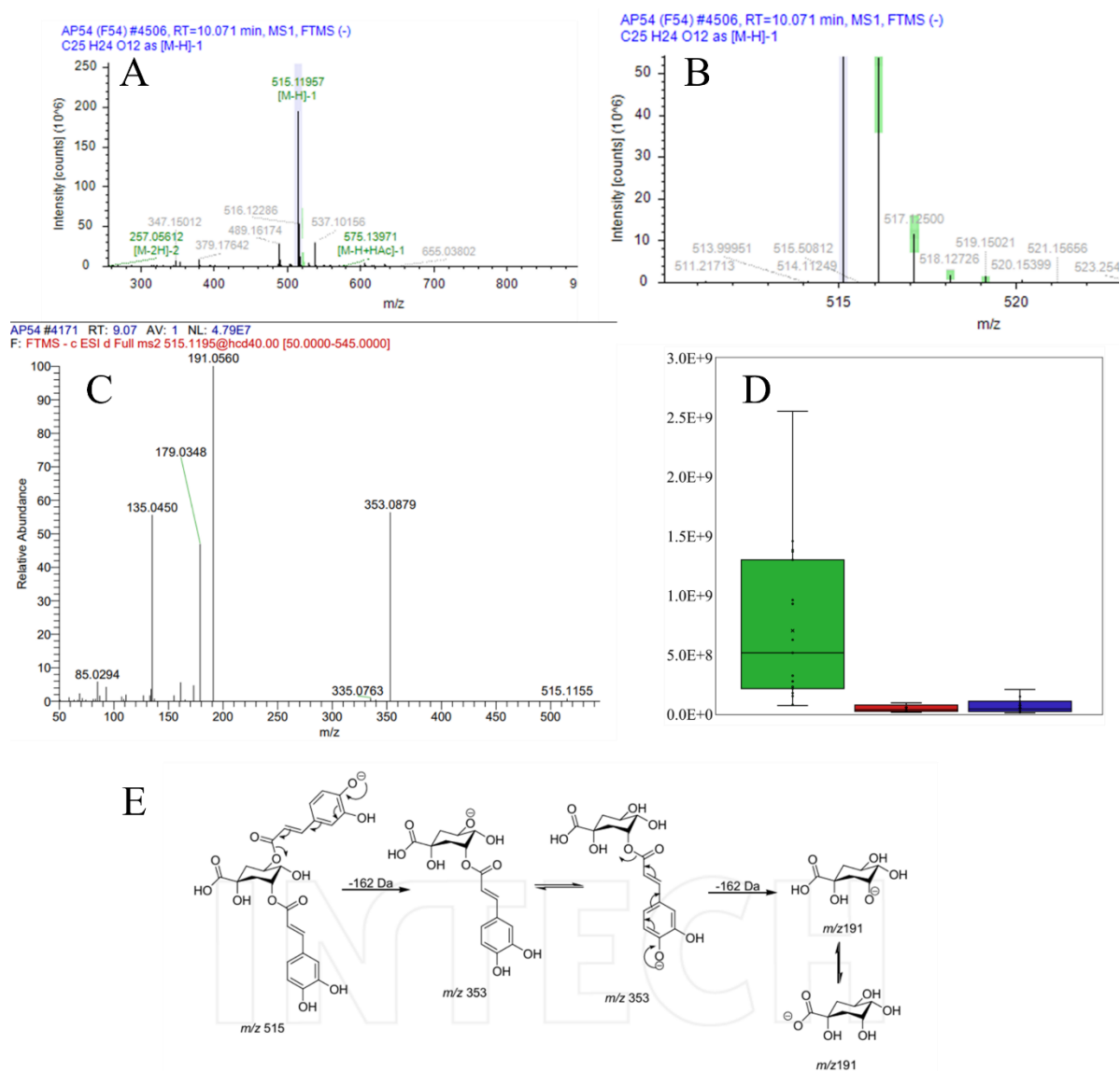
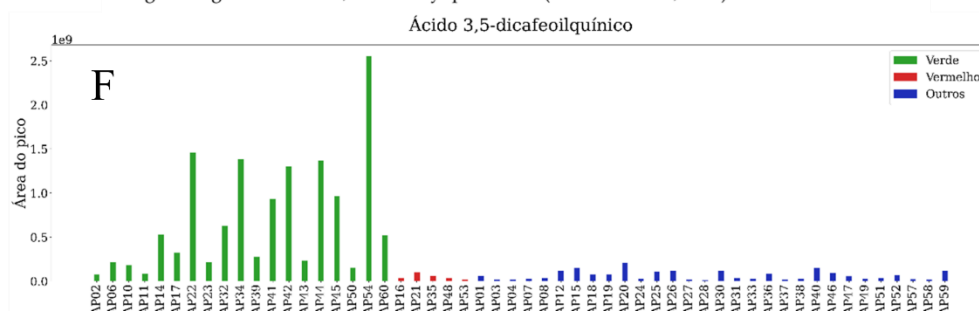


Fig. 7. Fragmentation of 3,5-dicafeoylquinic acid (Miketova et al., 1999).



