



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

PAULO HERBESSON PEREIRA DE SOUSA

ECOLOGIA QUÍMICA COMO UM MEDIADOR NA ATRATIVIDADE DE FÊMEAS
***Centris analis* (HYMENOPTERA, APIDAE) PARA COLONIZAÇÃO DE NINHOS,**
CRIAÇÃO E MANEJO

FORTALEZA

2017

PAULO HERBESSON PEREIRA DE SOUSA

ECOLOGIA QUÍMICA COMO UM MEDIADOR NA ATRATIVIDADE DE FÊMEAS
Centris analis (HYMENOPTERA, APIDAE) PARA COLONIZAÇÃO DE NINHOS,
CRIAÇÃO E MANEJO

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.
Área de concentração: Produção e Melhoramento Animal.

Orientador: Prof. PhD. Breno Magalhães Freitas.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S698e Sousa, Paulo Herbesson Pereira de.
Ecologia química como um mediador na atratividade de fêmeas *Centris analis* (Hymenoptera, Apidae) para colonização de ninhos, criação e manejo / Paulo Herbesson Pereira de Sousa. – 2017.
55 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Breno Magalhães Freitas.
Coorientação: Prof. Dr. Cláudia Inês da Silva.
1. HS-SPME-GC-MS. 2. Ecologia química. 3. Compostos voláteis. 4. *Centris analis*. I. Título.
CDD 636.08
-

PAULO HERBESSON PEREIRA DE SOUSA

ECOLOGIA QUÍMICA COMO UM MEDIADOR NA ATRATIVIDADE DE FÊMEAS
Centris analis (HYMENOPTERA, APIDAE) PARA COLONIZAÇÃO DE NINHOS,
CRIAÇÃO E MANEJO

Dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção título de Mestre em Zootecnia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências e Tecnologia da referida Universidade.

Área de concentração: Produção e Melhoramento Animal.

Aprovada em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof. PhD. Breno Magalhães Freitas (ORIENTADOR)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Cláudia Inês da Silva (COORIENTADORA)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Guilherme Julião Zocolo

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Dr. Guaraci Duran Cordeiro

Universidade de São Paulo (USP)

*A Deus,
À minha família
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e à nossa senhora de Fátima, por estarem sempre comigo, confortando-me e guiando-me durante todo este caminho.

À minha esposa e companheira de jornada, Isabelle, por toda a paciência e compreensão, por tudo, muito obrigado.

À minha família (pais, irmãos, sobrinhos e primos) por todos valores ensinados, e por estarem sempre ao meu lado à disposição para ajudar.

À professora Dra. Cláudia Inês da Silva por sua dedicação, ensinamentos e empenho por sua orientação de qualidade.

Ao Dr. Guilherme Julião Zocolo por ser uma pessoa tão bondosa e de um espírito tão elevado, serei eternamente grato pela sua orientação que veio a amenizar em muito as dificuldades desse percalço com seus conselhos, não só para este estudo, mas para toda a vida.

Ao professor Dr. Breno Magalhães Freitas pelos ensinamentos, conselhos e colaboração para finalização deste trabalho.

Ao Dr. Guaraci Duran Cordeiro, por sua disponibilidade em participar da banca examinadora.

A todos os amigos do Grupo de Pesquisas com Abelhas, que sempre estiveram à disposição para colaborar: Diego Melo, Hiara Marques, Epifânia Rocha, João Paulo Muniz, Elton Melo, Vitor Monteiro e Jameson Guedes.

Aos amigos Gercy Soares Pinto, Isac Bomfim, Leonardo Gurgel, Jânio Félix, e Irailde Lima, obrigado por tudo.

A minha amiga Natália Brito, por sua ajuda para realização deste trabalho, muito obrigado pela amizade.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA, pelo suporte oferecido durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) por conceder-me essa bolsa de estudos, possibilitando minha qualificação profissional.

A todos do Laboratório de Multiusuário de Química de Produtos Naturais, especialmente a Tigressa Helena por sua ajuda inestimável para a realização deste trabalho, seu profissionalismo é incontestável.

Aos servidores públicos que trabalham no Setor de Abelhas que colaboram com os nossos trabalhos, Sr. Francisco, Hélio e Dr. Deoclécio.

*“ Mas não há uma formula mágica que nos faça
chegar à força sem que antes tenhamos provado
a fraqueza”*

(Pe. Fábio de Melo)

RESUMO

A criação e o manejo de abelhas *Centris analis* é facilitada pela utilização de ninhos armadilha, porém há poucas pesquisas sobre os fatores que possam influenciar no processo de atração de fêmeas fundadoras. O presente estudo teve como objetivo identificar os compostos orgânicos voláteis (COVs) presente no ninho de *C. analis*, utilizando a microextração em fase sólida (SPME) a fim de conhecer tais compostos e as variações na sua composição química. Este estudo buscou também, otimizar um método para extração dos COVs a partir de amostras do alimento de imaturos de *C. analis*. Utilizou-se três tipos de fibras: PDMS (Polidimetilsiloxano) apolar, CAR/PDMS (Carboxen/Polidimetilsiloxano) bipolar e DVB/CAR/PDMS (Divinilbenzeno/Carboxen/Polidimetilsiloxano) bipolar. Foram identificados 27 compostos pertencentes a cinco classes químicas. Entre os compostos, *trans*-nerolidol (67,15%) detectado pela fibra PDMS, hexanal (12,72%) e acetato de 3-metil-1-butanol (10,95 %) detectados pela fibra CAR/PDMS, foram os compostos de maior representatividade para esta amostra. A fibra CAR/PDMS foi mais seletiva, extraíndo 20 compostos, DVB/CAR/PDMS e PDMS, 17 e 10 respectivamente. A fibra CAR/PDMS mostrou-se como mais indicada para extração de COVs em ninhos de *Centris analis*. Utilizando-se a fibra CAR/PDMS, foram identificados 40 COVs pertencentes a nove classes químicas em amostra de alimento, óleo e resina, ninho usado e lavas. Os compostos majoritários *cis*- β -ocimeno (35,7%), 2-Etil-1-hexanol (30,24%), *p*-xileno (24,59%) e 1-Octanol (20,63%), foram detectados em amostra de óleo e resina, ninho usado e lavas respectivamente. Verificamos que há uma variação na diversidade de composto voláteis segundo o desenvolvimento larval e do ninho e que determinados compostos permanecem no ninho após a emergência.

Palavras-chave: HS-SPME-GC-MS. Ecologia química. Compostos voláteis. *Centris analis*.

ABSTRACT

Raising and managing *Centris analis* bees is facilitated by the use of trap nests, however, there is few number of research regarding factors that may influence the process of attracting nest-founding females. The present study aimed to identify volatile organic compounds (VOCs) existing in nests of *C. analis*, by employing the solid-phase microextraction (SPME) in order to learn about those compounds and variations of their chemical composition. This study also intended to optimize an extraction method for VOCs in food samples of immature *C. analis*. We made use of three types of fiber: apolar PDMS (Polydimethylsiloxane), bipolar CAR/PDMS (Carboxen/Polydimethylsiloxane), and bipolar DVB/CAR/PDMS (Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane). We identified 27 compounds bellowing to those chemical classes. Among the compounds; *trans*-nerolidol (67,15%), detected by the PDMS fiber; hexanal (12,72%) and 3-methyl-1-butanol acetate (10,95%), detected by CAR/PDMS fiber; were the most representative for this sample. CAR/PDMS fiber was more selective extracting 20 compounds, DVB/CAR/PDMS and PDMS, 17 and 10 respectively. CAR/PDMS proved to be the most suitable for the extraction of VOCs in nests of *Centris analis*. When using CAR/PDMS fiber, we identified 40 VOCs belonging to nine chemical classes in food samples, oil and resin, used nest, and larvae. The major compounds *cis*- β -ocimene (35,7%), 2-Ethyl-1-hexanol (30,24%), *p*-xylene (24,59%) and 1-Octanol (20,63%), were detected in samples of oil, resin, used nest, and larvae, respectively. We noticed an existing variation in the diversity of volatile compounds according to larval and nest development, besides, certain compounds linger in the nest after emergence.

Keywords: HS-SPME-GC-MS. Chemical ecology. Volatile compounds. *Centris analis*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO PARA A CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS ENCONTRADOS NO ALIMENTO DE IMATUROS DE <i>Centris analis</i> (HYMENOPTERA, APIDAE, CENTRIDINI).....	14
3 ECOLOGIA QUÍMICA COMO UM MEDIADOR NA ATRATIVIDADE DE FÊMEAS <i>Centris analis</i> (HYMENOPTERA, APIDAE).....	30
REFERÊNCIAS.....	44

A tribo Centridini

As abelhas da tribo Centridini apresentam distribuição exclusivamente neotropical, ocorrendo desde o México até a sul da América do Sul (MOURE et al., 2012). Essa tribo é composta por dois gêneros: *Centris*, constituído por 235 espécies e *Epicharis*, por 35 espécies (VIVALLO et al., 2013). As espécies de ambos os gêneros apresentam hábito solitário, onde cada fêmea após a cópula constrói seu próprio ninho, com um número de células de cria variáveis, aprovisiona, bota o ovo e por último fecha cada uma das células. Nesse tipo de nível de socialidade, as fêmeas depois da construção dos ninhos morrem antes de suas crias emergirem, ou seja, não há contato entre gerações. As abelhas dessa tribo possuem um tamanho corporal que varia entre o médio a grande, a maioria é pilosa e geralmente voa muito rápido (MICHENER, 2007). Essas abelhas constroem seus ninhos em barrancos, solo plano, cavidades pré-existentes em madeira ou construção civil e termiteiros (FRANKIE et al., 1993; AGUIAR; GAGLIANONE, 2003). De maneira geral, as abelhas visitam as flores para coletar néctar e/ou pólen. Mas, além dessas recompensas mais comuns, algumas espécies de plantas produzem em suas flores recursos menos usuais, como óleos, resinas e fragrâncias que são coletados por polinizadores mais especializados (SIMPSON; NEFF, 1981). A tribo Centridini representa o grupo com maior número de espécies coletoras de óleos florais e é responsável por 73% de todas as visitadas registradas para as flores produtoras de óleos (MACHADO, 2004). Espécies das Famílias Iridaceae, Krameriaceae, Malpighiaceae e Orchidaceae são comumente visitadas e polinizadas por abelhas Centridini. Essas plantas possuem estruturas produtoras de óleos florais, denominadas elaióforos (VOGEL, 1990; COCUCCI et al., 2000).

A maioria das abelhas Centridini são especializadas na coleta de óleos florais. Para isso, as fêmeas apresentam estruturas morfológicas adaptadas que possibilita a coleta e o transporte desse recurso. Tais estruturas especializadas são encontradas nas pernas ou esternos (Tapinotaspoides) e são formadas por modificações na forma e tamanho de alguns segmentos, particularmente pela diferenciação na pilosidade (VOGEL, 1969; ALVES-DOS-SANTOS et al., 2000). Geralmente, os óleos florais são coletados pelas fêmeas e usados na construção dos ninhos para a impermeabilização das células de crias (GAGLIANONE, 2005). Mas, o óleo floral também pode ser usado como alimento e é reconhecidamente uma fonte mais energética do que o néctar (VOGEL, 1974; BUCHMANN, 1987; VINSON et al., 2006). Algumas espécies do gênero *Centris* substituem ou adicionam ao néctar o óleo floral, para alimentação das larvas. Porém, não são todas as abelhas Centridini que usam esse recurso na alimentação de suas crias.

Com relação a sua dieta, as abelhas Centridini são poliléticas, entretanto, algumas espécies apresentam um comportamento mais seletivo na coleta de recurso floral preferencialmente em algumas espécies de plantas, como por exemplo, das famílias Malpighiaceae, Melastomataceae, Leguminosae-Caesalpinioideae e Solanaceae (AGUIAR et al., 2003; RIBEIRO et al., 2008; GAGLIANONE, 2001; SILVA et al., 2017).

Centris analis

A espécie *Centris (Heterocentris) analis* (Fabricius, 1804) está presente na América do Sul e América Central. No Brasil, algumas espécies do gênero *Centris* foram reconhecidos em diversos ecossistemas, dentre eles, dunas, restinga, caatinga e cerrado (SILVA et al., 2001; VIANA et al., 2002; GAGLIANONE, 2003; RAMOS et al., 2007).

Os hábitos de nidificação de *Centris* são bastante diversificados e espécies dos subgêneros *Hemisiella*, *Heterocentris* e *Xanthemisia*, nidificam em cavidades preexistentes, tais como ninhos de vespas abandonados, buracos em madeira, em paredes de construções civis e termiteiros abandonados (AGUIAR et al., 2006). O hábito de nidificar em cavidades preexistentes possibilitou o uso de ninhos-armadilha feitos com cavidades artificiais em vários tipos de substratos, como gomos de bambu, madeira perfurada, tubos de cartolina etc. Isso fez com que ampliasse significativamente o conhecimento da biologia dessas abelhas (JESUS; GARÓFALO, 2000). Os requisitos de habitat de *C. analis* inclui locais de nidificação, material para a nidificação e recursos alimentares. As populações desta abelha podem ser aumentadas colocando os ninhos-armadilha em áreas de interesse. Os locais de nidificação são frequentemente um fator limitante para a frequência do polinizador na área se comparado a outros fatores como fontes de pólen e néctar (STEFFAN-DEWENTER et al., 2008).

Importância ecológica e econômica de *Centris analis*

As abelhas são reconhecidamente os polinizadores mais importante em vários ecossistemas no planeta, sendo representadas por uma riqueza estimada entre 20 e 30 mil espécies (MICHENER, 2000), que diferem na forma e na variedade de plantas que visitam e polinizam. As abelhas do gênero *Centris* são importantes polinizadores de numerosas espécies de plantas nativas e cultivadas.

No Brasil, podemos citar o Muricizeiro (*Byrsonima crassifolia* L. Kunth, Malpighiaceae) (REGO et al., 2006), Cajueiro (*Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae) (FREITAS; PAXTON, 1998), Aceroleira (*Malpighia emarginata* DC., Malpighiaceae) (VILHENA et al., 2012), Tamarineiro (*Tamarindus indica* L., Leguminosae) e Goiabeira (*Psidium guajava* L., Myrtaceae) (BOTI, 2011).

A aceroleira (*Malpighia emarginata*, Malpighiaceae) é uma frutífera, originária das Antilhas, América Central e norte da América do Sul (NEVES et al., 2002). Área de cultivo de acerola, no Brasil é superior a 11 mil hectares, sendo o maior consumidor e exportador do mundo. Entre os estados Brasileiros, Pernambuco destaca-se como principal produtor representando 23,11% da produção nacional, seguido pelos estados do Ceará, 14,32%, e São Paulo, com 11,40%. Quando analisamos somente a região Sudeste, o Estado de São Paulo é que tem maior participação, com 74,26%, seguida pelo Estado de Minas Gerais, com 19,32% (IBGE, 2007). É uma espécie dependente de polinização cruzada para produção satisfatória de frutos, sendo as abelhas solitárias *Centris*, um dos principais e mais eficientes agentes polinizadores desta cultura (SAZAN et al., 2014). Em um estudo feito por Oliveira e Schlindwein (2009), os autores indicam *Centris analis* como um potencial polinizador a ser manejado em áreas de cultivos de aceroleira. Magalhães e Freitas (2013), foram os primeiros a fazer polinização dirigida com estas abelhas, utilizando ninhos armadilhas.

Devido a importância de *C. analis* na produção de frutos da aceroleira, estudos vêm se intensificando para aprimorar as técnicas de manejo dessa abelha. Apesar de existirem trabalhos que enfatizam o uso de ninhos armadilhas em pomares de acerola (OLIVEIRA; SCHLINDWEIN, 2009; MAGALHÃES; FREITAS, 2013), não há na literatura trabalhos que tenha utilizado técnicas de manejo para atratividade de fêmeas para a colonização de novos ninhos, buscando incrementar a população em áreas nativas ou cultivadas. Nesse sentido, o presente estudo busca analisar aspectos da ecologia química de *C. analis* de forma a contribuir com os processos de atratividade envolvidos no processo de nidificação e reprodução dessa abelha.