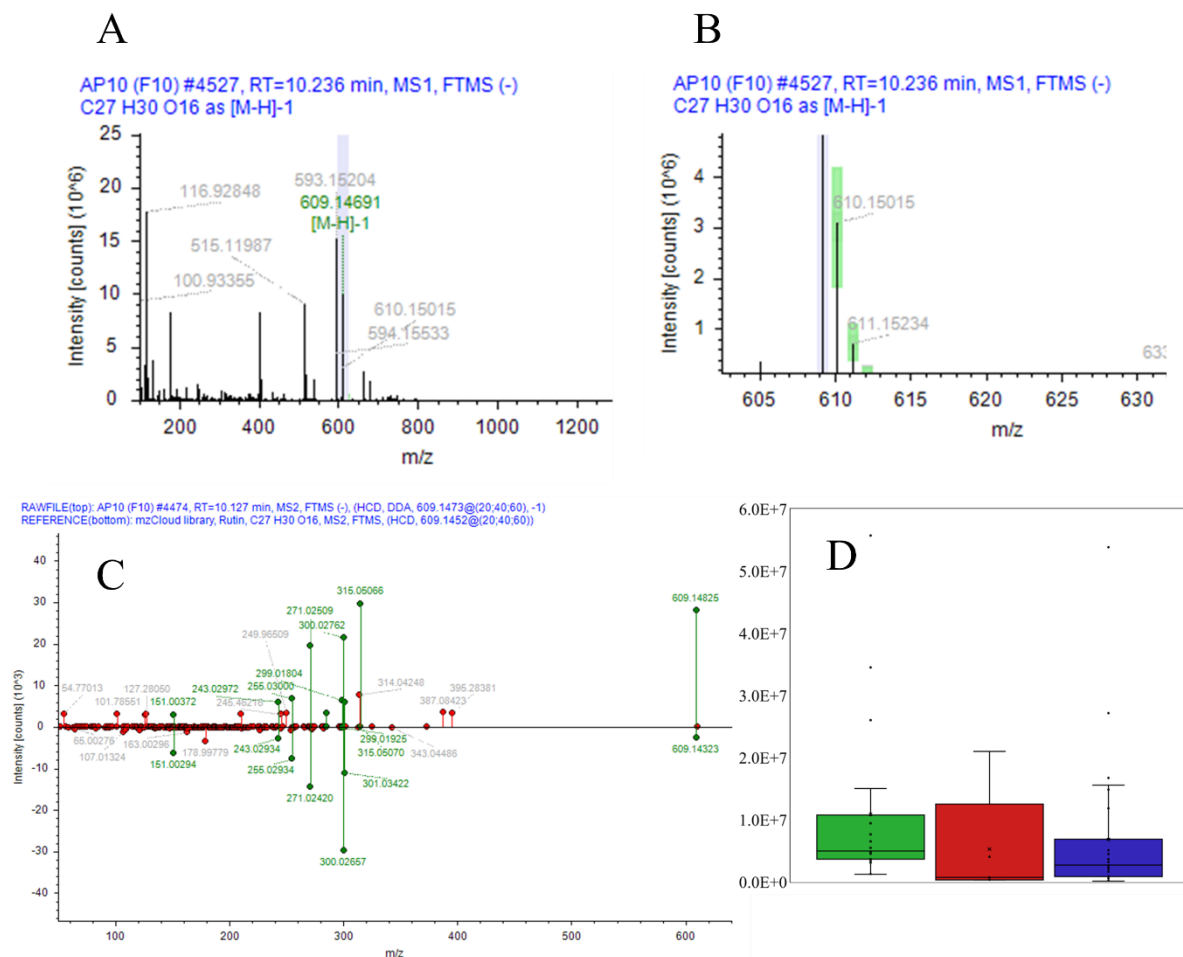


Figura A5: Ácido 4,5-dicafeoilquínico. (A) *Full scan* da amostra AP54, destacando o íon de m/z 515,11951; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 515,11951; (C) espelho comparando a fragmentação experimental com o espectro de fragmentação do ácido 4,5-dicafeoilquínico disponível no MzCloud; (D) boxplot das áreas do pico nas diferentes classes de própolis; (E) área do pico atribuída ao ácido 4,5-dicafeoilquínico em todas as amostras analisadas.

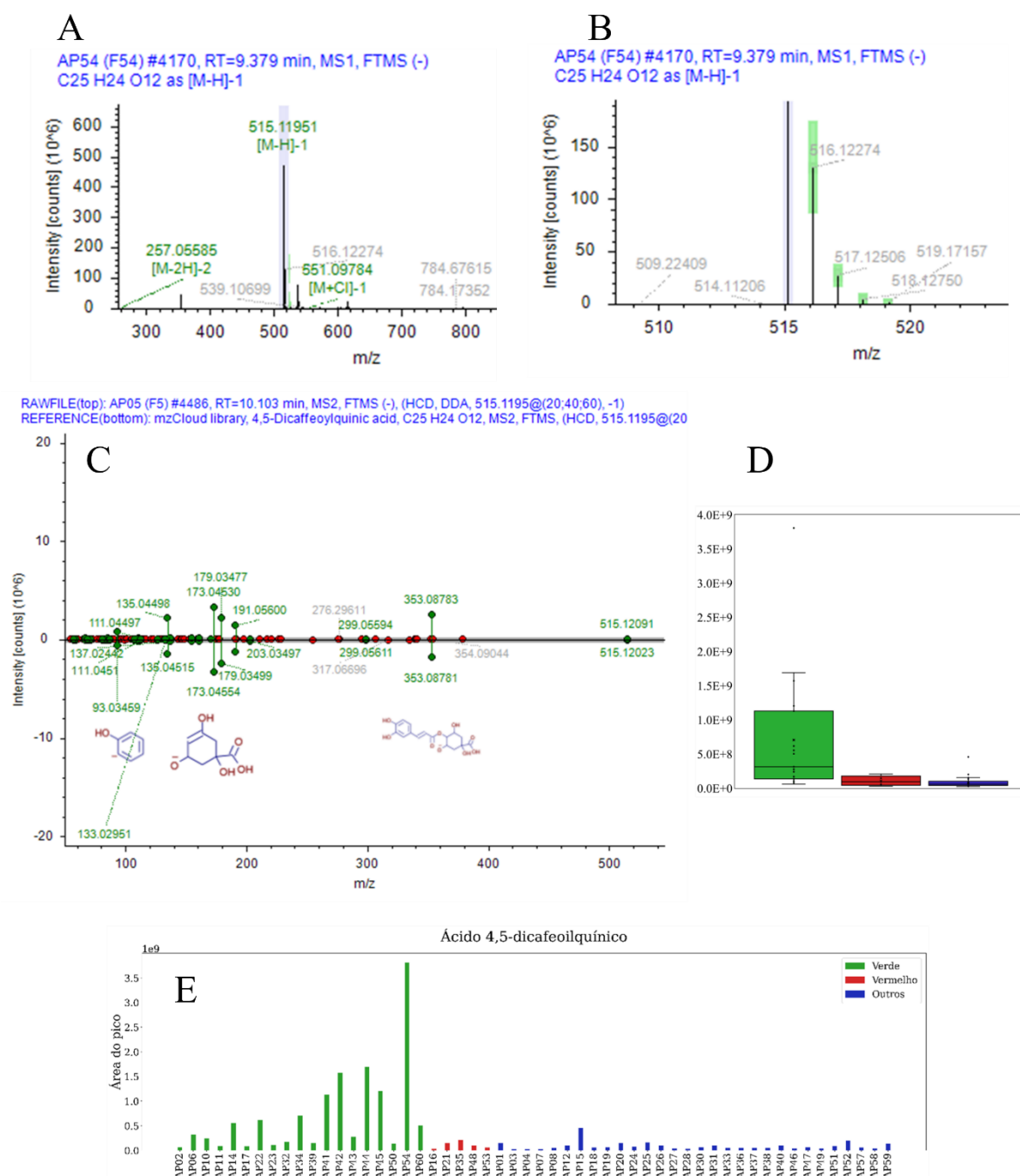


Figura A6: Ácido cinâmico. (A) *Full scan* da amostra AP21, destacando o íon de m/z 147,04501; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 147,04501; (C) espelho comparando a fragmentação experimental com o espectro de ácido cinâmico disponível no MzCloud; (D) boxplot das áreas do pico nas diferentes classes de própolis.

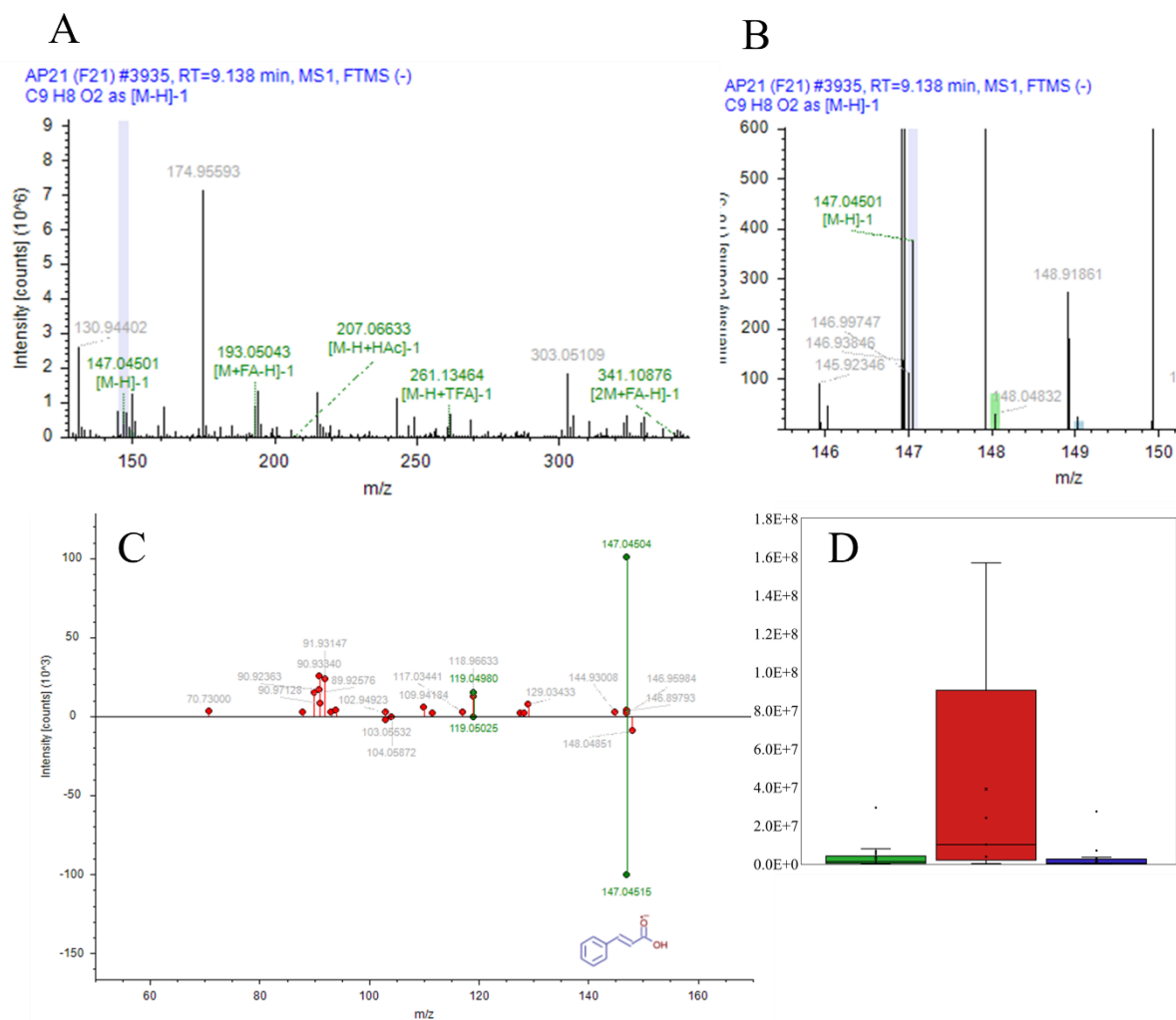


Figura A7: Quercetina. (A) *Full scan* destacando o íon de m/z 301,03571; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 301,03571; (C) espelho comparando a fragmentação experimental com o espectro de quercetina disponível no MzCloud; (D) boxplot das áreas do pico nas diferentes classes de própolis.

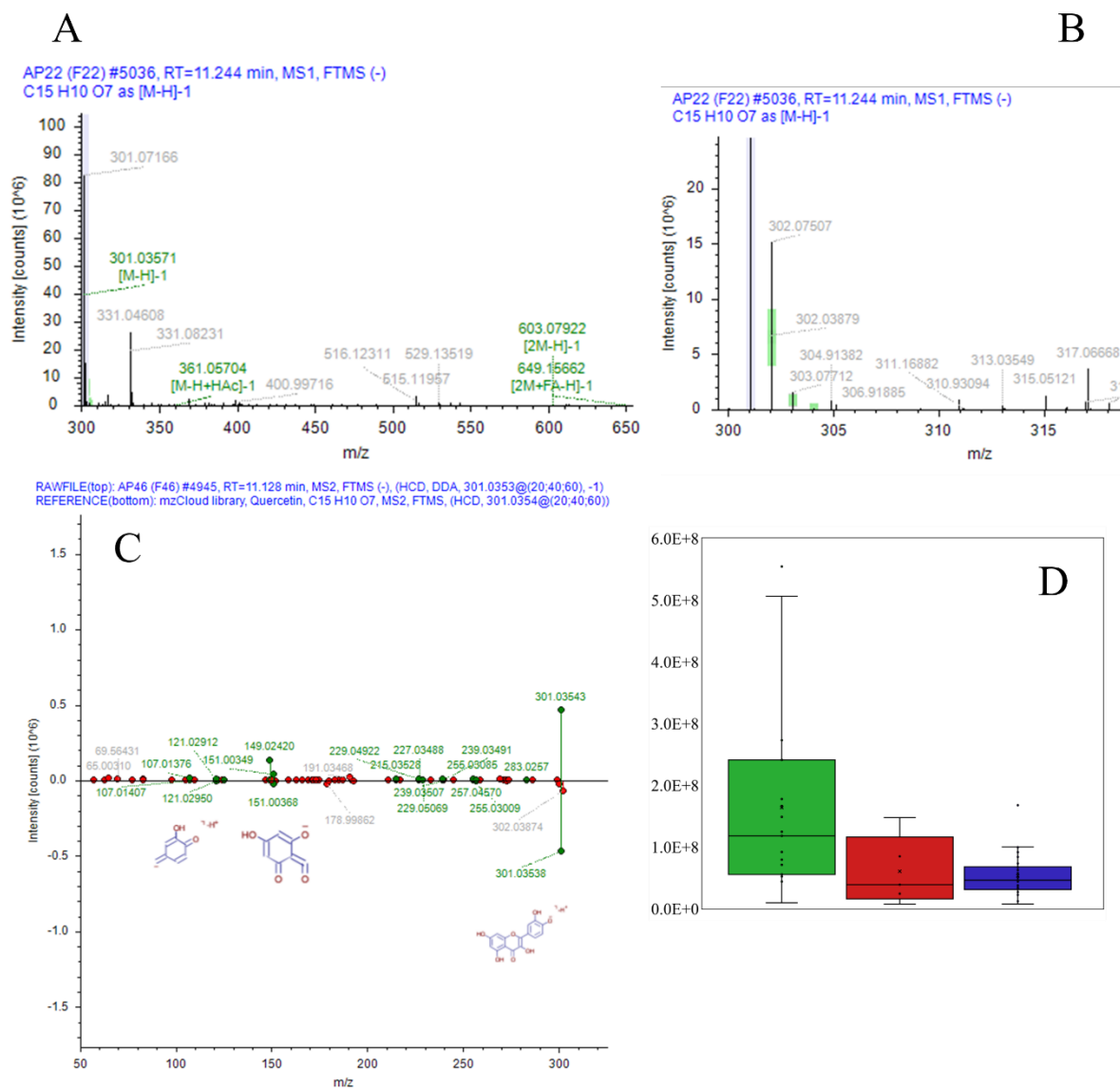


Figura A8: Aromadendrina. (A) Espectro de fragmentação do íon de m/z 287,0563 na amostra AP59; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 287,0563; (C) comparação com a fragmentação *in silico* do íon de m/z 287,0563; (D) boxplot das áreas do pico nas diferentes classes de própolis; (E) área do pico atribuída à aromadendrina em todas as amostras analisadas.