2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO PARA A CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS ENCONTRADOS NO ALIMENTO DE IMATUROS DE *Centris analis* (HYMENOPTERA, APIDAE, CENTRIDINI)

RESUMO

Vários estudos têm demonstrado a importância de abelhas solitárias como o *Centris analis* na polinização de espécies de plantas silvestres e cultivadas. A presença desses polinizadores é facilitada pela introdução de ninhos armadilhas, porém estudos ainda são limitados sobre os fatores que influenciam sua escolha para locais de nidificação. Este estudo tem como objetivo testar três tipos de fibras de microextração em fase sólida (SPME) no desenvolvimento de um método de extração de COVs presente no alimento de imaturos *Centris analis*. A extração e caracterização foram realizadas utilizando o método HS-SPME GC-MS, microextração em fase sólida associada a cromatografia gasosa e espectrometria de massa, utilizando-se três tipos de fibras: polidimetilsiloxano (PDMS), divinilbenzeno /carboxen /polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) e carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS). Foram identificados 27 COVs, pertencentes a 5 classes químicas. Alguns COVs foram extraídos somente por um tipo de fibra, entre os compostos, *trans*-nerolidol (67,15%) detectado pela fibra PDMS, hexanal (12,72%) e acetato de 3-metil-1-butanol (10,95 %) detectados pela fibra CAR/PDMS apresentaram maior intensidade. A fibra CAR/PDMS foi mais seletiva, extraíndo 20 compostos, seguida pela DVB/CAR/PDMS e PDMS, que extraíram 17 e 10 COVs respectivamente. O presente estudo verificou que a metodologia usada para avaliar a eficiência de fibras mostrou que a CAR/PDMS é a mais indicada para extração de COVs em ninhos de *C. analis*.

Palavras-chave: HS-SPME-GC-MS. Otimização do método. Fibras de extração.

ABSTRACT

Several studies have demonstrated the importance of solitary bees such as *Centris analis* in pollination of wild and cultivated plant species. The presence of these pollinators is encouraged when trap nests are placed, however, there are still limited studies about the factors that influence their choices of nesting sites. This study aims to test three types of solid-phase microextraction (SPME) fiber in order to develop an extraction method of VOCs present in the food of immature *Centris analis*. The extraction and characterization were performed by the means of the HS-SPME GC-MS method, solid-phase microextraction associated with gas chromatography and mass spectrometry, utilizing three types of fiber: polydimethylsiloxane (PDMS), divinylbenzene/ carboxen/ polydimethylsiloxane (DVB/ CAR/PDMS) and carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS). We identified 27 VOCs belonging to 5 chemical classes. Some VOCs were extracted only by one type of fiber, among the compounds, *trans*-nerolidol (67,15%) detected by the PDMS fiber, hexanal (12,72%) and 3-methyl-1-butane acetate (10,95%) detected by the CAR/PDMS fiber, showed greater intensity. CAR/PDMS fiber was more selective, extracting 20 compounds, followed by DVB/CAR/PDMS and PDMS, which extracted 17 and 10 VOCs respectively. In the present study we verified that the methodology employed to assess the efficiency of fibers showed that CAR/PDMS is the most suitable for extraction of VOCs in nests of *C. analis*.

Keywords: HS-SPME-GC-MS. Method optimization. Extraction fibers.

INTRODUÇÃO

As abelhas Centridini, apresentam um papel importante na polinização de espécies nativas e cultivadas como Muricizeiro (*Byrsonima crassifolia*, L. Kunth, Malpighiaceae) (REGO et al., 2006), Cajueiro (*Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae) (FREITAS; PAXTON, 1998), Aceroleira (*Malpighia emarginata* DC, Malpighiaceae) (VILHENA et al., 2012) e Tamarindeiro (*Tamarindus indica* L., Leguminosae) (CASTRO, 2002). Estudos em biologia de nidificação vêm sendo intensificados, principalmente com espécies do gênero *Centris* que nidificam em cavidades pré-existentes. Esse comportamento de nidificação permitiu o desenvolvimento de ninhos-armadilha, o que possibilitou o estudo do comportamento e biologia destas abelhas (JESUS; GARÓFALO, 2000). Usando tais ninhos foi possível, por exemplo, estudar *Centris analis* e identificá-la como um potencial polinizador a ser manejado em áreas de cultivos da aceroleira (OLIVEIRA; SCHLINDWEIN, 2009; VILHENA; AUGUSTO, 2007; MAGALHÃES; FREITAS, 2013). Porém, para criar e manejar abelhas é necessário primeiramente atraí-las até os ninhos-armadilha para assim, manter um número razoável de indivíduos na população (JESUS; GARÓFALO, 2000). Nesse sentido, há poucos estudos que apontam os fatores que influenciam o encontro e a escolha dos locais de nidificação pelas fêmeas, que poderiam permanecer nas áreas cultivadas (MORATO; MARTINS, 2006).

Em estudos anteriores (GUÉDOT et al., 2006; VINSON et al., 2011), sugeriram que compostos voláteis presentes nos ninhos desempenhariam um papel na atração das fêmeas fundadoras para a construção de novos ninhos. Essa descoberta pode ter implicações importantes, pois durante o início da colonização dos ninhos-armadilha, a velocidade de ocupação pode ser um fator determinante para o sucesso na polinização e produção em frutíferas, como por exemplo, a aceroleira (OLIVEIRA; SCHLINDWEIN, 2009). Compostos voláteis também estariam envolvidos no reconhecimento do próprio ninho por abelhas solitárias que nidificam em aglomerações (WCISLO, 1992). Além disso, eles facilitariam o encontro dos ninhos por parasitoides, conforme observado em ninhos de *Osmia lignaria* (Megachilidae) (GLASSER; FARZAN, 2016). Nesse sentido, a ecologia química tem sido importante pois permite o reconhecimento e a identificação dos compostos orgânicos voláteis envolvidos com a atração para sítios já utilizados, reconhecimento dos ninhos e parasitismo.

Nas últimas décadas uma variedade de sistemas tem sido desenvolvida para a coleta e análise desses compostos. Essas análises têm sido melhoradas pela criação de instrumentos de bancada relativamente baratos, mais aplicáveis à técnica de cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (THOLL et al., 2006).

A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica de extração que se destaca por sua praticidade em termos de tratamento da amostra, pois não há necessidade de a amostra passar por uma limpeza rigorosa e evita o emprego de solventes orgânicos (VALENTE, 2000; DÓREA, 2008). Sua aplicação é generalizada em muitas análises, tais como matrizes ambientais, alimentos, forense e farmacêutica (BOJKO et al., 2012; SILVA, 2016). Além disso, devido à sua capacidade de pré-concentração de analitos, baixos limites de detecção podem ser facilmente alcançados com esta técnica, uma vez que utiliza um revestimento polimérico que favorece a extração. Em trabalho de revisão, THOLL et al., (2006) descreve uma variedade de fibras de SPME capazes de adsorver compostos orgânicos voláteis com ampla faixa de polaridade e com diferentes massas moleculares. Este método é vantajoso na amostragem de compostos orgânicos voláteis que possuem baixos fatores de emissões, muitas vezes associados a baixas concentrações. Outra vantagem dessa técnica é a eliminação do emprego de solventes que podem introduzir impurezas aos resultados.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo otimizar um método para extração de compostos orgânicos voláteis (COVs) a partir do alimento de imaturos de *C. analis*, usando a microextração em fase sólida (SPME), a fim de conhecer de tais compostos e as variações na sua composição química. Esse estudo subsidiou outro que envolveu a identificação dos compostos voláteis em ninhos de *C. analis* em diferentes fases de sua construção e do desenvolvimento larval (SOUSA et al., cap. III).

MATERIAIS E MÉTODOS

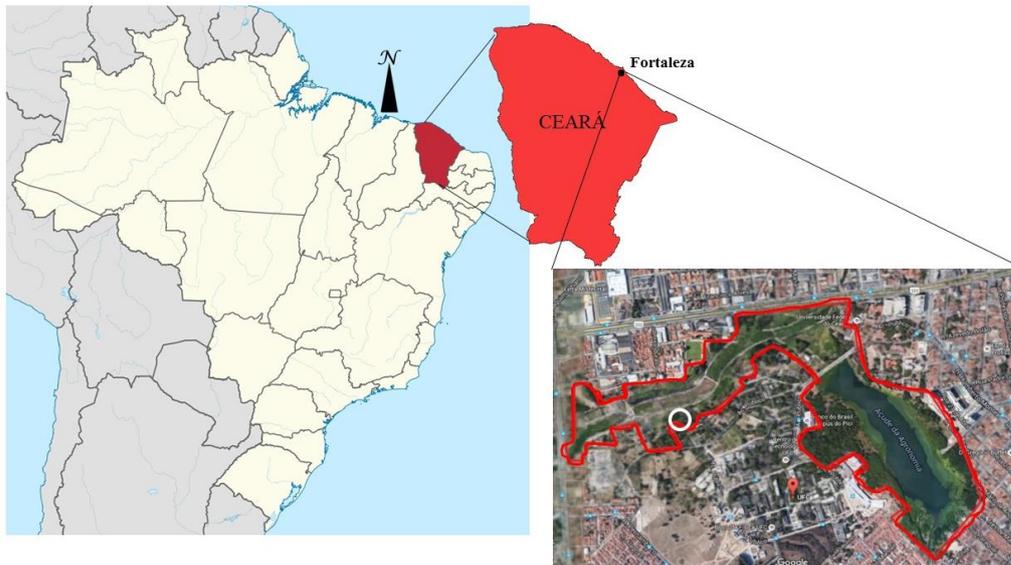
Área de Estudo

Este estudo foi desenvolvido no Setor de Abelhas do Departamento de Zootecnia no campus da Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza (3° 44' 33" S; 38° 34' 44" O) (Figura 1), e no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais LMQPN-EMBRAPA no período de maio a agosto de 2016.

O clima da região é caracterizado como Aw' tropical quente subúmido (KÖPPEN, 1948), com período chuvoso ocorrendo de janeiro a maio, pluviosidade e média de 1338,0 mm e temperatura média anual de 27°C (FUNCEME, 2015).

A vegetação original da área é do tipo tabuleiro pré-litorâneo com fisionomia de floresta semidecídua e mata de tabuleiro (MORO et al., 2015), atualmente a área é composta por vegetação original, mas também por espécies nativas e exóticas usadas no paisagismo (RCPol-Rede de Catálogos Polínicos, 2013).

Figura 1. Localização da área de estudo. A figura a direita mostra o campus da Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza- Ceará.



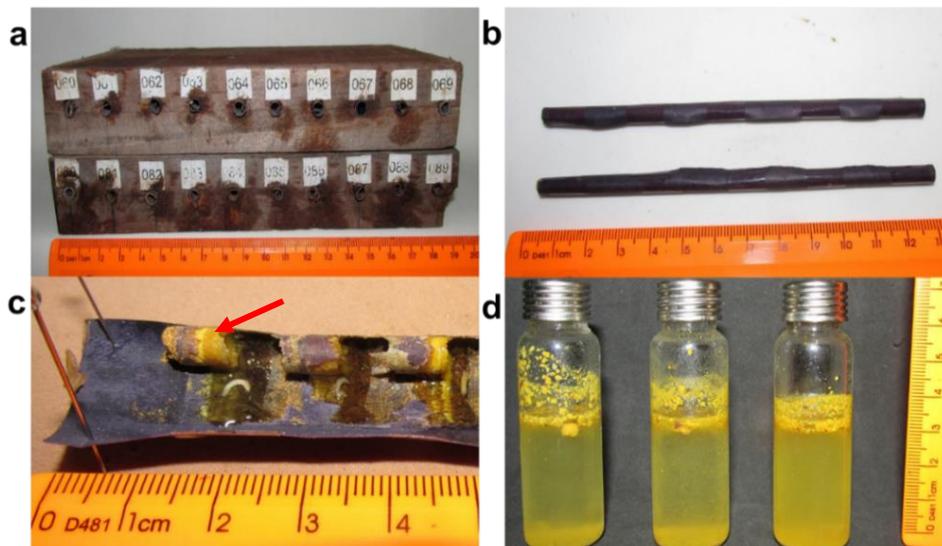
Fonte: Google imagens

Coleta do Material Biológico

Para a coleta do material biológico foram usados ninhos-armadilha preparados com tubos de cartolina preta com 0,8cm de diâmetro e comprimento de 12cm inseridos em orifícios feitos em blocos de madeira, como sugerido por CAMILLO et al. (1995) (Figura 2 a-b). Após o processo de operculação dos ninhos pelas fêmeas de *Centris analis*, foram coletados um total de 10 ninhos armadilhas para a coleta de alimento de imaturos (Figura 2c).

Foram usadas espátulas previamente esterilizadas para retirar as amostras de alimento e as mesmas foram acondicionadas em frascos de vidro de 20ml, selado com tampas de rosca contendo septos de silicone/PTFE (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) (Figura 2d).

Figura 2. Métodos usados para a extração dos compostos voláteis em ninhos-armadilhas ocupados por fêmeas de *Centris analis*. (a) Blocos de madeira com tubos de cartolina inseridos (b) Tubos de cartolina com 0,8cm de diâmetro e 13 cm de comprimento (c) Alimento de imaturos (d) Amostras prontas para extração por headspace-SPME.



Fonte: Autor.

As amostras foram homogeneizadas e pesadas em balança analítica (AY220 marte®) Posteriormente, foram acondicionadas em ultra-freezer vertical (CL 600®) do Laboratório de Multiusuário de Química de Produtos Naturais LMQPN-EMBRAPA, até obter uma quantidade de amostras suficiente para as avaliações em quintuplicata.

Preparação e Análise Química das Amostras

Para as análises foram adicionados a cada amostra 8mL de água Mili-Q (Merck Millipore®), 3g de NaCl, e cerca de $1,054 \pm 0,07$ g da amostra de alimento de imaturos, as análises foram realizadas em quintuplicata, separando-se sempre uma amostra controle constituída por 8mL de H₂O e 3g de NaCl. Foram avaliados três tipos de fibras de revestimentos de diferentes polaridades: CAR/PDMS polaridade mista (Carboxen/Polidimetilsiloxano) 75µm de 1cm, PDMS (Polidimetilsiloxano) apolar 10µm de 1cm, DVB/CAR/PDMS polaridade mista (Divinilbenzeno/ Carboxen/Polidimetilsiloxano) 50/30µm de 2cm, todas as fibras da marca Supelco, Belafonte, PA, EUA. O procedimento de extração por SPME foi conduzido em amostrador automático (Pal System, Zwingen, Suíça) acoplado ao sistema GC-MS. Inicialmente a amostra foi submetida à formação do headspace por aquecimento à 60°C por 15 minutos, para posterior captura dos COVs durante 30 minutos. Em seguida, os compostos foram desorvidos no GC durante 3 minutos. Posteriormente, a fibra foi submetida ao procedimento de limpeza com fluxo de Hélio por 10 minutos na temperatura indicada pelo fabricante variando de acordo com a fase estacionária da fibra (240°C/30 min para PDMS, 260°C/60 min para DVB/CAR/PDMS e 290°C/60 min CAR/PDMS).

A identificação dos compostos orgânicos voláteis foi realizada cromatógrafo a gás Modelo 7890B GC System (Agilent Technologies Spain, S.L., Madrid, Espanha) acoplado ao espectrômetro de massa Modelo 5977A MSD (Agilent Technologies Spain, S.L., Madrid, Espanha). Os compostos foram separados utilizando uma coluna capilar HP 5MS (Agilent J & W GC Columns, Santa Clara, CA, EUA) de 30m x 250µm x 0,25µm. As amostras foram injetadas no modo splitless e o gás de arraste foi o Hélio com uma vazão de 1 mL min⁻¹.

As temperaturas do injetor e do analisador foram 240° e 150°C, respectivamente. Programação forno cromatográfico: temperatura inicial de 40°C por 4 minutos, com rampa de aquecimento de 2,5°C.min⁻¹ até 80°C, 5°C.min⁻¹ até 110 °C, 10°C.min⁻¹ até 220 °C por 2 minutos e acréscimo de 10°C.min⁻¹ até 290°C permanecendo por 4 minutos ao término da corrida (50 minutos).

Os espectros de massa foram obtidos utilizando um sistema de analisador quadrupolar com ionização por impacto de elétrons a 70 eV. Os compostos foram identificados por comparação de seus espectros de massa com os contidos na biblioteca NIST 2.0, 2012 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Md, EUA), efetuada pela comparação do índice de retenção linear calculado equação de Kovats utilizando uma série homóloga de n-alcenos C8-C30 (Supelco, 49451-U, Bellefonte, PA, EUA) com os índices de retenção dos bancos de dados da NIST.

A seleção de diferentes fibras de microextração em fase sólida (SPME) foi o parâmetro escolhido para se realizar a otimização e caracterização dos COVs por meio da técnica de HS-SPME GC-MS (Figura 3) em amostras de alimento de *C. analis*. Diferentes polímeros de revestimento, com características distintas foram utilizados para avaliar a sua capacidade de extração.

Figura 3. Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa modelo Agilent Technologies.



Fonte: Rafaela Brito

Neste estudo foram adquiridas três fibras de SPME comercialmente disponíveis, baseadas nos seguintes recobrimentos poliméricos: (PDMS - apolar), (CAR/PDMS - bipolar) e (DVB/CAR/PDMS - bipolar). A escolha dessas fibras foi baseada em dados da literatura que relatam que fibras de SPME com mais de um revestimento Apolar e bipolares, mostraram ser as mais eficazes ao estudar plantas aromáticas (BICCHI et al., 2000, 2007), tais plantas possuem em geral classes de substâncias similares aquelas encontradas em estudos de ecologia química (THEIS E RAGUSO, 2005; WILLMER et al., 2009).