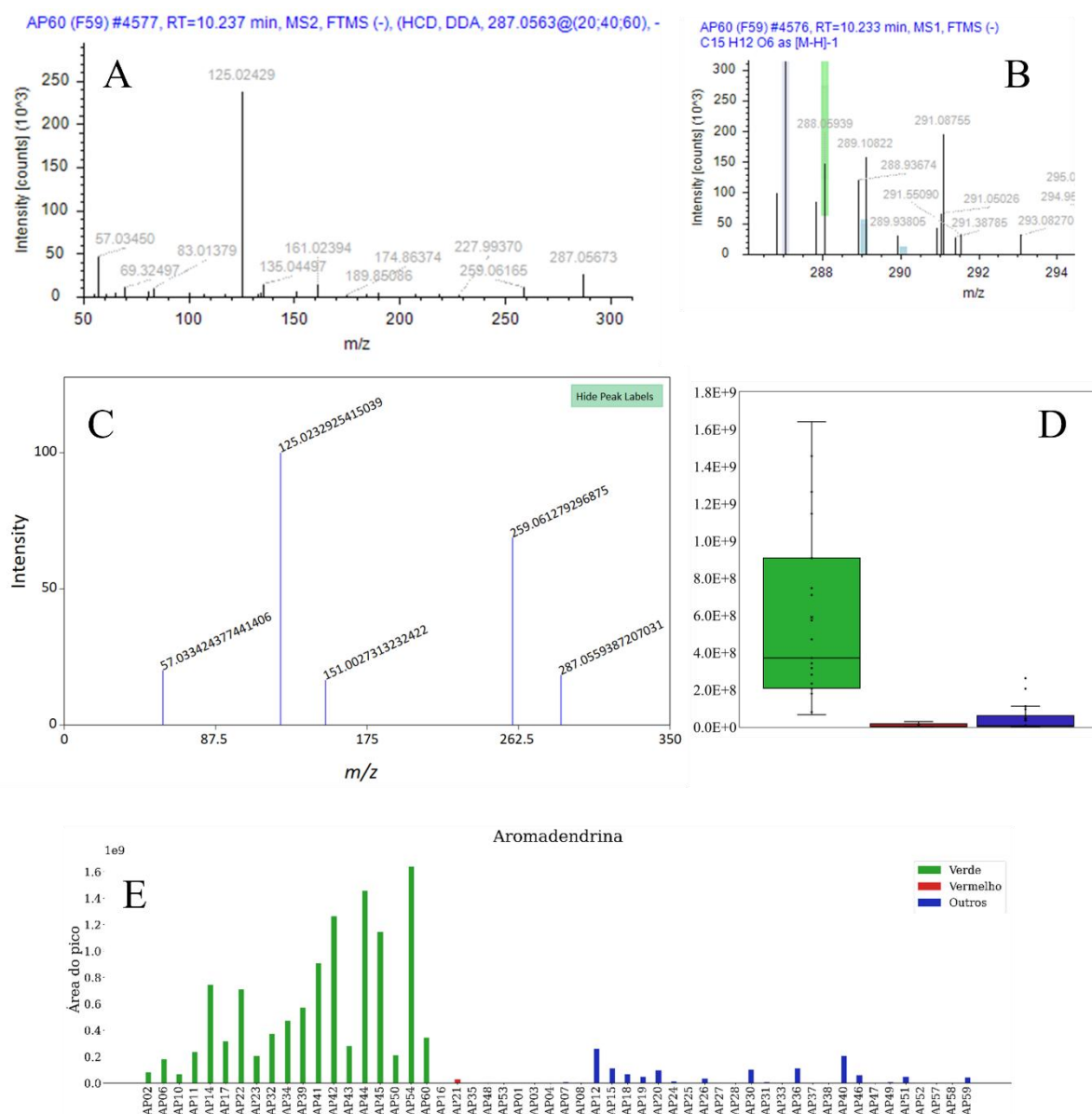


Figura A9: Drupanina. (A) *Full scan* da amostra AP54, destacando o íon de m/z 231,10249; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 231,10249; (C) espectro de fragmentação do íon de m/z 231,10249 na amostra AP54; (D) boxplot das áreas do pico nas diferentes classes de própolis; (E) espectro de fragmentação da drupanina reportado na literatura.

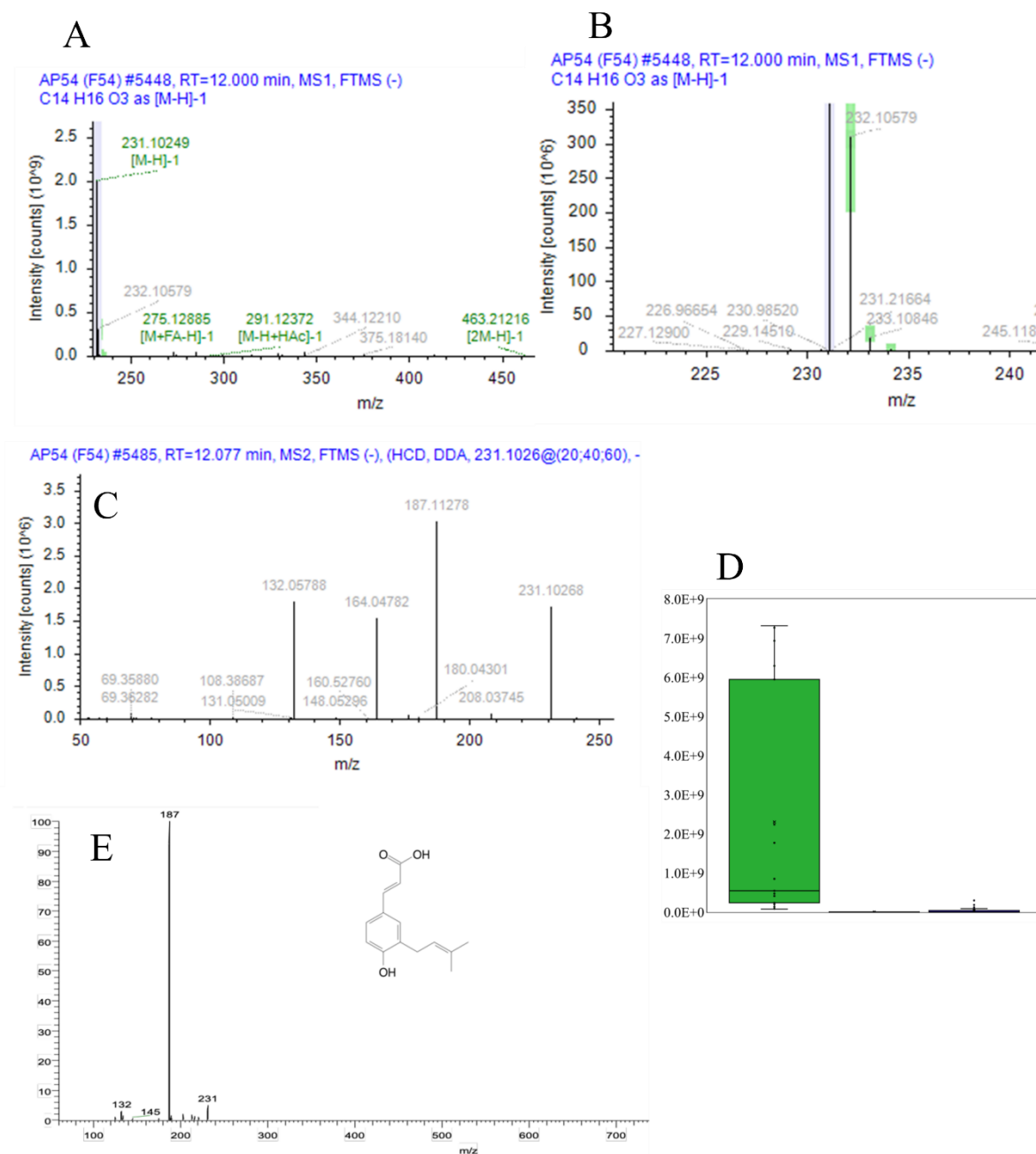


Figura A10: Crisina. (A) *Full scan* da amostra AP22, destacando o íon de m/z 253,05061; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 253,05061; (C) espelho comparando a fragmentação experimental com o espectro de crisina disponível no MzCloud; (D) boxplot das áreas do pico nas diferentes classes de própolis.

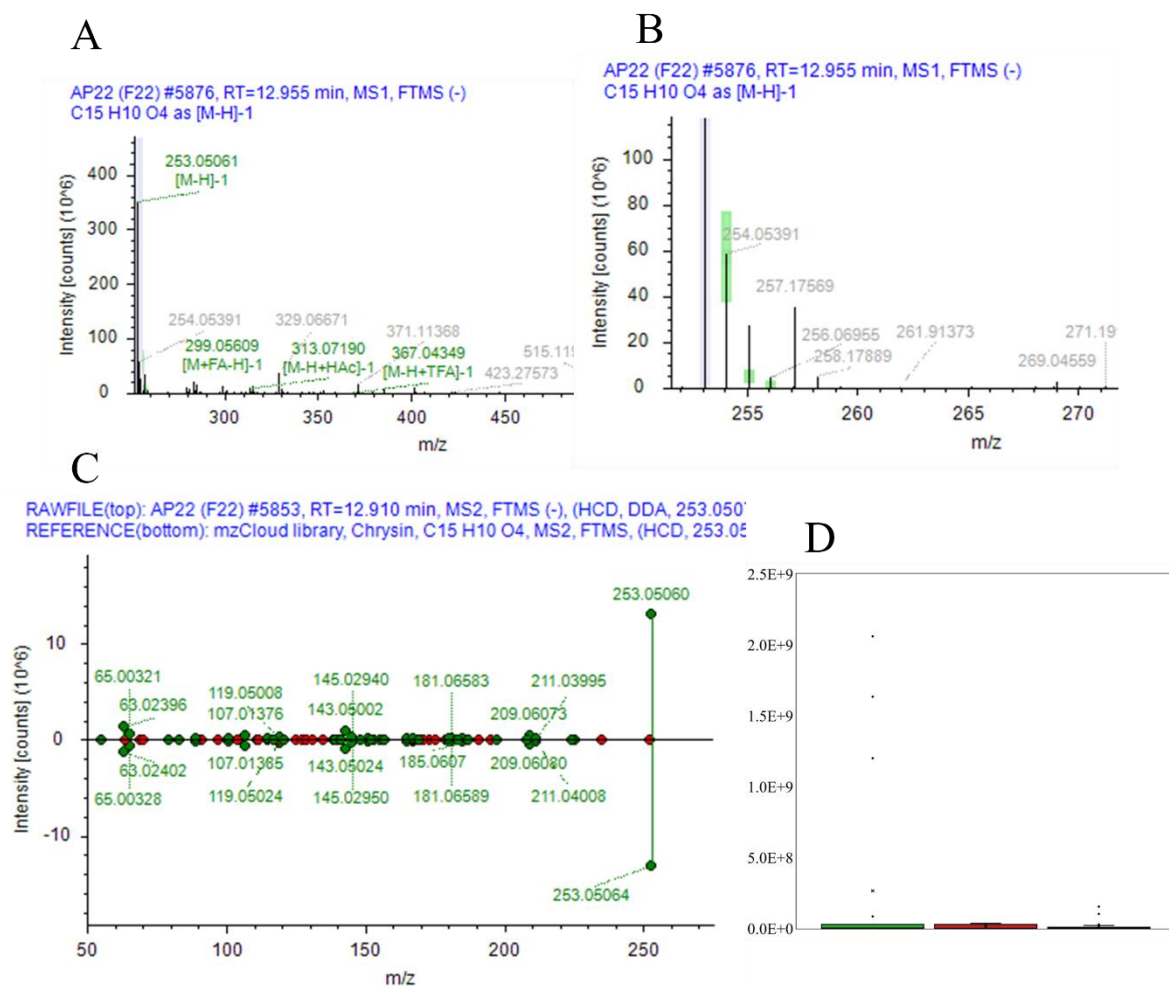


Figura A11: Galangina. (A) Espectro de fragmentação do íon de m/z 269,0456 na amostra AP05; (B) *full scan* da amostra AP11; (C) espectro de fragmentação *in silico* da galangina no modo de ionização negativo; (D) boxplot das áreas do pico nas diferentes classes de própolis.

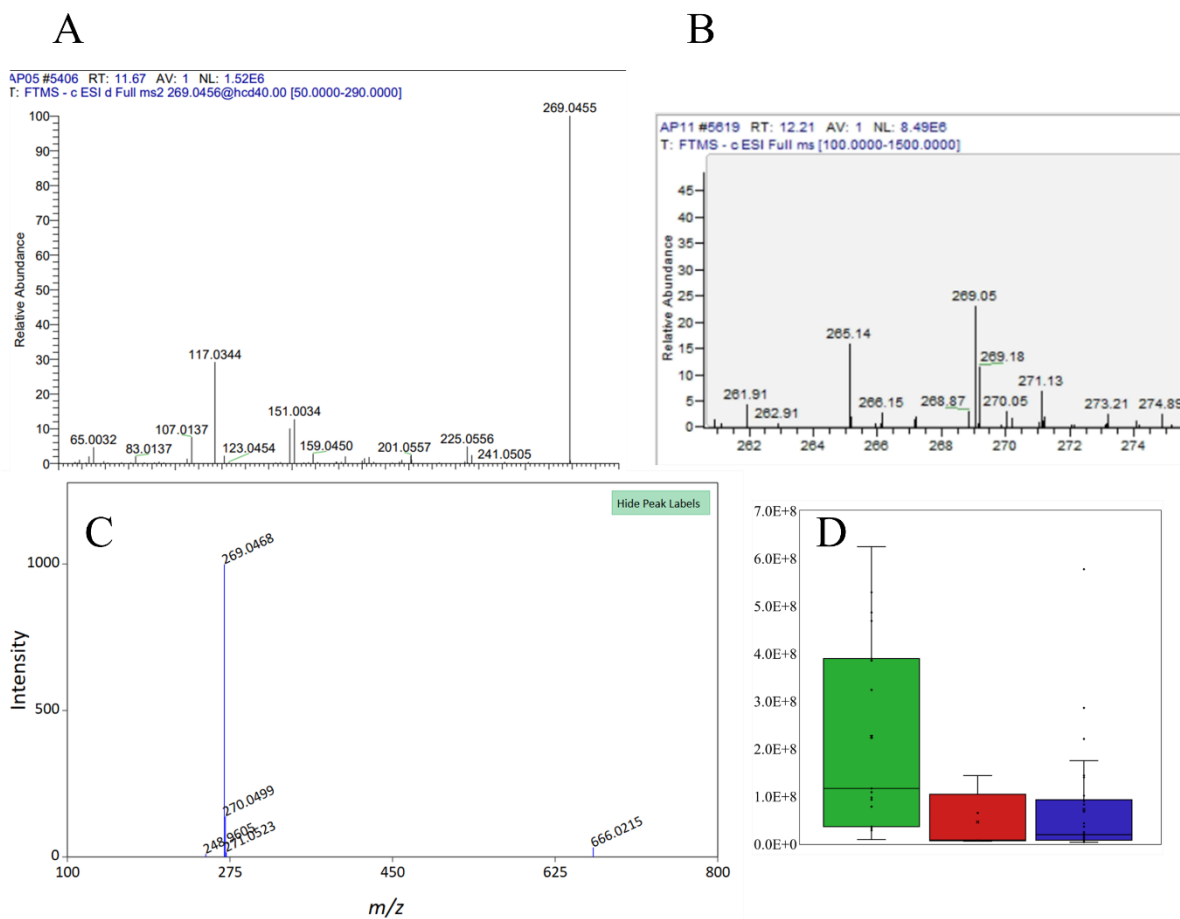


Figura A12: Liquiritigenina. (A) *Full scan* da amostra AP22, destacando o íon de m/z 255,06631; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 255,06631; (C) espectro de fragmentação do íon de m/z 255,0663.