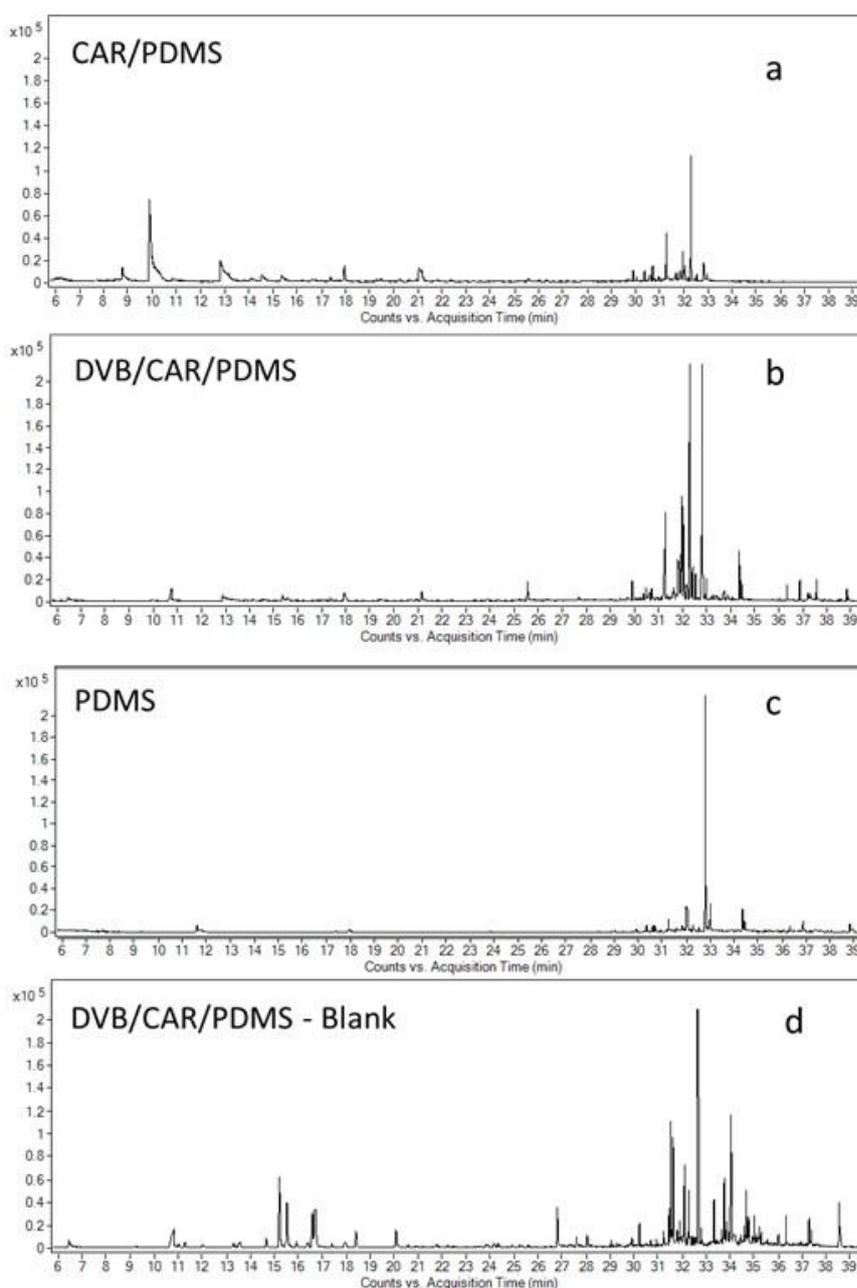
<i>Total ésteres (%)</i>	10,95		7,00		14,12		
<i>Cetona</i>							
6-Metil-5-hepten-2-ona	5,17 ± 0,89	990	2,14 ± 0,22	990	-	n.d	s.
<i>Total Cetona (%)</i>	5,17		2,14				
<i>Terpenos</i>							
<i>trans-β-ocimeno</i>	3,38 ± 1,05	1052	8,16 ± 1,00	1052	3,41 ± 0,64	105 2	s.
<i>trans-β-farneseno</i>	4,65 ± 1,19	1460	9,15 ± 1,90	1460	3,93 ± 0,91	146 0	s.
<i>α-(E,E)-farneseno</i>	-	n.d	-	n.d	7,35 ± 2,47	151 0	-
<i>α-Copaeno</i>	0,68 ± 0,37	1379	-	n.d	0,72 ± 0,22	137 9	n.s.
Cipereno	1,94 ± 0,36	1402	-	n.d	1,31 ± 0,71	140 2	s.
<i>α-Curcumeno</i>	1,27 ± 0,49	1487	-	n.d	-	n.d	-
<i>α-Muuroleno</i>	4,49 ± 1,28	1504	-	n.d	-	n.d	-
<i>β-Cariofileno</i>	2,87 ± 0,51	1425	3,01 ± 0,70	1424	2,00 ± 0,56	142 4	s.
<i>cis-calameneno</i>	5,47 ± 2,15	1531	-	n.d	-	n.d	-
<i>β-ciclocitral</i>	1,17 ± 0,26	1222	0,66 ± 0,20	1222	-	n.d	n.s.
<i>trans-nerolidol</i>	3,08 ± 1,52	1569	33,14 ± 4,23	1568	67,15 ± 7,82	156 8	s.
<i>Total terpenos (%)</i>	29,00		54,12		85,87		
<i>Número total COVs</i>	20		17		10		
<i>Área total em Counts dos COVs</i>	6,75 × 10 ⁶		1,13 × 10 ⁷		3,51 × 10 ⁶		

Nível de significância: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$; n.s. = não significativo. KI: índice de Kovats calculado para uma coluna capilar DB5MS (30m×0.25mm d.i., 1.4µm de espessura de filme) instalado em cromatógrafo a gás equipado com detector de espectrômetro de massas. Fonte: Autor.

O número total de substâncias extraídas em cada fibra, demonstra o respectivo somatório do percentual relativo das áreas e o somatório das áreas totais (Counts) de cada classe química de COVs nas fibras CAR/PDMS, DVB/CAR/PDMS E PDMS (Tabela 1). A extração por HS-SPME do alimento de *C. analis* utilizando a fibra CAR/PDMS extraiu 3 álcoois (12,16%), 5 aldeídos (31,99%), 1 éster (10,95%), 1 cetona (5,17%) e 10 terpenos (29,00%). A fibra DVB/CAR/PDMS extraiu 2 álcoois (3,53%), 6 aldeídos (26,89%), 3 ésteres (7,00%), 1 cetona (2,14%) e 5 terpenos (20,32%). A fibra PDMS, por sua vez, extraiu, 3 ésteres (14,12%) e 7 terpenos (85,87%) (Tabela 1). A fibra extratora CAR/PDMS foi mais seletiva quando comparada as demais, extraíndo 20 tipos dos COVs, seguida pela DVB/CAR/PDMS e PDMS, que extraíram 17 e 10 COVs respectivamente (Tabela 1).

Os cromatogramas obtidos para cada uma das fibras, nas condições de análise otimizadas estão representados na Figura 3a-c. Os picos de voláteis majoritários presentes em cada uma das fibras foram obtidos na mesma escala, na ordem de 2×10^5 counts para fins de comparação. A figura 3d, representa o cromatograma do branco (resultado da adsorção de vapores presentes na solução de H₂O e NaCl, na ausência da amostra) obtido da fibra DVB/CAR/PDMS. Demonstramos esse cromatograma em específico, pois neste caso houve um maior grau de degradação da fibra, gerando sinais de interferentes em altas intensidades

Figura 3. Eficiência na captura de voláteis majoritários extraídos do alimento de imaturos de *Centris analis*, no tempo de 30 minutos, utilizando-se três tipos de fibras e o branco DVB/CAR/PDMS.



Fonte: Autor

Alguns COVs foram extraídos somente por um tipo de fibra. O palmitato de metila, palmitato de etila, linolenato de metila e α -(*E,E*)-farneseno, foram extraídos apenas pela fibra apolar de PDMS. Outros dois compostos, salicilato de metila e acetato de 2-fenil-etila, foram extraídos somente pela fibra bipolar DVB/CAR/PDMS, enquanto que a fibra bipolar CAR/PDMS extraiu exclusivamente o 2-heptanol, α -curcumeno, α -muuroleno, e *cis*-calameneno. Outros COVs foram extraídos pelos três tipos de fibras, mas com o valor médio do percentual relativo de área diferente, como por exemplo, o *trans*-nerolidol, *trans*- β -ocimeno, *trans*- β -farneseno e β -cariofileno (Tabela 1). Em relação aos dados de seletividade e a eficiência de extração, a fibra CAR/PDMS extraiu 3 álcoois (2-heptanol, 3-Octen-1-ol, 1-Octanol) com percentual relativo de área total de 12,16%, enquanto a DVB/CAR/PDMS extraiu 2 álcoois (3-Octen-1-ol, 1-Octanol) a fibra PDMS não obteve seletividade para a classe química dos álcoois (Tabela 1).

Foram detectados 6 aldeídos ao todo dos quais 5 foram extraídos pela fibra CAR/PDMS, com destaque para 3 substâncias com os maiores percentuais relativos de área nessa fibra sendo elas o hexanal (12,72%), benzeno acetaldeído (6,51%) e nonanal (7,48%), o somatório da contribuição de todos os 5 aldeídos extraídos totalizou 31,99% para a CAR/PDMS. Com relação a DVB/CAR/PDMS, foram extraídos 6 aldeídos sendo as maiores contribuições relativas associadas ao benzeno acetaldeído com 9,32%, nonanal (6,93%) e decanal (4,92%), o somatório dos percentuais relativos de área de todos os aldeídos resultou em 26,89%. A fibra PDMS não foi seletiva para a classe química dos aldeídos em amostras de alimento. Com relação a classe química dos ésteres foram extraídos 1, 3 e 3 COVs em Car/PDMS, DVB/CAR/PDMS e PDMS nas proporções de 10,95, 7,00 e 14,12% respectivamente. Foi extraída uma única cetona (6-Metil-5-hepten-2-ona) em CAR/PDMS com percentual relativo de área de 5,17% e 2,14% em DVB/CAR/PDMS. Não houve seletividade em PDMS para cetonas nesse caso específico de matriz.

Os terpenos foram a classe de COVs mais numerosa, tendo sido detectadas 11 substâncias, sendo 10 delas em CAR/PDMS, as maiores contribuições de percentuais relativos de área o *trans*- β -ocimeno (3,38%), *trans*- β -farneseno (4,65%), α -Muuroleno (4,49%) e o *cis*-calameneno com 5,47%. A CAR/PDMS de forma geral apresentou o segundo maior somatório no que concerne ao percentual relativo de área para a classe dos terpenos, totalizando 29,00%.

A seletividade da DVB/CAR/PDMS para os terpenos ficou abaixo do registrado para as demais fibras, totalizando a extração de 5 COVs, sendo os percentuais relativos de área para o *trans*-nerolidol (33,14%), *trans*- β -ocimeno de 8,16%, *trans*- β -farneseno (9,15%) e β -Cariofileno (3,01%), o percentual relativo de área total resultou em 54,12%.

A fibra PDMS extraiu 7 COVs sendo os maiores percentuais relativos de área as moléculas do *trans*-nerolidol (67,15%), *trans*- β -ocimeno (3,41), *trans*- β -farneseno (3,93%) e o α -(*E,E*)-farneseno com 7,35%, o somatório de todos os percentuais relativos de área para a classe dos terpenos em PDMS resultou em 85,87%.

O desenvolvimento do método via HS-SPME-GC-MS forneceu resultados promissores no que diz respeito ao estudo dos COVs encontrados a partir do alimento de imaturos de *C. analis*. Esse estudo mostrou que os três tipos de fibras usadas extraíram um conjunto de COVs interessantes do ponto de vista de variabilidade química, pois foram detectadas 5 classes químicas de compostos diferentes.

Os melhores resultados foram obtidos com as amostras dissolvidas em 8 mL de água contendo 3 g de NaCl, o aumento da força iônica da amostra tem influência na eficiência da extração. Segundo Xiaogen Yang et al., (1994), a adição de sais causa uma redução da solubilidade das substâncias apolares facilitando a passagem dessas para a fase de vapor, assim o tempo de equilíbrio pode ser minimizado. Esse recurso é muito utilizado nas determinações de componentes de aromas (BICCHI et al., 2000; FITZGERALD et al., 2000; TORRENS et al., 2004; BICCHI et al., 2007). Nossos resultados estão de acordo com os trabalhos descritos acima, pois a eficiência de extração foi maior utilizando sal.

A eficiência de extração de COVs depende também da espessura da camada líquida da fibra e do tamanho do analito, que sofre influência do coeficiente de difusão. Assim, elevados valores de coeficiente de difusão dos analitos favorecem o equilíbrio de partição analito/fibra. A polaridade da fibra pode aumentar a interação dos analitos, mas é a espessura do revestimento que prevalece na retenção do analito (BOJKO et al., 2012; DÓREA, 2008). As fibras heterogêneas que apresentam polaridade mista, como DVB/CAR/PDMS e CAR/PDMS, são constituídas de sólidos porosos com revestimentos do tipo adsorvente, nos quais a extração é efetuada pela sorção dos analitos nos poros internos. Nestes, a adsorção ocorre devido as forças interativas de Van der Waals ou por ligações de hidrogênio. Esse tipo de revestimento apresenta um número limitado de sítios de adsorção e, nesse caso para analitos em altas concentrações, ocorre saturação da região disponível para adsorção e conseqüentemente ocorre a competição entre os analitos (VALENTE, 2000; DÓREA, 2008; PARREIRA; CARDEAL, 2005).

As fibras mistas CAR/PDMS e DVB/CAR/PDMS extraíram de duas a três vezes mais compostos orgânicos voláteis em intensidade total de área do que a fibra PDMS (6.75×10^6 , 1.13×10^7 vs. 3.51×10^6 counts respectivamente).

A fibra DVB/CAR/PDMS em relação a CAR/PDMS extraiu 1.67 vezes mais compostos orgânicos voláteis (1.13×10^7 vs. 6.75×10^6 counts). As Fibras mistas extraíram altas quantidades de compostos com uma faixa ampla de KI, a fibra PDMS extraiu substâncias com maiores valores de KI, principalmente os compostos pertencentes a classe dos terpenos, em especial o *trans*-nerolidol, com 67,15% do percentual relativo da área total dos terpenos.

DISCUSSÃO

Esses resultados demonstram que a fibra DVB/CAR/PDMS apresenta uma melhor eficiência de extração para analitos presentes no alimento de *C. analis* no que se refere a compostos de médio e alto peso molecular. O nosso estudo demonstra que apesar da DVB/CAR/PDMS extrair uma quantidade maior em relação a intensidade total de área dos compostos, essa fibra extraiu um número menor de compostos. A CAR/PDMS apresentou a detecção de um maior número de COVs mesmo apresentando menor eficiência de extração, com uma diferença de área total de picos de 1,67 vezes, como neste trabalho buscamos abranger a maior faixa possível de extração de COVs, nesse aspecto a CAR/PDMS é a melhor opção, pois foram detectados 20 compostos ao todo enquanto que a DVB/CAR/PDMS e PDMS detectaram respectivamente 17 e 10 compostos. Para fins de estudos em ecologia química, o conhecimento de uma maior quantidade numérica e a abrangência de uma gama maior de classes COVs configura-se como ponto mais importante.

A fibra PDMS foi a que apresentou a menor intensidade de área total, sendo seletiva apenas para duas das cinco classes químicas extraídas (Ésteres e terpenos), houve a extração de uma alta quantidade de *trans*-nerolidol com 67,15% na fibra PDMS, estudos relatam que fibras de revestimentos apolares, tais como PDMS, são mais adequados para a análise de compostos apolares; como é o caso dos terpenos, classe pertencente ao *trans*-nerolidol, enquanto fibras mistas CAR/PDMS e DVB/CAR/PDMS (fibras bipolares) são aplicadas a materiais de baixa e alta polaridade, voláteis e semi-voláteis (AUGUSTO; KOZIEL, 2001; GARCIA-ESTEBAN et al., 2004). Os valores médios de área divergentes entre os compostos *trans*-nerolidol, benzeno acetaldeído, decanal, 6-Metil-5-hepten-2-ona, *trans*- β -ocimeno, *trans*- β -farneseno e cipereno, significa que a escolha da fibra deve ser pensada com base no interesse do trabalho. Se o estudo requer uma sensibilidade maior na análise, com valores mais intensos de área de pico, empregase a fibra cujos valores de área se revelaram mais intensos. Por outro lado, se o interesse é encontrar uma fibra capaz de detectar uma ampla faixa de compostos de diferentes classes químicas, o melhor é optar pela fibra que apresentou maior número de picos extraídos, o que está associada a seletividade da fibra aos constituintes da matriz.

Apesar de a fibra PDMS ter sido capaz de detectar sete dos onze tipos de terpenos, as fibras CAR/PDMS e DVB/CAR/PDMS foram capazes de extrair maior número de compostos, com proporções adequadas a garantir a extração e detectabilidade de compostos de interesse, no que concerne aspectos de estudos em ecologia química.

O trabalho de PEÑA-ALVAREZ et al. (2006), corroboram os resultados do nosso estudo, os autores selecionaram quatro diferentes tipos de fibras para identificação de terpenos em tequila e observaram que a fibra PDMS mostrou excelente desempenho na detecção do nerolidol, porém não foi considerada a melhor opção por apresentar resultados menos satisfatórios em termos da amplitude numérica de compostos, ou seja, tal fibra não contemplou uma faixa ampla de compostos.

Uma justificativa para esse bom desempenho da PDMS pode ser atribuída ao caráter apolar do nerolidol que também possui alto peso molecular em relação aos demais compostos estudados. Devido ao fato do revestimento da fibra PDMS ser do tipo absorvente, formados por polímero líquido, os analitos são atraídos para a fase do revestimento por interação da região apolar da molécula com o material da fibra pelo processo de partição, tornando a absorção desse composto mais intensificada, por sua vez, mascarando a presença das demais classes de compostos que foram detectados nas outras duas fibras (PARREIRA E CARRDEAL, 2005, CARASEK et al., 2011).

Os aldeídos não foram identificados empregando-se a fibra PDMS, mas foram observados nas duas outras, com exceção do composto heptanal (1,18%) identificado somente com a fibra DVB/CAR/PDMS. O composto hexanal apresentou uma diferença na quantidade percentual entre as duas fibras CAR/PDMS (12,72%) e DVB/CAR/PDMS (1,93%), as avaliações estatísticas demonstraram que há diferença significativa entre as duas médias, para o nível de confiança de 95%. Esses resultados estão em concordância com os relatados por Lorenzo (2014), que em um estudo comparativo entre as fibras DVB/CAR/PDMS e CAR/PDMS, para o tempo de extração de 30 min., verificaram maior percentual relativo de aldeídos empregando a fibra CAR/PDMS.

A despeito de apenas uma cetona (6-Metil-5-hepten-2-ona) ter sido detectada no estudo pelas fibras CAR/PDMS e DVB/CAR/PDMS, a avaliação estatística demonstra que os percentuais relativos de área obtidos para a cetona nas duas fibras mistas são estatisticamente diferentes entre si e que a adsorção em CAR/PDMS é mais eficiente quando comparada a segunda fibra.

Niu et al., (2016), realizaram um estudo de identificação de compostos voláteis em farinha usando HS-SPME-GCMS, onde foi possível detectar 71 compostos com a fibra DVB/CAR/PDMS, dentre os quais englobam alguns COVs detectados nesse trabalho, como é o caso da cetona e de alguns aldeídos, o que corrobora nossos resultados.

Esse estudo mostra que a capacidade de retenção de compostos terpênicos foi conferida pelas fibras que apresentam tanto polaridade mista quanto simples. Nesse sentido, a fibra CAR/PDMS apresentou maior número de terpenos extraídos, não necessariamente em maiores proporções de percentual de área relativa, sendo, portanto, a fibra CAR/PDMS mais adequada aos objetivos desse trabalho, que busca estudar a variabilidade química da amostra de alimento de imaturos de *C. analis*.

Como pode ser observado nos cromatogramas (Figura 3a-c), a fibra DVB/CAR/PDMS extraiu maior quantidade de analitos, no entanto essa fibra não foi admitida como a melhor opção por apresentar muitas impurezas na análise do branco (Figura 3d). Com a fibra DVB/CAR/PDMS verifica-se que a maioria dos compostos extraídos foram produtos de degradação do polímero da fibra que contribuem em maior percentual de área absoluta quando comparado ao cromatograma das duas outras fibras.

A fibra CAR/PDMS favoreceu a extração de compostos voláteis, demonstrando ser a melhor opção para a extração de compostos de menor peso e tamanho (baixos pontos de ebulição), o que pode ser confirmado no cromatograma pela maior quantidade de compostos extraídos em tempos menores e intermediários. Já a fibra PDMS foi a que apresentou menor capacidade extratora para os compostos identificados pelas três fibras, isso pode ser atribuído ao seu caráter apolar que limita o número de compostos que interagem com esse tipo de revestimento.

Na fibra PDMS, o maior teor de terpenos extraídos se deve a afinidade da cadeia apolar pelo material da fibra. Comparando as médias das áreas cromatográficas de todas as classes químicas dos compostos voláteis identificados, com tempo de extração de 30 minutos, as fibras CAR/PDMS e DVB/CAR/PDMS revelaram um perfil muito parecido, apresentando maior proporção para álcoois, aldeídos e cetonas, sendo também mais viáveis para estudar compostos orgânicos voláteis multiclases em pólen e óleo floral.

Finalmente, a fibra CAR/PDMS extraiu uma variedade maior de analitos sendo a melhor para a extração de compostos voláteis, de menor peso e tamanho (baixo ponto de ebulição), e para analitos em faixas de concentração menores, isso se deve ao número reduzido de sítios ativos para a adsorção (PAWLISZYN, 2000; VALENTE E AUGUSTO, 2000). O tempo ideal da extração deve ser o necessário para se atingir o equilíbrio. LORENZO (2014) estudou três tempos de extração e encontrou que em 30 min. fora suficiente para extrair os compostos das diferentes classes químicas, mostrando que esse tempo é suficiente para as análises. A pré-concentração dos analitos, característica dessa técnica, conferiu maior sensibilidade na análise.

CONCLUSÕES

A metodologia usada para avaliar a eficiência de fibras mostrou que a fibra CAR/PDMS é a mais indicada para extração de compostos orgânicos voláteis em ninhos de *C. analis*. Esse estudo mostrou que esta técnica é eficaz e adequada na extração de COVs presentes no ninho de *C. analis*, com estes resultados será possível identificar os COVs também nos ninhos-armadilha em diferentes estágios de desenvolvimento das abelhas e também em ninhos pós-emergência.

3 ECOLOGIA QUÍMICA COMO UM MEDIADOR NA ATRATIVIDADE DE FÊMEAS *Centris analis* (HYMENOPTERA, APIDAE)

RESUMO

A ecologia química tem sido importante ferramenta para conhecimento e a identificação de compostos químicos que intervêm na regulação comportamental em abelhas no sistema de comunicação intraespecíficos e interespecíficos. Estudos anteriores sugeriram que compostos voláteis desempenhariam um papel na atração em fêmeas para nidificação, também estariam envolvidos no reconhecimento do próprio ninho por abelhas solitárias que nidificam em aglomerações. Estudos sobre os compostos voláteis emitidos por abelhas solitárias ainda são incipiente, mas não menos importantes. O objetivo deste estudo foi investigar os COVs majoritários presentes em ninhos de *Centris analis* utilizando a microextração em fase sólida-SPME, para assim, identificar em qual fase do desenvolvimento larval e do ninho são produzidos e/ou liberados os compostos que poderiam continuar presentes após a emergência dos adultos. Para a composição das amostras foram coletados alimento de imaturos, lavas, óleo e resina e ninhos usados. As amostras foram acondicionadas em frascos de vidro de 20ml, selado com tampas de rosca contendo septos de silicone, homogeneizadas e pesadas em balança analítica $1,054 \pm 0,07$ g (n = 10); $0,5358 \pm 0,03$ g (n = 7); $1,043 \pm 0,02$ g (n = 14); $1,043 \pm 0,02$ g (n = 8). Foram adicionados a cada amostra 8mL de água desionizada e 3g de NaCl. Para a extração dos compostos voláteis por *headspace* utilizou-se um suporte de amostrador automático para fibra CAR/PDMS. Foram identificados 40 compostos voláteis: (12) Aldeídos (7), Álcoois (4), Hidrocarboneto Aromático (4), Sesquiterpeno (4), Diterpenos (3), Cetonas (2), Hidrocarbonetos (2) e Éster (1).

Palavras-chave: Ninho-armadilha. Voláteis. Colonização. Atratividade.

Chemical ecology has been an important tool for the knowledge and identification of chemical compounds that intervenes on the behavioral regulation of bees in intraspecific and interspecific communication systems. Previous studies have suggested that volatile compounds should play a role in attracting females for nesting, besides that, they are associated with the recognition of own nests by solitary bees in aggregations. Studies on volatile compounds emitted by solitary bees are still incipient, however, not less important. This study aimed to research the major VOCs existing in nests of *Centris analis* through the use of solid-phase microextraction-SPME, that being so, identifying what stage, of larval development and nest, they are produced and/or released the compounds that could still be present after the emergence of adults. For the composition of samples, we collected food of immatures, larvae, oil and resin, and used nests. The samples were stored in 20ml glass jars, sealed with screw lids containing silicone septum previously homogenized and weighed in analytical scales $1,054 \pm 0,07$ g (n = 10); $0,5358 \pm 0,03$ g (n = 7); $1,043 \pm 0,02$ g (n = 14); $1,043 \pm 0,02$ g (n = 8). For each sample, we added 8ml of deionized water and 3g of NaCl. For the extraction of volatile compounds by headspace sampling, we used an auto-sampler holder for CAR/PDMS fiber. We identified 40 volatile compounds: (12) aldehydes (7), alcohols (4), aromatic hydrocarbon (4), Sesquiterpenes (4), Diterpenes (3), ketones (2), hydrocarbons (2) and Ester (1).

Keywords: Trap-Nest. Volatile. Colonization. Attractiveness.

As abelhas são importantes para a manutenção da biodiversidade nos mais diversos ecossistemas terrestres (COSTANZA et al., 1997; IMPERATRIZ-FONSECA; NUNES-SILVA, 2010; SILVA et al., 2012; ALEIXO et al., 2013). Isso porque elas desempenham um dos principais dos serviços ecossistêmicos, a polinização, realizada ao visitarem as flores para a obtenção de recursos como o pólen, néctar e óleos florais que são usados para a própria sobrevivência e de suas crias (MICHENER, 2007).

Além de sua indiscutível importância na manutenção dos ecossistemas naturais, as abelhas também são consideradas polinizadores primordiais de espécies de plantas cultivadas (KREMEN et al., 2007; POTTS et al., 2010). Uma das preocupações desse milênio é conciliar a manutenção da biodiversidade com a produção de alimento levando em conta a sustentabilidade (IPBES, Plataforma intergovernamental ciência-política sobre a biodiversidade e os polinizadores dos serviços ecossistêmicos, www.ipbes.net; NABHAN; BUCHMANN, 1997; CUNHA et al., 2014). Para isso, muitos estudos têm sido focado na manutenção das abelhas e na avaliação dos impactos do seu desaparecimento nos serviços de polinização e conseqüentemente na produção de alimento (LOSEY; VAUGHAN, 2006; FREITAS; IMPERATRIZ-FONSECA, 2005). Estudos relacionado com redes de interação abelha-planta (DICKS et al., 2002; PIGOZZO; VIANA, 2010), nidificação (KROMBEIN, 1967; CAMILLO et al., 1995; GARÓFALO, 2000; AGUIAR et al., 2003), nicho trófico (SCHLINDWEIN, 1998; CORTOPASSI-LAURINO, 2003), efeitos das mudanças climáticas (KLEINERT-GIOVANNINI, 1982; OLIVEIRA et al., 2012) e dos pesticidas sobre a mortalidade das abelhas (THOMPSON, 2010; PINHEIRO; FREITAS, 2010) tem sido amplamente divulgado.

No mundo existem mais de 20 mil espécies de abelhas descritas, com diversos tamanhos e cores, sendo que mais de 85% delas possuem hábito de vida solitário (BATRA, 1984; MICHENER, 2007). Embora seja conhecida essa riqueza de espécies solitárias, pouco se sabe sobre o comportamento de nidificação para a maioria delas (GARÓFALO, 2000). Essa falta de conhecimento impede a sua criação e até mesmo sua manutenção em áreas naturais e cultivadas. O conhecimento mais aprofundado que temos sobre as espécies solitárias, está relacionado aquelas que constrói seus ninhos em cavidades preexistentes (JESUS; GARÓFALO, 2000; ALVES-DOS-SANTOS; CAMILLO, 2005; DRUMMONT; SILVA; VIANA, 2008). Isso porque após a publicação de Krombein em 1967, sobre o uso de ninhos-armadilha, foi disseminada essa técnica por várias regiões do mundo (GARÓFALO et al., 2004). Com o uso desses ninhos-armadilha, feitos com diferentes tipos de substratos, ficou mais fácil amostrar as fêmeas fundadoras (KROMBEIN, 1967; GARÓFALO, 2000).

O uso de ninhos-armadilha tem possibilitado o conhecimento sobre a diversidade de abelhas solitárias em diferentes biomas no Brasil (GARÓFALO et al., 2004; MESQUITA et al., 2009; MORATO et al., 1999; DRUMMONT et al., 2008), a identificação dos materiais usados na construção de seus ninhos (ALVES-DOS-SANTOS 2003), a arquitetura dos ninhos (JESUS; GARÓFALO, 2000), a razão sexual dos indivíduos emergentes (BUSCHINI; WOLFF, 2006), as relações entre parasitas (GAZOLA; GARÓFALO, 2003) e também avaliar o nicho trófico delas (DÓREA et al., 2009; SILVA et al., 2010a; GONÇALVES et al., 2012). O estudo do nicho trófico tem sido fundamental para o manejo e conservação das abelhas (AGUIAR et al., 2010; SILVA et al., 2010b, SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2016).

Com os ninhos-armadilha foi possível manejar as abelhas solitárias *Megachile rotundata* Fabricius em cultivos de alfafa (*Medicago sativa* L., Leg. Fabaceae) (PITTS-SINGER; CANE, 2011) nos Estados Unidos e Canadá e as abelhas do gênero *Osmia* em pomares de maçãs nos Estados Unidos, Europa e Japão (TORCHIO, 1984; MATSUMOTO et al., 2009; GRUBER et al., 2011). No Brasil, espécies de abelhas nativas que ocupam os ninhos-armadilha vêm sendo indicada com potencial uso para polinização dirigida em cultivos de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC, Malpighiaceae) (OLIVEIRA; SCHLINDWEIN, 2009; MAGALHÃES; FREITAS, 2013; SAZAN et al., 2015), maracujazeiro (*Passiflora* spp.) (FREITAS; OLIVEIRA FILHO, 2003; JUNQUEIRA et al., 2012; SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2014) e cajueiro (*Anacardium occidentale*) (FREITAS, 1997; FREITAS; PAXTON, 1998; FREITAS et al., 2014), com ênfase nas abelhas das tribos Xylocopini e Centridini.

Dentre as espécies da tribo Centridini, *Centris (Heterocentris) analis* (Fabricius, 1804) constrói seus ninhos em cavidades preexistentes e isso fez com que se tornasse uma das espécies mais bem estudada no Brasil quanto ao seu comportamento de nidificação (COVILLE et al., 1983; CAMILLO et al., 1995; VIEIRA-DE-JESUS; GARÓFALO, 2000) e comportamento alimentar (DÓREA et al., 2010; RABELO et al., 2012; SILVA et al. em preparação). Consequentemente, *C. analis* foi indicada como a primeira abelha solitária coletora de óleo a ser manejada para polinização aplicada em cultivos de aceroleira (OLIVEIRA; SCHLINDWEIN, 2009), tendo também potencial para ser usada também na produção do muricizeiro (*Byrsonima crassifolia*), cajueiro (*Anacardium occidentale*), aceroleira (*Malpighia emarginata* DC) e tamarineiro (*Tamarindus indica* L.) (FREITAS; PAXTON, 1998; VILHENA; AUGUSTO, 2007; REGO et al., 2006).

Um dos fatores associados à atração das abelhas está relacionando à sua ecologia química, a qual não se conhece quase nada para as abelhas solitárias, dentre elas *C. analis*. Nesse sentido, a ecologia química tem sido importante para a compreensão da função e do significado das substâncias químicas naturais que mediam as interações entre os organismos vivos (HARBORNE, 2001; PIANARO, 2007).

Tais substâncias químicas utilizadas na intermediação de relações de seres vivos, em geral, são denominadas *semioquímicos*, o que significa “*sinais químicos*”, podendo ser estes aleloquímicos ou feromônios, dependendo da ação que provoquem. Os aleloquímicos são de ação interespecífica e os feromônios são substâncias químicas de ação intraespecífica (BRITO, 2015). Por meio da detecção e emissão destes compostos que os insetos encontram seus parceiros para o acasalamento, alimento ou presa, escolhem local de ovoposição, se defendem contra predadores e organizam suas comunidades, no caso dos insetos sociais (ZARBIN; RODRIGUES, 2009). Os compostos orgânicos voláteis (COVs) apresentam várias funções eco-fisiológicas na natureza e prova disso, são os odores de flores. Dada a sensibilidade dos insetos, as pequenas concentrações de substâncias químicas voláteis emitido pelas flores são capazes de atraí-los a longas distâncias (HARBORNE, 1998; ZARBIN et al., 2013).