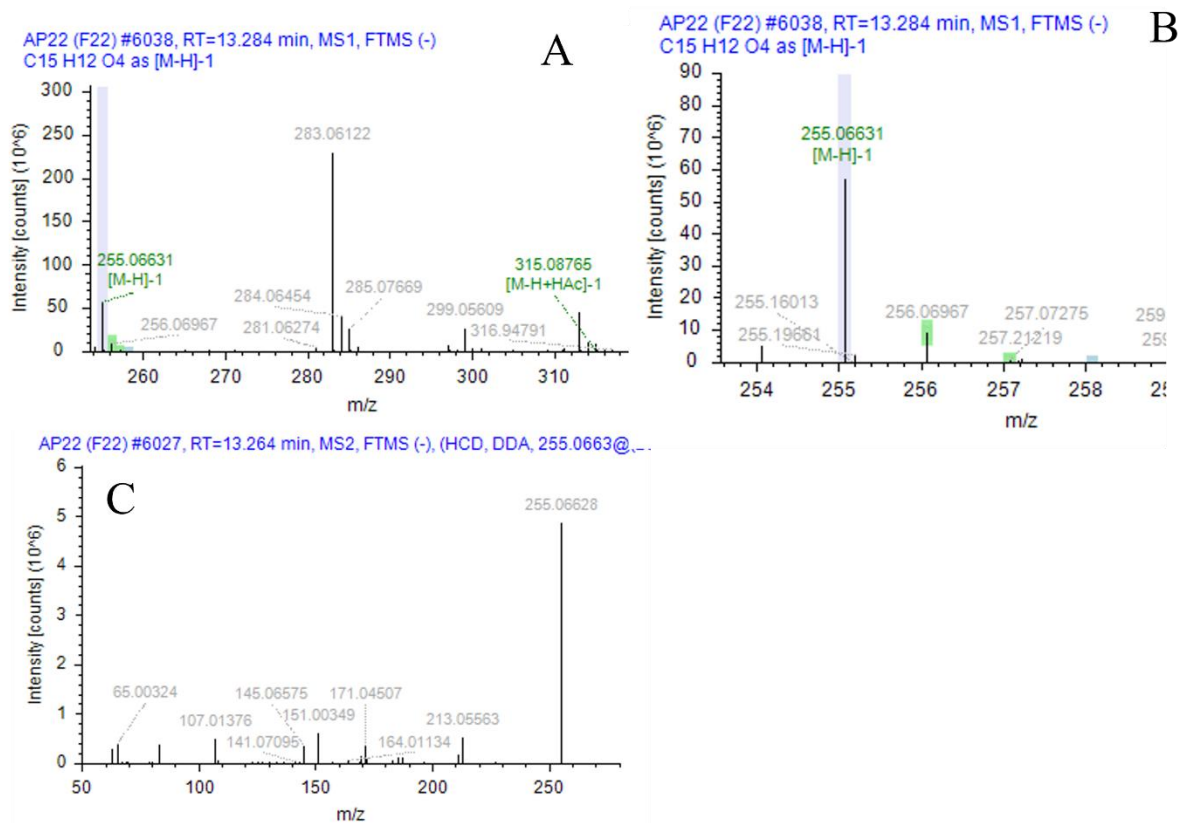


Figura A13: Calicosina. (A) *Full scan* da amostra AP22, destacando o íon de m/z 283,06122; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 283,06122; (C) espectro de fragmentação do íon de m/z 283,0612.

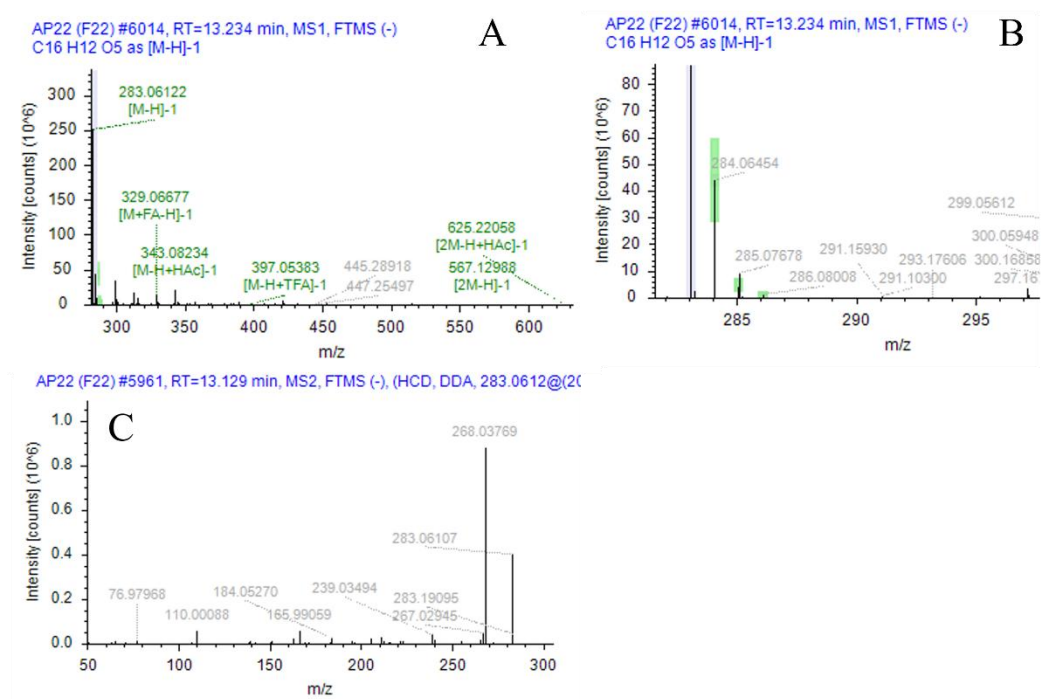


Figura A14: Isoliquiritigenina. (A) *Full scan* da amostra AP22, destacando o íon de m/z 255,06638; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 255,06638; (C) espectro de fragmentação do íon de m/z 255,0664.