Estudos sobre os COVs emitidos por abelhas solitárias ainda são incipientes, mas não menos importantes. Tendo em vista, que para criar e manejar abelhas, seja em áreas naturais ou cultivadas, é necessário primeiramente atraí-las até os ninhos-armadilha (JESUS; GARÓFALO, 2000). Nesse sentido, há poucos estudos que apontam os fatores que influenciam o encontro e a escolha dos locais de nidificação pelas fêmeas (MORATO; MARTINS, 2006). Verificamos que faltam protocolos que possibilitem estudar os COVs nos ninhos-armadilha e a partir desse conhecimento, aplica-los em ensaios biológicos que permitam avaliar os seus efeitos na atratividade das abelhas (Sousa et al., em preparação).

Dessa forma, os objetivos deste estudo foi investigar os COVs majoritários presentes em ninhos de *Centris analis* utilizando a microextração em fase sólida (SPME), para assim, identificar em qual fase do desenvolvimento larval e do ninho são produzidos e/ou liberados os compostos que poderiam continuar presentes após a emergência dos adultos. Nossa hipótese é que há uma variação na diversidade de COVs segundo o desenvolvimento larval e do ninho e que determinados compostos permanecem no ninho após a emergência.

Nós esperamos que os resultados obtidos nesse estudo possam subsidiar os ensaios biológicos com os COVs identificados e avaliar quais deles estão diretamente associados à atratividade de novas fêmeas fundadoras na população. A partir da identificação de tais compostos será possível desenvolver pacotes tecnológicos que facilitarão a atração, a criação e o manejo de *C. analis* para o uso na polinização aplicada em cultivos onde essa abelha atua diretamente como polinizadora efetiva, como por exemplo, em flores da aceroleira (OLIVEIRA; SCHLINDWEIN, 2009). A velocidade na atração e ocupação pelas fêmeas fundadoras *C. analis* pode determinar o sucesso na sua manutenção e na produção de frutos.

MATERIAIS E MÉTODOS

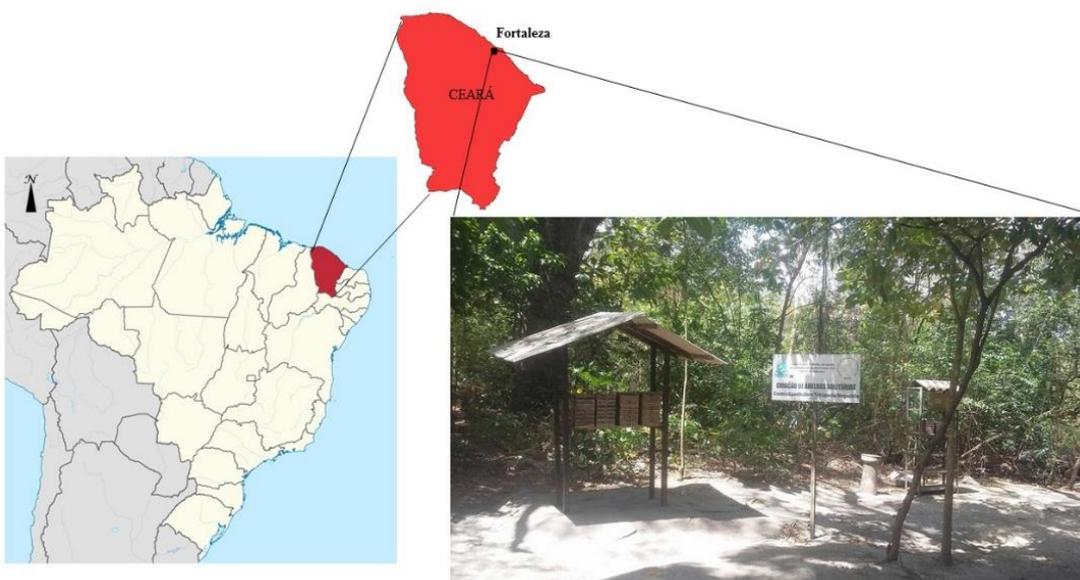
Área de estudo

O estudo foi desenvolvido no Setor de Abelhas do Departamento de Zootecnia no campus da Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza (3° 44' 33" S; 38° 34' 44" O) (Figura 1) e no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais LMQPN-EMBRAPA no período de maio a agosto de 2016.

O clima da região é caracterizado como Aw' tropical quente subúmido (KÖPPEN, 1948), com período chuvoso ocorrendo de janeiro a maio, pluviosidade e média de 1338,0 mm e temperatura média anual de 27°C (FUNCEME, 2015).

A vegetação original da área é do tipo tabuleiro pré-litorâneo com fisionomia de floresta semidecídua e mata de tabuleiro (MORO et al., 2015), atualmente a área é composta por vegetação original, mas também por espécies nativas e exóticas usadas no paisagismo (RCPOL- Rede de Catálogos Polínicos online, www.rcpol.org.br).

Figura 1.Localização da área para coleta de material biológico.

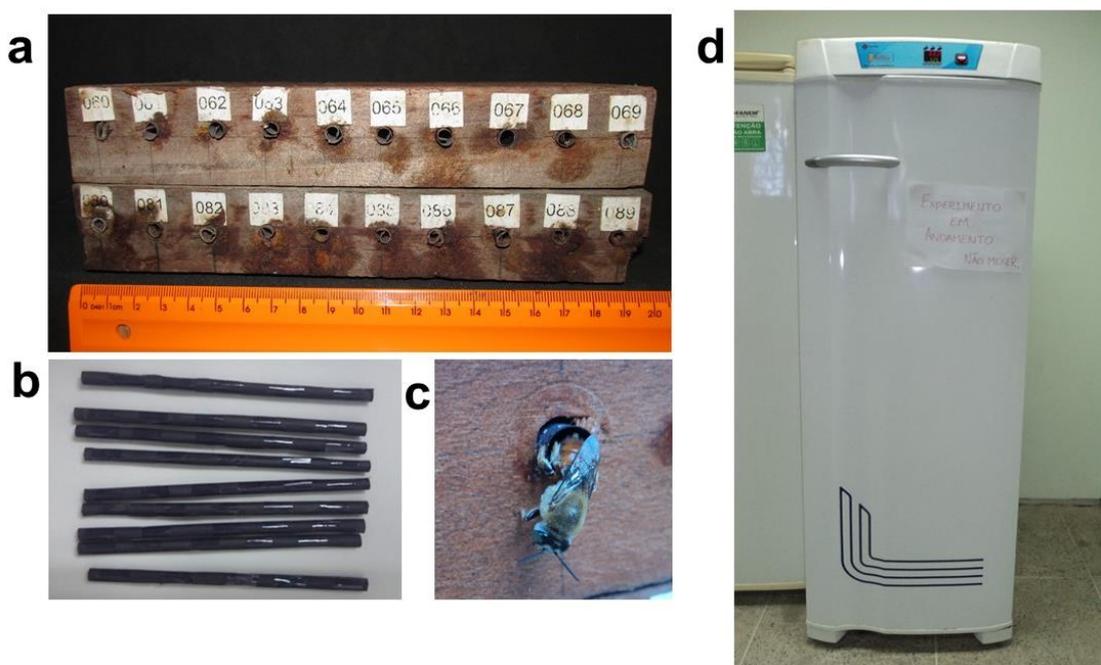


Fonte: google imagens

Coleta de material biológico

Para a coleta do material biológico, foram utilizadas ninhos-armadilhas, constituídos por blocos de madeira (20 cm x 13 cm x 2 cm) com 10 orifícios de 5mm (Figura 2a) e tubos de cartolina preta com comprimento de 12cm e diâmetro de 4,5mm (Figura 2b). Diariamente os ninhos-armadilha foram vistoriados após concluídos e fechados (Figura 2c) pelas fêmeas de *Centris analis*, foram removidos e mantidos no Laboratório de Análises do Setor de Abelhas para coleta de material biológico. Os ninhos foram mantidos em BOD (Biochemical Oxygen Demand) (Figura 2d) a 27°C e umidade relativa de 60%, até a emergência dos adultos. Os adultos emergidos foram soltos e o ninho pós-emergência foram usados para as análises químicas.

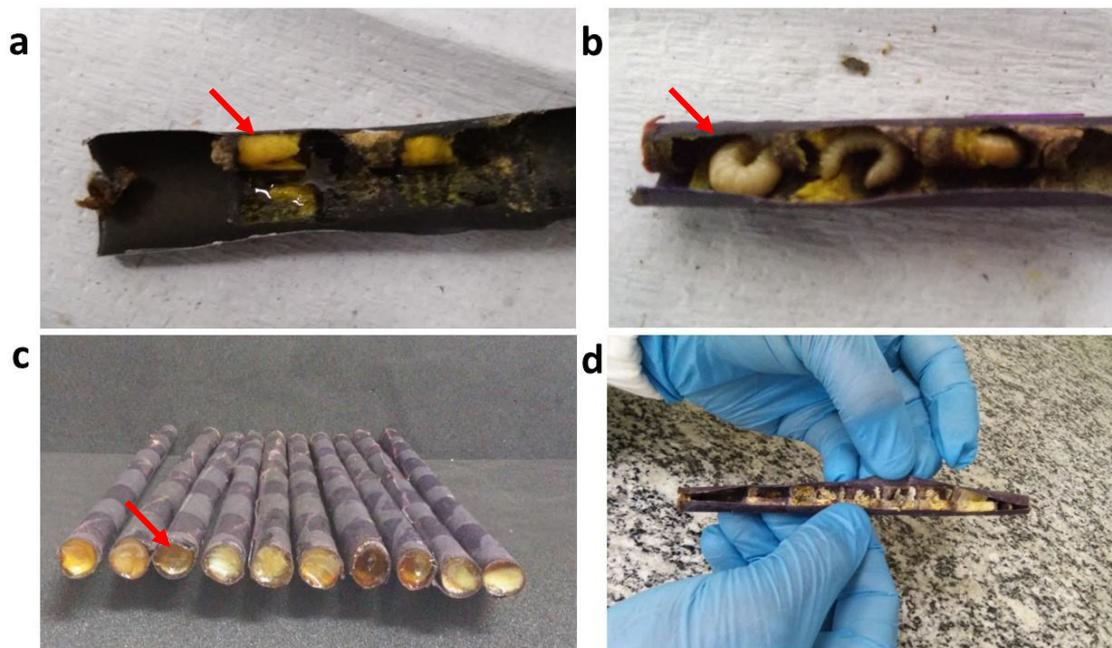
Figura 2. (a) Blocos de madeira (20 cm x 13 cm x 2 cm) com 10 orifícios de 5mm; (b) Tubos confeccionados com cartolina preta, 12cm comprimento e 4,5mm de diâmetro (c) Fêmea de *Centris analis* operculando a entrada do ninho (d) BOD (Biochemical Oxygen Demand)



Fonte: Autor

Após o fechamento de cada ninho pelas fêmeas os mesmos foram substituídos por novos, para garantir que houvesse sempre disponibilidade de locais para nidificação. Nesse estudo foram coletadas amostras de diferentes grupos: alimento de imaturos (n = 10); larvas (n = 7); material usado pelas fêmeas para opercular a entrada nos ninhos (óleo + resina) (n = 14); ninhos após a emergência (n = 8) (Figura 3a-d).

Figura 3. (a) Alimento de imaturos; (b) Larvas; (c) Óleo e resina; (d) Ninhos após emergência.



Fonte: Autor

Para a coleta foram usadas espátulas previamente esterilizadas e as amostras acondicionadas em frascos de vidro de 20ml selado com tampas de rosca contendo septos de silicone/PTFE (Supelco, Bellefonte, PA, EUA). Para a composição da amostra ninho usado, partes dos ninhos recém provisionado pela fêmea de *C. analis* foram coletadas e acondicionadas em tubos de plástico transparente fechados com rolha de cortiça.

Para cada tipo de amostra a ser analisada, o material biológico foi homogeneizado e pesado em balança analítica (AY220 marte®). Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em caixa térmica com gelo para serem transportadas até o Laboratório de Multiusuário de Química de Produtos Naturais LMQPN-EMBRAPA, para serem acondicionadas em ultra-freezer vertical (CL 600®). O material foi acumulado até obter uma quantidade de massa suficiente para as avaliações em quintuplicata. Para as amostras do grupo 4, ninhos usados foram cortados e pesados e logo após inseridos em frascos para compor a quintuplicata.

Análise Química

Para as análises foram adicionados a cada amostra 8mL de água Mili-Q (Merck Millipore®), 3g de NaCl, e cerca de $1,054 \pm 0,07$ g da amostra de alimento, $0,5358 \pm 0,03$ g da amostra de larvas, $1,043 \pm 0,02$ g de material depositado na entrada do ninho (óleos florais e resina) e $1,043 \pm 0,02$ g de ninho usado. As análises foram realizadas em quintuplicata, separando-se sempre uma amostra para controle, constituída por 8mL de H₂O e 3g de NaCl. Para a extração dos compostos voláteis por *headspace* utilizou-se um suporte de amostrador automático para fibra de SPME (Solid Phase Micro Extration) CAR/PDMS polaridade mista (Carboxen/Polidimetilsiloxano) 75µm de 1cm da marca Supelco, Belafonte, PA, EUA (ver capítulo II, SOUSA et al.)

O procedimento de extração por SPME foi conduzido em amostrador automático (Pal System, Zwingen, Suíça) acoplado ao sistema GC-MS. Inicialmente a amostra foi submetida à formação do headspace por aquecimento à 60°C por 15 minutos, para posterior captura dos COVs durante 30 minutos. Em seguida, os compostos foram dessorvidos no GC durante 3 minutos. Posteriormente, a fibra foi submetida ao procedimento de limpeza com fluxo de Hélio por 10 minutos na temperatura indicada pelo fabricante variando de acordo com a fase estacionária da fibra (240°C/30 min para PDMS, 260°C/60 min para DVB/CAR/PDMS e 290°C/60 min CAR/PDMS).

A identificação dos COVs foi feita em cromatógrafo a gás Modelo 7890B GC System (Agilent Technologies Spain, S.L., Madrid, Espanha) acoplado ao espectrômetro de massa Modelo 5977A MSD (Agilent Technologies Spain, S.L., Madrid, Espanha)

Os compostos foram separados utilizando uma coluna capilar HP 5MS (Agilent J & W GC Columns, Santa Clara, CA, EUA) de 30m x 250µm x 0,25µm. As amostras foram injetadas no modo splitless e o gás de arraste foi o Hélio com uma vazão de 1 mL min⁻¹. As temperaturas do injetor e do analisador foram 240 e 150°C, respectivamente. Programação forno cromatográfico: temperatura inicial de 40°C por 4 minutos, com rampa de aquecimento de 2,5°C.min⁻¹ até 80 °C, 5°C.min⁻¹ até 110 °C, 10°C.min⁻¹ até 220 °C por 2 minutos e acréscimo de 10°C.min⁻¹ até 290°C permanecendo por 4 minutos ao término da corrida (50 minutos).

Os espectros de massa foram obtidos utilizando um sistema de analisador quadrupolar com ionização por impacto de elétrons a 70 eV. Os compostos foram identificados por comparação de seus espectros de massa com os contidos na biblioteca NIST 2.0, 2012 (Nacional Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Md, EUA), efetuada pela comparação do índice de retenção linear calculado equação de Kovats utilizando uma série homóloga de n-alcanos C8-C30 (Supelco, 49451-U, Bellefonte, PA, EUA).

Análise dos dados

Os dados foram analisados utilizando o Software Mass Hunter®, 2010. (Agilent Technologies EUA), por comparação de seus espectros de massa contidos na biblioteca NIST 2.0, 2012 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Md, EUA). O percentual relativo de área média foi obtido por meio da média das intensidades de área dos cromatogramas com o respectivo desvio padrão.

RESULTADOS

Neste estudo um total de 40 compostos voláteis foram identificados nos grupos de amostras analisadas. Os percentuais relativos de área dos COVs para cada grupo de amostra estão demonstrados na Tabela 1. Os COVs pertencem às seguintes classes de compostos químicos: Monoterpeno (12), Aldeídos (7), Álcoois (4), Hidrocarboneto Aromático (4), Sesquiterpeno (4), Diterpenos (3), Cetonas (2), Hidrocarbonetos (2) e Éster (1). Os compostos *cis-β*-ocimeno (35,7%), 2-Etil-1-hexanol (30,24%), *p*-xileno (24,59%) e 1-Octanol (20,63%) apresentaram maior percentual relativo de área entre os COVs identificados neste estudo (Tabela 1).

Tabela 1. Percentual relativo de área média com respectivos desvios padrão de compostos orgânicos voláteis identificados nos grupos de amostras de ninhos de *Centris analis* extraídos com o tempo de exposição de 30 minutos para fibra CAR/PDMS.