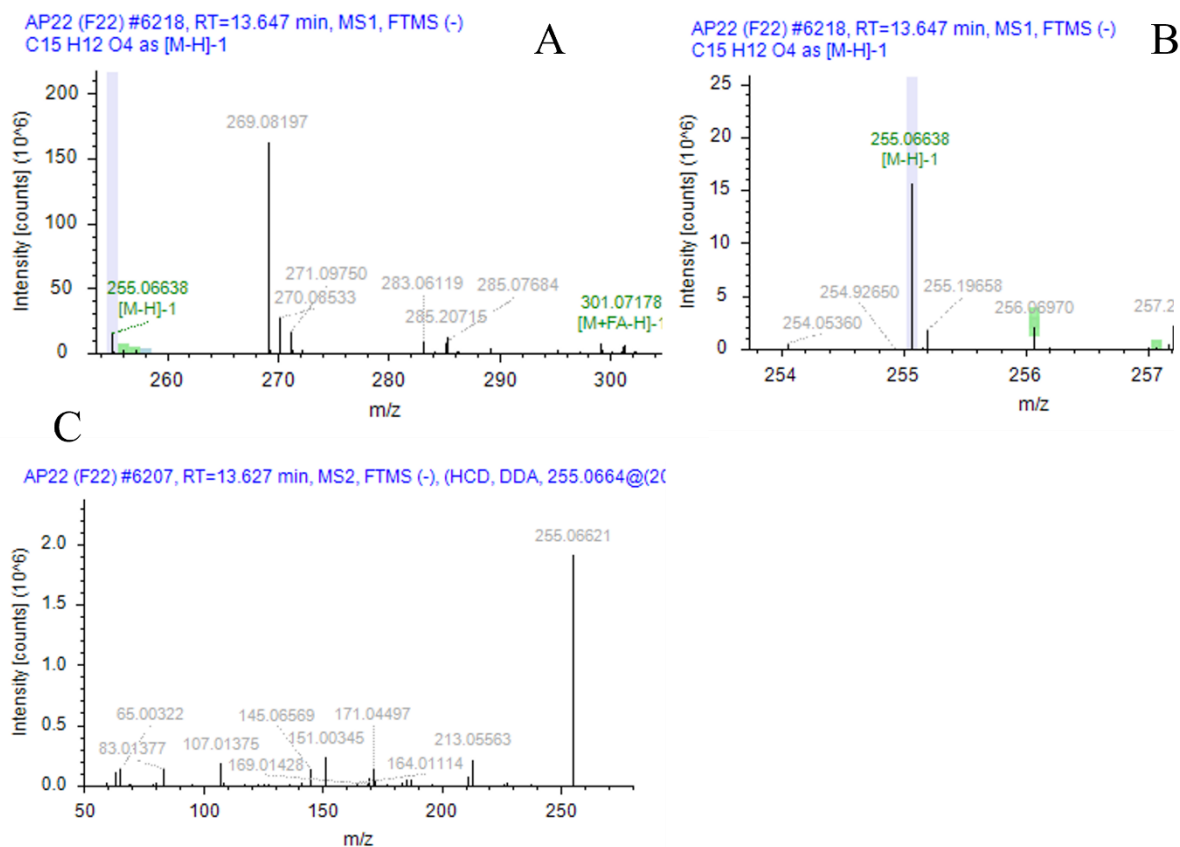


Figura A15: Formononetina. (A) *Full scan* da amostra, destacando o íon de m/z 267,06628; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 267,06628; (C) espelho comparando a fragmentação experimental com o espectro de formononetina disponível no MzCloud.

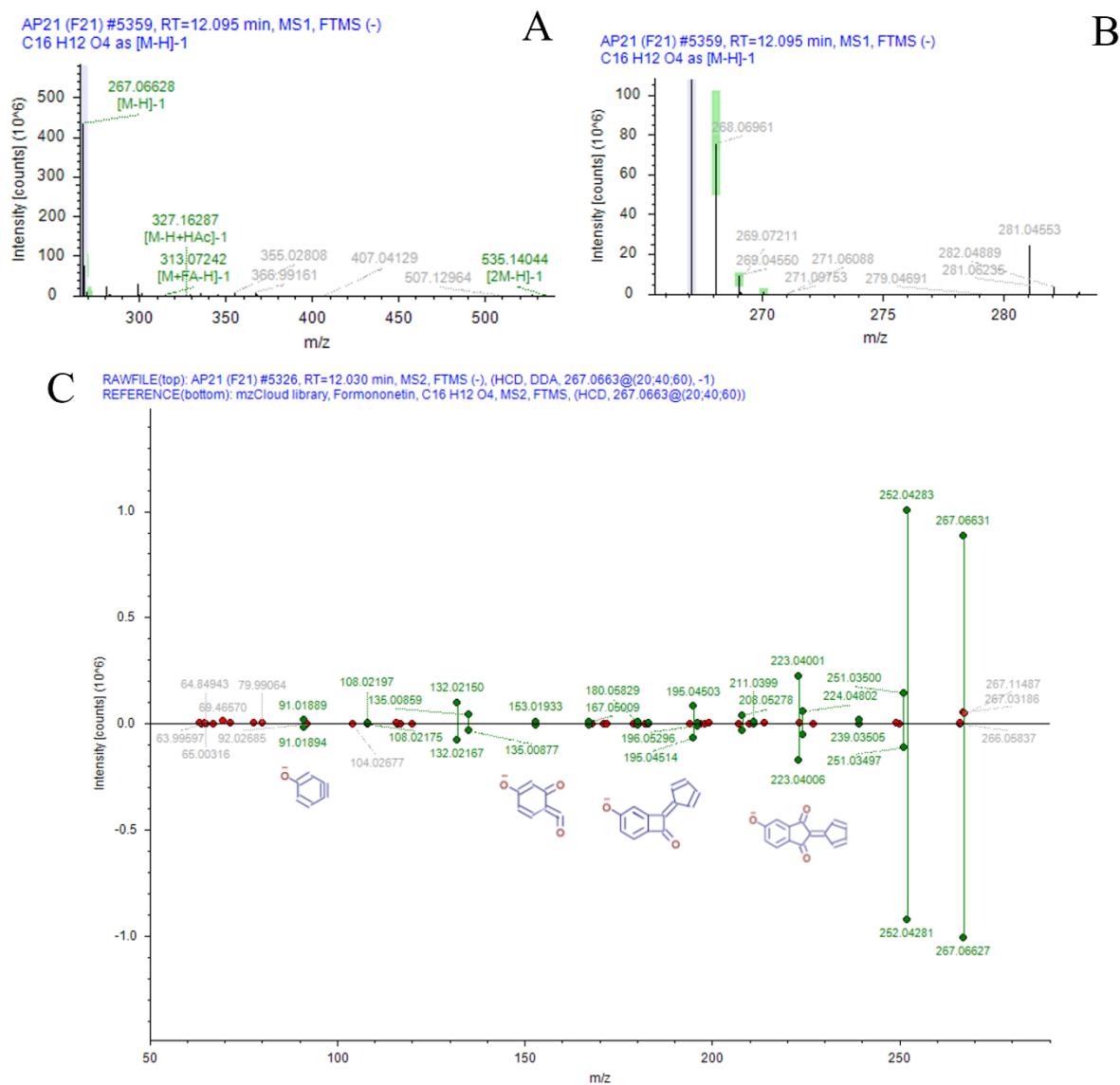


Figura A16: Vestitol. (A) *Full scan* da amostra, destacando o íon de m/z 271,09766; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 271,09766; (C) espectro de fragmentação do íon de m/z 271,0978.

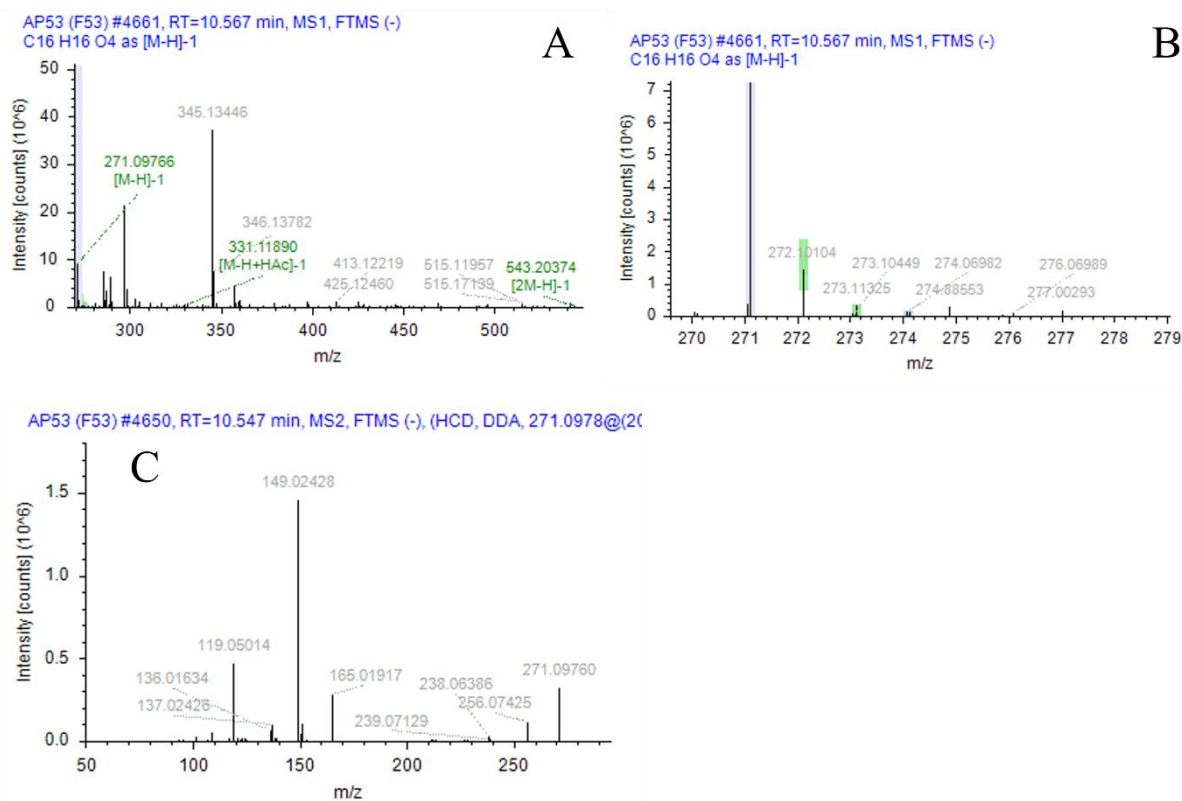


Figura A17: Neovestitol. (A) *Full scan* da amostra, destacando o íon de m/z 271,09778; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 271,09778; (C) espectro de fragmentação do íon de m/z 271,0977.