Compostos Voláteis	KI	Alimento	Larva	Ninho Usado	Óleo e Resina
<i>Álcoois</i>					
1-Octanol	1077	1,69 ± 0,55	20,63 ± 7,75		
2-Etil-1-hexanol	1034			30,24 ± 6,27	
2-Heptanol	904	6,96 ± 1,62			
3-Octen-1-ol	984	3,50 ± 0,47			
<i>Hidrocarboneto</i>					
4,6-Dimethyldodecane	-		2,48 ± 0,33		0,66 ± 0,16
Decanal	1207	1,44 ± 0,52		2,42 ± 0,38	
<i>Hidrocarboneto aromático</i>					
Etilbenzeno	868		3,68 ± 0,41		4,00 ± 0,62
o-xileno	894		13,86 ± 0,62		3,98 ± 0,59
p-cimeno	992				
p-xileno	864		24,59 ± 3,10		6,93 ± 0,22
<i>Cetona</i>					
6-Metil-5-hepten-2-ona	990	5,17 ± 0,89			
<i>trans</i> -3-pinanona	1159			4,12 ± 0,77	
<i>Éster</i>					
Acetato de 3-metil-1-Butanol	882	11,00 ± 4,86			
<i>Diterpeno</i>					
α -copaeno	1379	0,68 ± 0,37		1,16 ± 0,12	
α -curcumeno	1487	1,27 ± 0,49			
α -muuroleno	1504	4,49 ± 1,28			
<i>Aldeído</i>					
Benzaldeído	961	10,73 ± 0,58			
Benzeno acetaldeído	1045	6,51 ± 2,01	18,51 ± 10,17	5,02 ± 0,15	6,17 ± 0,52
Heptanal	903				13,50 ± 3,43
Hexanal	803	12,72 ± 0,67	7,47 ± 0,86		11,77 ± 1,60
Nonanal	1105	7,48 ± 1,34	5,78 ± 0,30	5,59 ± 0,22	9,21 ± 1,63
Octanal	1003	3,84 ± 1,31	11,52 ± 3,00	2,60 ± 0,36	2,31 ± 0,35
p-ment-1-en-7-al	-			1,82 ± 0,29	
<i>Monoterpeno</i>					
β -cariofileno	1425	2,87 ± 0,51	2,64 ± 0,64	1,21 ± 0,46	
β -ciclocitral	1222	1,17 ± 0,26			
Borneol	1165			1,83 ± 0,34	
Cânfora	1146			7,42 ± 0,57	
Cipereno	1402	1,94 ± 0,36			
<i>cis</i>-β-ocimeno	1037	3,38 ± 1,05			35,77 ± 5,68
<i>cis</i> -calameneno	1531	5,47 ± 2,15			
Eucaliptol	1031			1,09 ± 0,89	
Fenchol	1121			3,37 ± 0,28	
Continuação Tabela 1					
Compostos Voláteis	KI	Alimento	Larva	Ninho Usado	Óleo e Resina
Fenchona	-			2,04 ± 0,21	
Mentona	-			2,73 ± 1,30	
Neo-allo-ocimeno	1131				3,28 ± 0,93

<i>Sesquiterpeno</i>			
Longifolene	1402		0,73 ± 0,03
<i>trans</i> - β -farneseno	1460	4,60 ± 1,19	5,28 ± 1,22
<i>trans</i> -calameneno	-		1,29 ± 0,63
<i>trans</i> -nerolidol	1569	3,08 ± 1,52	5,24 ± 1,45

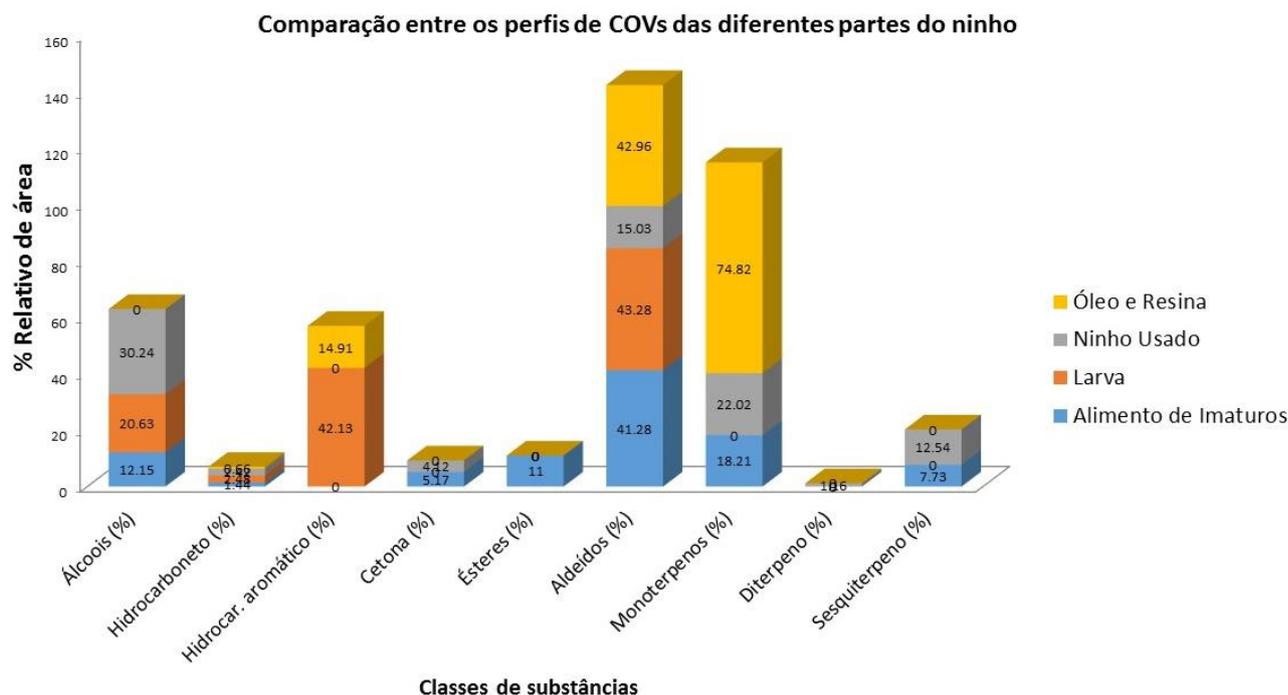
Fonte: Autor

Comparando-se entre as classes químicas, os aldeídos é a classe de maior representatividade no total de COVs identificados neste estudo (Figura 4), sendo o Benzeno acetaldeído (18,51%) detectado na amostra de larvas o composto de maior representatividade entre os aldeídos. A classe dos Monoterpenos podemos observar que é a segunda mais representativa (Figura 4), sendo o composto *cis*- β -ocimeno (35,77%) detectado na amostra de óleo e resina, o composto representativo nesta classe (Tabela 1).

Os álcoois foi a terceira classe mais representativa, sendo o composto 2-Etil-1-hexanol (30,24%) identificado na amostra de ninho usado e 1-Octanol (20,63%) identificado na amostra de larva, os compostos que apresentam maior percentual de área relativo para esta classe (Tabela 1). Os Hidrocarbonetos aromáticos é uma classe que fora detectada em apenas duas das amostras (larvas, óleo e resina). O composto *p*-xileno (24,59%) presente na amostra de larvas é o composto representativo para esta classe. Sesquiterpenos fora a classe identificada em apenas duas amostras (alimento e ninho usado), sendo o composto *trans*- β -farneseno (5,28%) detectado na amostra de ninhos usado, o composto representativo para esta classe. Apenas um composto da classe Éster, o Acetato de 3-metil-1-Butanol (11,00%), foi detectado na amostra de alimento de imaturos.

Neste estudo, a classe das cetonas fora detectada em duas amostras (alimento e ninho usado), sendo o compostos 6-Metil-5-hepten-2-ona (5,17%) presente na amostra alimento de imaturos, o volátil representativo para esta classe. Os Hidrocarbonetos fora a classe que os valores de percentual relativo de área entre duas amostras (larva e ninho usado) estão próximos, sendo o composto 4,6-Dimethyldodecane (2,48%) identificado na amostra de larva, o volátil representativo para esta classe. Diterpenos apresenta baixa concentração entre todas as classes identificadas neste estudo (Figura 4), sendo o composto α -muuroleno (4,49 %) presente na amostra de alimento o composto representativo para esta classe.

Figura 4. Percentual relativo da área de compostos voláteis identificados ninho de *Centris analis*.



Fonte: Autor

DISCUSSÃO

Neste estudo, buscamos abranger a maior faixa possível de extração e identificação dos COVs, apresentando resultados interessantes do ponto de vista de variabilidade química, pois foram detectados 40 compostos diferentes, distribuídos em 9 classes químicas. A identificação do volátil majoritário não significa especificamente que composto seja o responsável pela atratividade, pois serão necessários testes biológicos com diferentes concentrações para determinar o(s) composto(s) responsáveis pela atratividade de fêmeas fundadoras *C. analis*. Contudo, isso somente será possível a partir dos resultados encontrados nesse estudo.

Óleo e resina, foi a amostra a qual foi detectada o volátil majoritário, *cis-β*-ocimeno (35,77%) um monoterpreno. Este volátil foi encontrados em baixas concentrações em hastes florais de *Lysimachia punctata*, planta que fornece óleos florais como recompensa a abelha *Macropis fulvipes* (DOTTERL et al., 2010). Terpenos são comumente associados à atração de polinizadores generalistas, incluindo abelhas, moscas e borboletas (DOBSON, 2006). Leonhardt et al. (2010), constatou que abelhas sem ferrão dependem de terpenos voláteis para localizar ou reconhecer fontes de resina. As propriedades da resina são em grande parte devidas à presença de terpenos (LANGENHEIM, 2003; GERSHENZON; DUDAREVA, 2007)

Os compostos 2-Etil-1-hexanol (30,24%) e 1-octanol (20,63%), pertencem a classe dos álcoois, detectados neste estudo em amostras de ninho usado e lavas respectivamente. Neste estudo, estes compostos apresentam-se como voláteis majoritários. Guedes (2015), identificou a presença de 2-Etil-1-hexanol em flores de pinha (*Annona squamosa*) (Anonacea), polinizada por besouros os quais são atraídos por flores de aromas fortes. Em um estudo realizado por Jakobsen, et al. (1995), os autores verificaram que após a introdução do 2-etil-1-hexanol em colmeia de abelhas (*Apis mellifera* L.) e ninhos de (*Bombus terrestris* L.), as abelhas eram influenciadas por estímulos odoríferos deste volátil, influenciando nas escolhas de forrageamento induzindo um número significativo de visitas a sítios contendo este composto.

Cordeiro et al. (2016), verificou que aromas liberados por flores de cambuci (*Campomanesia phaea*), tem o 1-octanol como um dos principais voláteis, responsável pela atividade em polinizadores noturnos. Este álcool é constituinte do feromônio de alarme em abelhas *Apis mellifera* L. (KRAUS, 1990). Por tanto, estudos demonstraram que estes álcoois participam da interação plantas-polinizador, assim como participam do comportamento em abelhas sociais.

Nossos resultados mostram a presença de benzeno acetaldeído, octanal e nonanal em todas as amostras. Investigando odores de pólen na atratividade em espécies de abelhas oligolecticas, Jurgens e Dotterl (2004), verificaram a predominância dos aldeídos octanal e nonanal, como compostos mais comuns identificados em amostras florais. Klatt et al. (2013), em estudo feito com *Osmia bicornis* L., verificou que os compostos (benzaldeído, octanal, nonanal), estão entre os compostos voláteis mais frequentemente emitidos em flores de morango (*Fragaria* L.) atraindo a abelha *O. bicornis*. Roy e Raguso (1998), verificaram que as abelhas eram atraídas para pseudo-flores, associado a emissão de voláteis entre eles o benzaldeído tornando-o olfativamente diferente. Aldeídos estão diretamente ligados a emissão de cheiro antes da polinização (DOTTERL et al., 2010).

Já na amostra de alimento de imaturos, podemos observar que houve uma maior variabilidade de COVs identificados 21, isto se deve pela composição da amostra constituída por pólen, néctar e óleo floral. Entre os compostos florais (octanal, nonanal e benzaldeído) têm sido relatado como os mais frequente (HAMILTON-KEMP et al., 1990; KLATT et al., 2013), no presente estudo, estes três voláteis representam (22,05%). Alguns dos compostos identificados em alimento de imaturos, por exemplo, (eucaliptol, α -copaeno, β -ciclocitral, 2-heptanol) foram detectados na composição de fragrâncias de espécies de orquídea, *Anthurium* (Araceae) polinizadas por Cecidomyiidae, Drosophilidae e Euglossini (SCHWERDTFEGER et al., 2002).

Ratnayake et al. (2007), observaram que as plantas podem emitir odores que imitam feromônios glândula tergal em abelhas *Bombus*, sendo responsável pelo recrutamento de forrageiras (GRANERO et al., 2005). O éster acetato de 3-metil-1-Butanol (11,00%) encontram-se na natureza na forma de gorduras e óleos vegetais, apresenta odor suave (óleo de banana) (DUAN et al., 2015). O composto p-xileno (24,59%) detectado em amostras de larvas, foi relatado em um estudo feito por Couto et al. (2014), onde os autores verificaram que este composto seriam responsável pela atração de *Vespa velutina* em colméias de *Apis cerana* e *Apis mellifera* L. como pista olfativa de larvas.

Assim, pode-se observar que alguns dos compostos voláteis aqui detectados, foram estudados para algumas espécies de abelhas (sociais ou solitária), muitos ainda são desconhecidos em relação ao mecanismo de ação em *Centris analis*, fazendo-se necessário testes biológicos.

CONCLUSÕES

O presente trabalho proporcionou o desenvolvimento de dois tópicos relacionados a compostos voláteis em ninhos-armadilha de *Centris analis*, fornecendo uma importante contribuição através da validação do método de extração (SPME) por fibra extratora, proporcionando a identificação de vários compostos.

Os resultados mostraram uma variação na diversidade de COVs que permanecem no ninho após a emergência.

Faltam protocolos que possibilitem estudar COVs nos ninhos-armadilha de *C. analis*, e os resultados obtidos pode subsidiar ensaios biológicos para avaliar se os compostos estão diretamente associados à atratividade em fêmeas fundadoras.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR C.M.L; GAGLIANONE M.C. Nesting biology of *Centris (Centris) aenea* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Centridini) **Revista Brasileira de Zoologia**, v.20, n. 4, p.601-606, 2003.
- ALEIXO, K.P., **Sazonalidade na disponibilidade de alimento e dinâmica de forrageamento em *Scaptotrigona aff. Depilis* (Hymenoptera Apidae, Meliponini)**. 2013. 87p. (Dissertação de mestrado). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.
- ALVES DOS SANTOS, I. Biologia de nidificação de *Anthodioctes megachiloides* (Anthidiini, Megachilidae, Apoidea). **Revista Brasileira de Zoologia**, n.21, v.4, p.739–744, 2004.
- ALVES-DOS-SANTOS I; MACHADO I.C; GAGLIANONE M.C. História natural das abelhas coletoras de óleo. **Oecologia Brasiliensis**, v.11, n.4, p.544-557, 2007.
- ALVES-DOS-SANTOS, I.; MELO, G. A. R.; ROZEN, J.G. Biology and immature stages of the bee tribe Tetrapediini (Hymenoptera: Apidae). **American Museum Novitates**, n. 3377, p. 1-45, 2002.
- AUGUSTO, F.; KOZIEL J.; PAWLISZYN, J. Design and validation of portable SPME devices for rapid field air sampling and diffusion-based calibration. **Analytical Chemistry**. v.73, p.481–486, 2001.
- BATRA, S.W. Solitary bees. **Scientific American**, n.250, p.86-93, 1984.
- BICCHI, C.; CORDERO, C.; LIBERTO, E.; SGORBINI, B.; RUBIOLO, P. Reliability of fibres in solid-phase microextraction for routine analysis of the headspace of aromatic and medicinal plants. **Journal of Chromatography A** v.1152, p.138–149, 2007.
- BICCHI,C.; DRIGO,S.; RUBIOLO,P. Influence of fibre coating in headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic analysis of aromatic and medicinal plants. **Journal of Chromatography A** v.892, p.469–485, 2000.
- BOJKO, B.; CUDJOE, E.; GÓMEZ-RÍOS, G.A.; GORYNSKI, K.; JIANG, R.; REYES-GARCÉS, N.; RISTICEVIC, S.; SILVA, E.A.; TOGUNDE, O.; VUCKOVIC, D.; PAWLISZYN, J. SPME - Quo vadis? **Analytica Chimica Acta**, v.750, p.132-151, 2012.
- BOTI J.B. **Polinização entomófila da goiabeira (*Psidium guajava* L., Myrtaceae): Influência da distância de fragmentos**. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG, 2001.
- BRITO, R.S. **Desenvolvimento e Otimização de um novo Sistema para coleta *in situ* de Compostos Orgânicos Voláteis de Plantas**.2015.61p. (Monografia Bacharelado em Química). Universidade Federal do Ceará, 2015.
- BUCHMANN S.L. The ecology of oil flowers and their bees. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v.18, p.343–369, 1987.

BUSCHINI, M. L. T.; WOLFF, L.L. Notes on the biology of *Trypoxylon (Trypargilum) opacum* Brèthes (Hymenoptera; Crabronidae) in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology** v.66, p.907-917, 2006.

CAMILLO, E.; GARÓFALO, C. A.; SERRANO, J. C.; MUCCILLO, G. Diversidade e abundância sazonal de abelhas e vespas solitárias em ninhos armadilhas (Hymenoptera, Apocrita, Aculeata). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.39, n.2, p.459-470,1995.

CARASEK, E.; MARTENDAL, E.; BUDZIAK, D. Fibras altamente robustas de microextração em fase sólida e recobrimento via reação sol-gel. **Scientia Chromatographica** v.3, n.2, p. 133-143,2011.

COCUCCI A.A; SERSIC A; ROIG-ALSINA A. Oil-collecting structures in Tapinotaspidini: their diversity, function and probable origin. **Mitteilungen der Münchner Entomologischen Gesellschaft**, v.90, p.51-74, 2000.

CORDEIRO, G.D.; PINHEIRO, M.; DÖTTERL, S.; ALVES-DOS-SANTOS, I. Pollination of *Campomanesia phaea* (Myrtaceae) by night-active bees: a new nocturnal pollination system mediated by floral scent **Plant Biology** v.19. p. 132-139, 2016.

CORTOPASSI-LAURINO,M.; KNOLL,F.R.N.; IMPERATRIZ-FONSECA V.L. Nicho trófico e abundância de *Bombus morio* e *Bombus atratus* em diferentes biomas Brasileiros. **Apoidea Neotropica: homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure**. Ed. UNESC, Criciúma, 320p.

COSTANZA, R.; WILSON, M.; TROY, A.; VOINOV, A.; LIU, S.; D'AGOSTINO, J. The Value of New Jersey's Ecosystem Services and Natural Capital. **Nature**, solomons, USA v.387, p. 253-260, 1987.

COUTO, A.; MONCEAU, K.; BONNARD,O.;THIERY,D.; SANDOZ, J.C. Olfactory Attraction of the Hornet *Vespa velutina* to Honeybee Colony Odors and Pheromones. **Plos One** v.9, n.12, p.1-19, 2014

COVILLE, R.; FRANKIE, G. W.; VINSON, S. B. Nests of *Centris segregata* (Hymenoptera: Anthophoridae) with a Review of the Nesting Habitats of the Genus. **Journal of the Kansas Entomology Society**, n.56, v.2, p.109-122, 1983.

CUNHA, D.A.S.; NÓBREGA, M.A.S.; ANTONIALLI JUNIOR, W.F. Insetos Polinizadores em Sistemas Agrícolas Ensaio e Ciência: **Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v.18, n. 4, 2014.

DICKS, L.V.; CORBET, S.A.; PYWELL, R.F. Compartmentalization in plant-insect flower visitor webs. **Journal of Animal Ecology**, n.71, p.32-43, 2002.

DOBSON, H.E.M. Relationship between floral fragrance composition and type of pollinator. **Biology of Floral Scent**. Press Taylor & Francis Group, p.147–198, 2006.

DÓREA, H.S.; GAUJAC, A.; NAVICKIENE, S. Microextração em fase sólida: aspectos termodinâmicos e cinéticos. **Scientia Plena**, v.4, p.1-7,2008.

DÓREA, M. C.; AGUIAR, C. M. L.; FIGUEROA, L. E. R.; LIMA, L. C. L.; SANTOS, F. A. R. Residual pollen in nests of *Centris analis* (Hymenoptera, Apidae, Centridini) in an area of Caatinga vegetation from Brazil. **Oecologia Australis**, n.14, v.1, p.232-237, 2010.

DÓREA, M. C.; SANTOS, F. A. R.; LIMA, L. C. L. E.; FIGUEROA, L. E. R. Análise polínica do resíduo pós-emergência de ninhos de *Centris tarsata* Smith (Hymenoptera: Apidae, Centridini). **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 2, p. 197-202, 2009.

DÖTTERL, S.; VERECKEN, N.J. The chemical ecology and evolution of bee–flower interactions: a review and perspectives. **Journal of Zoology** v.88, p.668 – 697, 2010.

DRUMMONT, P.; SILVA, F. O.; VIANA, B. F. Ninhos de *Centris (Heterocentris) terminata* Smith (Hymenoptera, Apidae, Centridini) em Fragmentos de Mata Atlântica Secundária, Salvador, BA. **Neotropical Entomology**, n.37, v. 3, p.239-246, 2008.

DUAN, L.L.; SHI, Y.; JIANG, R.; YANG, Q.; WANG, Y.Q.; LIU, P.T; DUAN, C.Q.; YAN, G.L. Effects of Adding Unsaturated Fatty Acids on Fatty Acid Composition of *Saccharomyces cerevisiae* and Major Volatile Compounds in Wine. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 36, n. 2, 2015.

FITZGERALD, G.; JAMES, K.J.; MACNAMARA, K.; STACK, M.A. Characterisation of whiskeys using solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** v.896, p.351–359, 2000.

FRANKIE G.W.; NEWSTROM L.; VINSON S.B.; BARTHELL J.F. Nesting-habitat preferences of selected *Centris* bee species in Costa Rican dry forest. **Biotropica**. v.25, p.322–333, 1993.

FREITAS B.M.; PAXTON R.J. A comparison of two pollinators: the introduced honey bee *Apis mellifera* and an indigenous bee *Centris tarsata* on cashew *Anacardium occidentale* in its native range of NE Brazil. **Journal of Applied Entomology**, v35, p.109–121, 1998.

FREITAS, B. M. Number and distribution of cashew (*Anacardium occidentale*) pollen grains on the bodies of its pollinator bees, *Apis mellifera* and *Centris tarsata*. **Journal of Apicultural Research**, v. 36, p. 15-22. 1997.

FREITAS, B. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. A importância econômica da polinização. **Mensagem doce**. São Paulo, n. 80, p.44-46, 2005.

FREITAS, B.M.; OLIVEIRA FILHO, J.H. Ninhos racionais para mamangava (*Xylocopa frontalis*) na polinização do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*) **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.6, p.1135-1139, 2003.

- FREITAS, B.M.; PAXTON, R.J. A comparison of two pollinators: the introduced honey bee *Apis mellifera* and an indigenous bee *Centris tarsata* on cashew *Anacardium occidentale* in its native range of NE Brazil. **Journal of Applied Ecology** v.3, p.109–121, 1998.
- FUNCEME Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos (2015). Disponível em <http://www.ipece.ce.gov.br>. Acessado em Dez/17/2016
- GAGLIANONE M. Nesting biology, seasonality, and flower hosts of *Epicharis nigrita* (Friese, 1900) (Hymenoptera: Apidae: Centridini), with a comparative analysis for the genus. **Stud. Neotropical Fauna Environment**, v.40, p.191–200, 2005.
- GAGLIANONE, M. C. Nidificação e forrageamento de *Centris (Ptilotopus) scopipes* Friese (Hymenoptera, Apidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.8, n.1, p.107-117, 2001.
- GARCIA-ESTEBAN, M.; ANSORENA, D.; ASTIASARÁN, I.; RUIZ, J. Study of the effect of different fiber coatings and extraction conditions on dry cured ham volatile compounds extracted by solid-phase microextraction (SPME). **Talanta** v.64, p.458–466, 2004.
- GARÓFALO, C. A.; MARTINS, C.F.; ALVES-DOS-SANTOS, I. 2004. The Brazilian solitary bee species caught in trap nests, p. 77–84. *In*: B. M. Freitas & J. O. P. Pereira (eds.). **Solitary bees** - Conservation, rearing and management for pollination. Fortaleza, Imprensa. 285 p.
- GARÓFALO, C.A. Comunidade de abelhas (Hymenoptera, Apoidea) que utilizam ninhos-armadilha em fragmentos de matas do estado de São Paulo. **Anais do Encontro sobre Abelhas, Ribeirão Preto**, n.4, p.121-128, 2000.
- GAZOLA, A.L.; GARÓFALO, C.A. Parasitic behavior of *Leucospis cayennensis* Westwood (Hymenoptera: Leucospidae) and rates of parasitism in populations of *Centris (Heterocentris) analis* (Fabricius) (Hymenoptera: Apidae: Centridini). **Journal of the Kansas Entomological Society**, Lawrence, n.76, v.2, p.131-142, 2003.
- GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature Chemical Biology**. v.3, p. 408–414, 2007.
- GLASSER, S.; FARZAN, S. Host-associated volatiles attract parasitoids of a native solitary bee, *Osmia lignaria* Say (Hymenoptera, Megachilidae). **Journal of Hymenoptera Research** v.5, p. 249-256, 2016.
- GRANERO, A.M.; SANZ, J.M; GONZALEZ, F.J.; VIDAL, J.L.; DORNHAUS, A.; GHANI, J.; SERRANO, A.R.; CHITTKA, L. Chemical compounds of the foraging recruitment pheromone in bumble bees **Naturwissenschaften** v. 92, p.371–374, 2005.
- GRUBER, B.; ECKEL, K.; EVERAARS, J.; DORMANN, C. F. On managing the red mason bee (*Osmia bicornis*) in apple orchards. **Apidologie**, n.42, p.564–576, 2011.
- GUEDES, E.L.F. **Identificação dos insetos e semioquímicos envolvidos na polinização da pinheira (*Annona squamosa* L.)** Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em agricultura e ambiente. Universidade Federal de Alagoas, Arapiraca, 2015.

GUÉDOT,C.; PITTS-SINGER,T.; BUCKNER,J,S.; BOSCH,J.; KEMP,W.P. Olfactory cues and nest recognition in the solitary bee *Osmia lignaria* **Physiological Entomology** v.31,p.110–119,2006.

HAMILTON-KEMP TR, LOUGHRIN JH, ANDERSON RA Identification of some volatile compounds from strawberry flowers. **Phytochemistry** v.29, p.2847–2848, 1990.

HARBORNE, J. B. Twenty-five years of chemical ecology. **Natural Product Reports**, v.18, p.361-379, 2001.

HARBORNE, J.B. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. 3ed. **Chapman**, London, UK, 1998.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2007**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/default.shtm>> Acesso em: 12 dez. 2016

IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; NUNES-SILVA P. As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o Código Florestal Brasileiro. **Biota Neotropica**, v.10, n.4,p. 59-62. 2010.

IPBES. Intergovernmental science-policy platform on biodiversity and Ecosystem services pollinators, pollination and food production. Disponível em < <http://www.ipbes.net>> acessado em 08/03/2017.

JAKOBSEN,H.B.; KRISTJANSSON, K.; ROHDE, B.; TERKILDTSEN,M.;OLSEN,C. E. Can social bees be influenced to choose a specific feeding station by adding the scent of the station to the hive air? **Journal Chemical Ecology** v.21, n.11, p.1635– 1648, 1995.

JESUS B.M.V.; GARÓFALO C.A. Nesting behaviour of *Centris (Heterocentris) analis* (Fabricius) in southeastern Brazil (Hymenoptera, Apidae, Centridini). **Apidologie**, v.31, n.4, p.503-515, 2000.

JUNQUEIRA, C.N.; HOGENDOORN, K.; AUGUSTO, S.C. The Use of Trap-Nests to Manage Carpenter Bees (Hymenoptera: Apidae: Xylocopini), Pollinators of Passion Fruit (Passifloraceae: *Passiflora edulis f. flavicarpa*). **Entomological Society of America**, v.105, n.6, p.884–889, 2012.

JURGENS.A, DOTTERL.S., Chemical composition of anther volatiles in ranunculaceae: genera-specific profiles in anemone, aquilegia, caltha, pulsatilla, ranunculus, and trollius species. **American Journal of Botany** n.91,v.12,p.1969–1980, 2004.

KLATT, B.K.; BURMEISTER, C.; WESTPHAL, C.; TSCHARNTKE, T.; VON FRAGSTEIN,M. Flower Volatiles, Crop Varieties and Bee Responses. **Plos One** n.8, v.9, 2013.

KLEINERT-GIOVANNINI, A. The influence of climate factors on flight activity of *Plebeia emerina* Friese (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) in winter. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 26, n. 01, p. 1-13, 1982.

- KÖPPEN, W. Climatologia: com um estudo de los climas de latierra. Publications In: **Climatology**. Laboratory of Climatology, New Jersey, 1948. Disponível em <<https://pt.scribd.com/document/55213396>>. Acessado em Jan/10/2017>
- KRAUS, B. Effects of honey-bee alarm pheromone compounds on the behaviour of *Varroa jacobsoni*. **Apidologie**.v.21, p. 127-134, 1990.
- KREMEN, C. et al., Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of land-use change **Ecology Letters**.n.10, p.299–314, 2007.
- LANGENHEIM, J.H. Plant resins: chemistry, evolution, ecology and ethnobotany. Portland, **Oregon**: Timber Press.586 p., 2003.
- LEONHARDT, S.D.; SCHMITT, T.; BLUTHGEN, N. Tree Resin Composition, Collection Behavior and Selective Filters Shape Chemical Profiles of Tropical Bees (Apidae: Meliponini) **Plos One**, v.6, p.1–10, 2011.
- LORENZO, J. M. Influence of the type of fiber coating and extraction time on foal dry-cured loin volatile compounds extracted by solid-phase microextraction (SPME). **Meat Science** v.96, p.179-186,2014.
- LOSEY, J.E.; VAUGHAN, M. The Economic Value of Ecological Services Provided by Insects. **BioScience**. n.56, v.4, p. 311-323, 2006.
- MACHADO I.C. Oil-collecting bees and related plants: a review of the studies in the last twenty years and case histories of plants occurring in NE Brazil. In: Freitas B.M., Pereira J.O.P., editors. **Solitary bees**: conservation, rearing and management for pollination. p. 255–280, 2004.
- MAGALHÃES C.B.; FREITAS B.M. Introducing nests of the oil-collecting bee *Centris analis* (Hymenoptera: Apidae: Centridini) for pollination of acerola (*Malpighia emarginata*) increases yield. **Apidologie**. v.44, p.234–239, 2013.
- MAPA - **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**- Manual de Garantia de Qualidade Analítica: Resíduos e Contaminantes em alimentos. Brasília, 2011.
- MARTINS A.C. **Evolução das abelhas coletoras de óleos florais *Centris* e *Epicharis*: inferências a partir da filogenia molecular datada da subfamília Apinae e das plantas produtoras de óleo floral da região neotropical**. Tese Doutorado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba 2014
- MATSUMOTO, S.; ABE, A.; MAEJIMA, T. Foraging behavior of *Osmia cornifrons* in an apple orchard. **Scientia Horticulturae**.n.12, p.173–79, 2009.
- MESQUITA, T. M.; VILHENA, A. M. G. F.; AUGUSTO, C. S. Ocupação de ninhos-armadilha por *Centris (Hemisiella) tarsata* Smith, 1874 e *Centris (Hemisiella) vittata* Lepeletier, 1841 (Hymenoptera: Apidae: Centridini) em áreas de Cerrado. **Bioscience Journal**, v.25, n.5, p.124-132, 2009

MICHENER C.D. The bees of the world. Baltimore, Maryland, USA: The John Hopkins University Press. 2000.

MORATO, E. F.; GARCIA, M. V. B.; CAMPOS, L. A. D. O. Biologia de *Centris Fabricius* (Hymenoptera, Anthoporidae, Centridini) em matas contínuas e fragmentos na Amazônia Central. **Revista Brasileira de Zoologia**, n.16, v.4, p.1213-1222, 1999.

MORATO, E.F.; MARTINS, R.P. An overview of proximate factors affecting the nesting behavior of solitary wasps and bees (Hymenoptera: Aculeta) in preexisting cavities in wood. **Neotropical Entomology**, v.35, n.3, p.285-298, 2006.

MORO, M.F.; MACEDO, M.B.; MOURA-FÉ, M.M.; CASTRO, A.S.F.; COSTA, R.C. Vegetação, unidades fitoecológicas e diversidade paisagística do estado do Ceará. **Rodriguésia** v.66, n.3, p.717-743, 2015.

MOURE J.S.; MELO G.A.R.; VIVALLO F. Catálogo Moure's **bee catalogue**. Disponível em <moure.cria.org.br> acessado em 10/12/16.

NABHAN, G.P.; BUCHMANN, S.L. Pollination services: biodiversity's direct link to world food stability. In: DAILY, G. Ecosystem services: benefits supplied to human societies by natural ecosystems. Washington: **Island**, p.133-150, 1997.

NEVES, C.S.V.J.; MURATA, I.M.; AINDA, F.T.; BORGES, A.V.; FONSECA, I.C.B. Recuperação de plantas de genótipos de aceroleira afetadas por geada no norte do Paraná. Semina, **Ciências Agrárias**, Londrina v.23, n.2, p.173-178, 2002.

NIU, Y.; HARDY, G.; AGARWAL, M.; HUA, L.; REN, Y. Characterization of volatiles *Tribolium castaneum* (H.) in flour using solid phase microextraction-gas chromatography mass spectrometry (SPME-GCMS). **Food Science and Human Wellness** v.5, p.24-29, 2016.