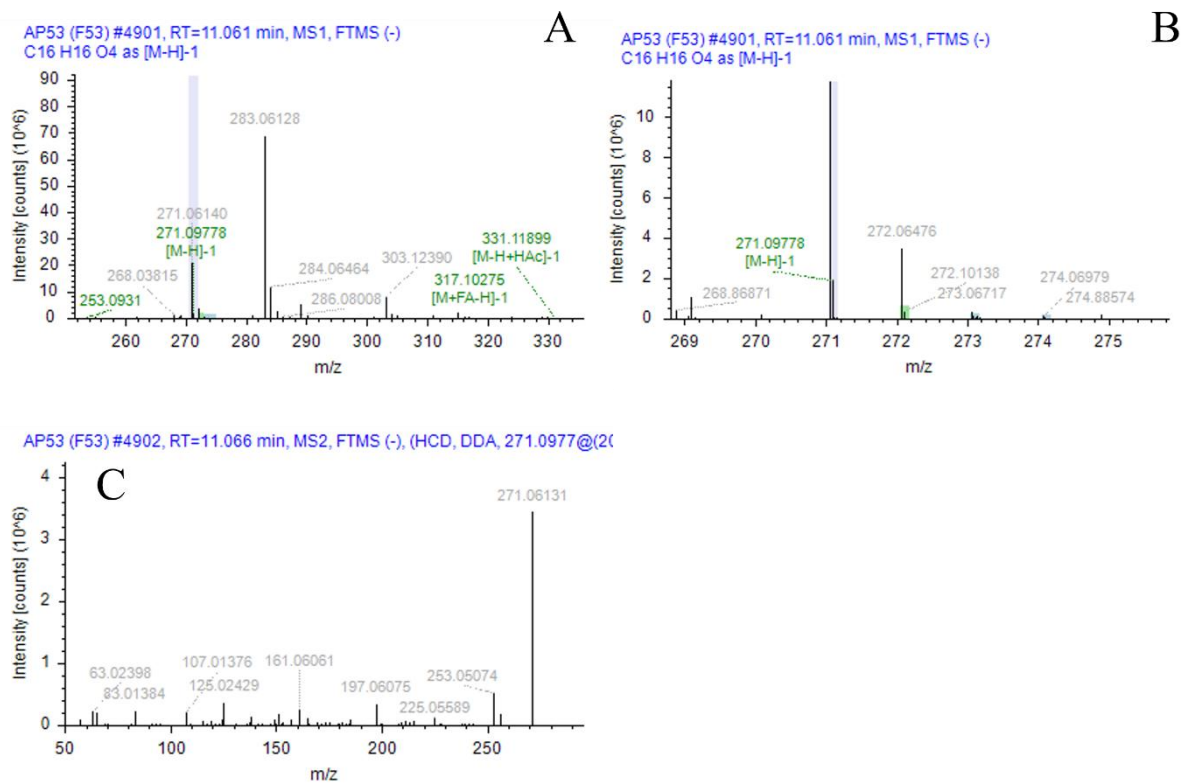


Figura A18: Medicarpina. (A) *Full scan* da amostra, destacando o íon de m/z 269,08182; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 269,08182; (C) espectro de fragmentação do íon de m/z 269,0815.

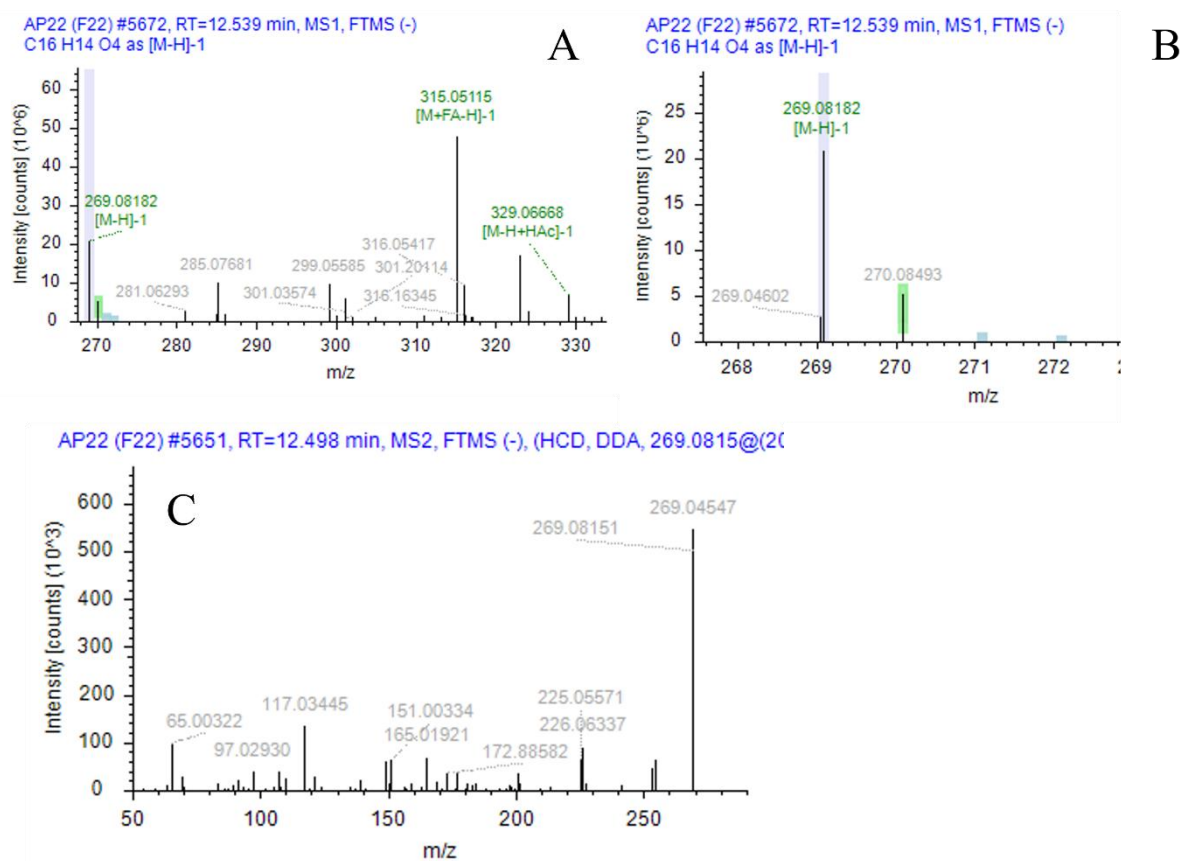


Figura A19: Biochanina A. (A) *Full scan* da amostra, destacando o íon de m/z 283,06116; (B) distribuição isotópica do íon de m/z 283,06116; (C) espectro de fragmentação do íon de m/z 283,0975.