OLIVEIRA, F. L.; DIAS, V. H. P.; COSTA, E.M.; FILGUEIRA, M. A.; SOBRINHO, J. E. Influência das variações climáticas na atividade de vôo das abelhas jandaira *Melipona subnitida* Ducke (Meliponinae) **Revista Ciência Agrônômica**, v. 43, n. 3, p. 598-603, 2012.

OLIVEIRA, R.; SCHLINDWEIN C. Searching for a manageable pollinator for acerola orchards: the solitary oil collecting bee *Centris analis* (Hymenoptera: Apidae: Centridini). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 102, n. 1, p. 20-273, 2009.

PARREIRA, F.V.; CARDEAL, Z. L. Amostragem de Compostos Orgânicos Voláteis no ar utilizando a técnica de Microextração em Fase Sólida. **Química Nova** v.28, n.4, p.646-654, 2005.

PAWLISZYN, J. Theory of solid-phase microextraction. **Journal of Chromatographic Science**. v.38, p.270-278, 2000.

PENA-ALVAREZ, A.; CAPELLA, S.; JUAREZ, R.; LABASTIDA, C. Determination of terpenos in tequila by solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** v.1134, p.291-297, 2006.

PIANARO A. **Ecologia Química de Abelhas Brasileiras: *Melipona rufiventris*, *Melipona scutellaris*, *Plebeia droryana*, *Nannotrigona testaceicornis*, *Tetragonisca angustula* e *Centris trigonoides***. 2007. 132p. (Dissertação de Mestrado). Universidade Estadual de Campinas Instituto de Química. Campinas SP, 2007.

PIGOZZO, C. M.; VIANA, B. F. Estrutura da rede de interações entre flores e abelhas em ambiente de caatinga **Oecologia Australis**. n.14, v.1.p.100-114, 2010.

PINHEIRO, J.N.; FREITAS, B.M. Efeitos letais dos pesticidas agrícolas sobre polinizadores e perspectivas de manejo para os agroecossistemas brasileiros. **Oecologia Australis**, v.14, n.1, p.266-281, 2010.

PITTS-SINGER, T. L.; CANE, J. H.. The Alfalfa *Leafcutting* Bee, Megachilerotundata: The World's Most Intensively Managed Solitary Bee. Annu. **Review of Entomology**, n.56, p.221-237, 2011.

POTTSS.G.; BIESMEIJER, J.C.; KREMEN, C.; NEUMANN, P.; SCHWEIGER, O.; KUNIN, W.E. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. Trends **Ecology & Evolution**.n.25, v.6, p.345-53, 2010.

RABELO, L.S.; VILHENA, A.M.G.F.; FERREIRA B.E.M.A. **Amplitude do nicho alimentar de *Centris (Heterocentris) analis (Fabricius) (Apidae, Centridini)***. Encontro de iniciação científica. Universidade Federal de Uberlândia, 2009.

RAGUSO A.R.; ROY B.A. Floralscent production by *Puccinia rust* fungi that mimic flowers. **Molecular Ecology** n.7, p.1127—1136, 1998.

RAMOS M.C.; RÊGO M.M.C ; ALBUQUERQUE PMC Ocorrência de *Centris (Hemisiella) vittata* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae: Centridini) no Cerrado do Nordeste do Maranhão, Brasil. **Acta amazônica** v.37, n.1, p.165 – 168, 2007.

RATNAYAKE,R.M.C.S.;GUNATILLEKE,I.A.U.N.;WIJESUNDARA,D.S.A.;SAUNDERS, R.M.K. Pollination ecology and breeding system of *Xylopiya championii* (Annonaceae): curculionid beetle pollination, promoted by floral scents and elevated floral temperatures. **Journal of Plant Sciences**, v. 168, p. 1255–1268, 2007.

RCPol-Rede de Catálogos Polínicos online. Disponível em < www.rcpol.org.br>

REGO M.M.C.; ALBUQUERQUE P.M.C.; RAMOS M.C.; CARREIRA L.M. Aspectos da biologia de nidificação de *Centris flavifrons* (Friese) (Hymenoptera:Apidae,Centridini),um dos principais polinizadores do murici (*Byrsonima crassifolia* L. Kunth, Malpighiaceae), no Maranhão. **Neotropical Entomology**, v.35, n.5, p.579–587, 2006.

RIBEIRO E.K.M.D.; RÊGOM.M.C.; MACHADO I.C.S. Cargas polínicas de abelhas polinizadoras de *Byrsonima chrysophylla* Kunth. (Malpighiaceae): fidelidade e fontes alternativas de recursos florais. **Acta Botanica Brasilica**, v.22, n.1, p.165-17, 2008.

ROMBEIN. K. V. Trap-nesting wasps and bees: Life, histories, nests and associates. Washington: **Smithsonian Institution Press**, 570p, 1967.

SAZAN M.S.; QUEIROZ E.P.; FERREIRA-CALIMAN M.J.; PARRA-HINOJOSA A.; SILVA C.I.; IMPERATRIZ-FONSECA V.L.; GARÓFALO C.A. Manejo dos Polinizadores da Aceroleira 1ª ed. - Ribeirão Preto, SP. **Holos**, 2014.

SCHLINDWEIN, C. Frequent oligolecty characterizing a diverse bee-plant community in a xerophytic bushland of subtropical Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, Lisse, n.33, p.46-59, 1998.

SCHWERDTFEGGER, M.; GERLACH, G. Anthecology in the neotropical genus *Anthurium* (Araceae): a preliminary report. **Selbyana** n.23, v.2, p.258–267, 2002.

SHOGOMATSUMOTO; TSUTOMUMAEJIMA. Several New Aspects of the Foraging Behavior of *Osmia cornifrons* in an Apple Orchard. **Psyche**.v.2010, p.1-6, 2009.

SILVA, C. I.; ALEIXO, K.P.; NUNES-SILVA B.; FREITAS, B.M; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. Guia ilustrado de abelhas polinizadoras no Brasil. Cartilha. **Ministério do Meio Ambiente**. Brasília, DF.2014.

SILVA, C. I.; BORDON, N.G.; ROCHA FILHO, L.C.; GARÓFALO, C.A. The importance of plant diversity in maintaining the pollinator bee, *Eulaema nigrita* (Hymenoptera: Apidae) in sweet passion fruit fields. **Revista Biología Tropical**, v. 60, n.4, p.1553-1565, 2012.

SILVA, F.O.; VIANA, B.F.; NEVES, E.L. Biologia e Arquitetura de ninhos de *Centris (Hemisiella) tarsata* Smith (Hymenoptera: Apidae: Centridini). **Neotropical Entomology**, v.30, n.4, p.541-545, 2001.

SILVA, V.P.; PAZ, M.; CAVALCANTE,R. ; NASCIMENTO,R. Strategy for correction of matrix effect on the determination of pesticides in water bodies using SPME-GC-FID. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.00, n.00, p.1-10, 2016.

SILVA,C.I.; MARCHI, P.; ALEIXO, K.P.; SILVA,B.N. ;FREITAS,B.M.;GARÓFALO,C.A.; IMPERATRIZ-FONSECA,V.L.;OLIVEIRA,P.E.A.M.;ALVES-DOS-SANTOS, I. Manejo de polinizadores e polinização de flores do maracujazeiro. Cartilha. **Ministério do Meio Ambiente**. Brasília, DF. 2014.

SIMPSON B.B.; NEFF J.L. Floral Rewards : Alternatives to Pollen and Nectar. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.68, p.301–322, 1981.

STEFFAN-DEWENTER I.; SCHIELE S. Do resources or natural enemies drive bee population dynamics in fragmented habitats? **Ecology**. v.89, n.5, p.375–1387, 2008.

TEIXEIRA, L. A. G.; MACHADO, I. C. Sistema de polinização e reprodução de *Byrsonima sericea* DC. (Malpighiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 14, p. 347-357, 2000.

THEIS,N,; RAGUSO,RA The effect of pollination on floral fragrance in thistles. **Journal Chemical Ecology** v.3, p.2581–2600.

- THOLL, D.; BOLAND, W.; HANSEL, A.; LORETO, F.; ROSE, U.S.R.; SCHNITZLER,JP Practical approaches to plant volatile analysis. **The Plant Journal**. v.45, p.540–560, 2006.
- THOMPSON,H. Risk assessment for honeybees and pesticides-recent developments and ‘new issues’ pest **management science**.n.66,p.1157-1162.
- TORCHIO, P. F.; TEPEDINO, V. J. Sex Ratio, Body Size and Seasonality in a Solitary Bee, *Osmia lignaria propinqua* Cresson (Hymenoptera: Megachilidae). **Evolution**. n.5, v. 34, p. 993-100, 1980.
- TORRENS,J.; LÓPEZ-TAMAMES,E. ; BUXADERAS,S. Volatile Compounds of Red and White Wines by Headspace – Solid-Phase Microextraction Using Different Fibers. **Journal of Chromatographic Science** v.42, p.310–316, 2004.
- VALENTE, A.L.; AUGUSTO, F. Microextração por Fase Sólida. **Química nova**, v.23, p.523–530,2000.
- VIANA, B.F.; ALVES-DOS-SANTOS, I. Bee diversity of the coastal sand dunes of Brazil, p. 135-153. In: P.G. Kevan; V.L. Imperatriz Fonseca (eds.), Pollinating bees: The conservation link between agriculture and nature. **Ministério do Meio Ambiente**, Brasília, 313pp. 2002.
- VIEIRA DE JESUS, B.M.; GAROFALO, C.A. Nesting behaviour of *Centris (Heterocentris) analis* (Fabricius) in southeastern Brazil (Hymenoptera, Apidae, Centridini). **Apidologie**, n.31, p.503–515, 2000.
- VILHENA A.M.G.F.; RABELO L.S.; BASTOS E.M.A.F.; AUGUSTO S.C. Acerola pollinators in the savanna of Central Brazil: temporal variations in oil-collecting bee richness and a mutualistic network. **Apidologie** v.4,p.51–62, 2012.
- VILHENA, A.M.G.F.; AUGUSTO, S.C. Polinizadores da aceroleira *Malpighia emarginata* DC (Malpighiaceae) em área de cerrado no Triângulo Mineiro. **Bioscience Journal**, v.23, p.14-23, 2007.
- VINSON S.B.; FRANKIE G.W.; WILLIAMS H.J. Nest liquid resources of several cavity nest bees in the genus *Centris* and the identification of a preservative, levulinic acid. **Journal of Chemical Ecology**, v.32, p.2013-2021, 2006.
- VINSON, S.B.; FRANKIE, G.W. R.A.O. A The Importance of odor in nest site selection by a lodger Bee, *Centris bicornuta* Mocsary (Hymenoptera: Apidae) in the dry forest of Costa Rica. **Neotropical Entomology**, v.40, n.2, p.176-180, 2011.
- VINSON, S.B.; FRANKIE, G.W.; WILLIAMS, H.J. Chemical ecology of bees of the genus *Centris* (Hymenoptera: Apidae).**The Florida Entomologist** v.79, n.2, p.109-129, 1996.
- VIVALLO F.; VÉLEZ D.; FERNÁNDEZ F. A new species of *Centris (Xanthemisia)* Moure, 1945 from South America with a synopsis of the known species of the subgenus in Colombia (Hymenoptera: Apidae: Centridini). **Zootaxa**. v.3694, p.81–91, 2013.
- VOGEL S.; MACHADO I.C.; Pollination of four sympatric species of *Angelonia* (Scrophulariaceae) by oil-collecting bees in NE. Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, v.178, p. 153–178, 1991.

WCISLO, W.T. Nest localization and recognition in a solitary bee, *Lasioglossum (Dialictus) figueresi* Wcislo (Hymenoptera: Halictidae), in relation to sociality. **Ethology** v.92, n.108-123, 1992.

WILLMER, P.G.; NUTTMAN, C.V.; RAINE, N.E.; STONE, G.N.; PATTRICK, J.G.; HENSON, K.; STILLMAN, P.; MACLLORY, L.; POTTS, S.G.; KNUDSEN, J.T. Floral volatiles controlling ant behaviour. **Functional Ecology** v.23, p.888–900, 2009.

XIAOGEN YANG.; PEPPARD, T. Solid-phase microextraction for flavor analysis. **Journal of Agricultural and food chemistry** v.42, n.9, p.1925–1930, 1994.

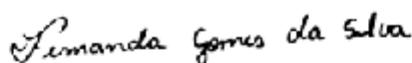
ZARBIN, P.H.G., PINTO-ZEVALLOS, D.M.; MARTINS, C.B.C.; PELLEGRINO, A.C. Compostos Orgânicos Voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. Revisão. **Química Nova**, v. 36, n. 9, p. 1395–1405, 2013.

ZARBIN, P.H.G.; RODRIGUES, M.A.C.M. Feromônios de insetos: Tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 722–731, 2009.

DECLARAÇÃO
CORREÇÃO DO PORTUGUÊS E NORMAS TÉCNICAS

Eu, FERNANDA GOMES DA SILVA, portadora do RG.: 99001059890 SSP/AL, graduada no curso de Letras-licenciatura pela Universidade Federal de Alagoas (UFAL), declaro, para os devidos fins, que realizei revisão de parte da dissertação – o que compete ao RESUMO GERAL e ao CAPÍTULO III – intitulada “**ECOLOGIA QUÍMICA COMO UM MEDIADOR NA ATRATIVIDADE DE FÊMEAS *Centris analis* (HYMENOPTERA, APIDAE) PARA COLONIZAÇÃO DE NINHOS, CRIAÇÃO E MANEJO**”, autoria de Paulo Herbesson Pereira de Sousa, estudante concluinte de mestrado, área de concentração de produção e melhoramento animal, do programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela Universidade Federal do Ceará – UFC. A revisão consistiu em correção gramatical, adequação vocabular, inteligibilidade do texto de acordo com as normas técnicas, bem como eventuais correções de contextualização.

Maceió, 22 de maio de 2017.



Fernanda Gomes da Silva
Graduada em Letras – Licenciatura
Universidade Federal de Alagoas – UFAL


 REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
 MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

O REITOR DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS *Profª Ana Dayse Rezende Dorea*
 _____, no uso de suas atribuições e tendo em vista a
 conclusão do Curso de Graduação em Letras
 em 29/09/2010, confere o título de Licenciado em Letras
 a Fernanda Gomes da Silva, de nacionalidade Brasileira
 natural de São Paulo - SP nascido(a) a 23/11/1982
 portador(a) da Carteira de Identidade nº 99001059890, expedida pelo(a) Secretaria
Segurança Pública do Estado de Alagoas e outorga-lhe o presente Diploma a fim de
 que possa gozar de todos os direitos e prerrogativas legais.
 Maceió, 29 de setembro de 2010

[Assinatura]
Pró-Reitor de Graduação
[Assinatura]
Diplomado
[Assinatura]
Reitor



28 JAN 2014
 65
 Verificar se o original está em conformidade com o Protocolo de Autenticação
 Arquivar em pasta
 Encaminhar para o setor responsável

<p>APOSTILA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS</p> <p>O (A) diplomado (a) concluiu, nesta Universidade, a habilitação em: PORTUGUES E LITERATURA - LICENCIATURA PLENA</p> <p>Maceió-AL, em 29 de setembro de 2010.</p> <p><i>Vânia Silva Costa</i> (Chefe da SERD)</p> <p><i>Mary Olo Capomo Cabocarta</i> (Diretora do D.R.C.A.)</p> <p></p>	<p style="text-align: center;">MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Curso de <u>Letras</u></td> <td style="width: 50%;">Diploma registrado sob nº <u>269</u></td> </tr> <tr> <td>reconhecido pelo(a) <u>Dorea</u></td> <td>às fls. <u>27-0</u> do livro nº <u>14</u></td> </tr> <tr> <td>(D.O.de <u>03.1.01.1.55</u>)</td> <td>conforme Processo nº <u>1200612000113</u></td> </tr> </table> <p>Maceió, em <u>29</u> de <u>setembro</u> de <u>2010</u></p> <p><i>Vânia Silva Costa</i> (Chefe da Seção de Expediente e Registro de Diploma)</p> <p>Visto: <i>Olivanete Silva</i> Especialista do D.R.A.</p> <p>Confere: <i>Mary Olo Capomo Cabocarta</i> Diretora do D.R.A.</p>	Curso de <u>Letras</u>	Diploma registrado sob nº <u>269</u>	reconhecido pelo(a) <u>Dorea</u>	às fls. <u>27-0</u> do livro nº <u>14</u>	(D.O.de <u>03.1.01.1.55</u>)	conforme Processo nº <u>1200612000113</u>
Curso de <u>Letras</u>	Diploma registrado sob nº <u>269</u>						
reconhecido pelo(a) <u>Dorea</u>	às fls. <u>27-0</u> do livro nº <u>14</u>						
(D.O.de <u>03.1.01.1.55</u>)	conforme Processo nº <u>1200612000113</u>						

Nº 016188