

**INSTITUTO FEDERAL DE
EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA**
SUL DE MINAS GERAIS
Campus Inconfidentes

ARNALDO SCHEFFER

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS QUÍMICOS
DA BORRA DE PRÓPOLIS VERDE**

INCONFIDENTES- MG

2016

ARNALDO SCHEFFER

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS QUÍMICOS
DA BORRA DE PRÓPOLIS VERDE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como pré-requisito para a aprovação no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais - *Campus Inconfidentes*, para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Wallace Ribeiro Corrêa

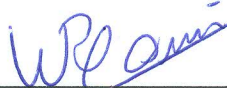
INCONFIDENTES – MG

2016

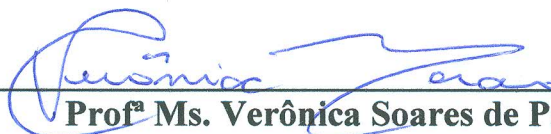
ARNALDO SCHEFFER

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS QUÍMICOS
DA BORRA DE PRÓPOLIS VERDE**

Data de aprovação: 18 de Outubro de 2016



**Prof. Dr. Wallace Ribeiro Corrêa
(IFSULDEMINAS - *Campus Inconfidentes*)
Professor Orientador**



**Prof^a Ms. Verônica Soares de Paula Morais
(IFSULDEMINAS - *Campus Inconfidentes*)
Membro 1**



**Prof. DSc. Rodrigo Palomo de Oliveira
(IFSULDEMINAS - *Campus Inconfidentes*)
Membro 2**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, que sempre fui buscar força e inspiração. Só foi possível fazer este trabalho com a ajuda dos meus amigos, meus agradecimentos sinceros. A minha filha Luiza meu eterno agradecimento pelo seu apoio e incentivo. Agradeço em especial ao professor Wallace meu orientador e também a todos os professores que contribuíram para que eu pudesse dar esse passo importante em minha vida.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - ESI (-) - MS impressão digital do extrato etanólico de borra de própolis verde. 13

Figura 2 -Cromatogramas Representante UPLC de extratos etanólicos de própolis verde e borras própolis verde com tempos de retenção das substâncias identificadas. 16

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. METODOLOGIA.....	11
2.1. AMOSTRAS	11
2.2. EXTRATOS.....	11
2.3. UPLC-ESI (-) – IMPRESSÕES DIGITAIS - MS / MS e ESI (-)	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
3.1. INSERÇÃO DIRETA DE ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	13
3. CONCLUSÃO	17
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18

RESUMO

A própolis é uma substância resinosa obtidas pelas abelhas *Apis mellifera*, composta principalmente de resinas vegetais. Apresenta-se a composição química complexa e os seus principais componentes bioativos são os flavonoides e uma ampla variedade de compostos fenólicos. Portanto, este estudo teve como objetivo identificar e quantificar os marcadores iônicos, característicos da própolis verde e da borra de própolis. A identificação e quantificação foi realizada por UPLC-MS, e permitiu identificar 13 substâncias que mostraram concentrações muito semelhantes ao controle da própolis verde, justificando assim futuras prospecções sobre a borra de própolis.

Palavras-chave: *Apis mellifera*; bioativos; potencial farmacológico.

ABSTRACT

Bee Propolis is a product produced by *Apis mellifera*, composed mainly of vegetable resins. Shows the chemical composition of complex and its major bioactive components are flavonoids and a wide variety of phenolic compounds. Therefore, this study aimed to identify and quantify the ionic characteristic markers of green propolis. The identification and quantification was performed by UPLC-MS, and identified 13 substances that showed very similar concentrations to the control of green propolis, thus justifying future prospects of propolis grounds.

Key words: *Apis mellifera*; bioactive; pharmacological potential.

1. INTRODUÇÃO

A própolis é um produto das abelhas *Apis mellifera*, elas coletam resinas de diferentes partes da planta como broto, botão e exudatos resinosos que são transformados na presença de enzimas das abelhas na própolis (BARDANA, 1998). Ela é usada para fechar pequenas aberturas, embalsamar insetos mortos dentro da colméia e proteger contra microorganismos invasores e insetos (ANKOVAA *et al.*, 2000).

Sua composição química é complexa e varia de acordo com a origem geográfica e está intimamente relacionado com a ecologia da flora de cada região visitada pelas abelhas (BANKOVA, 2005). Em regiões de clima temperado, as abelhas *Apis mellifera* obtêm resinas principalmente a partir dos botões das espécies *Populus spp.* e seus híbridos (BANKOVA, 2005;. GREENAWAY *et al.*, 1990) e os principais componentes bioativos são os flavonoides (FALCÃO *et al.*, 2013.).

Em regiões tropicais, como o Brasil, abelhas *Apis mellifera* visitam um grande número de plantas e, assim, a composição da própolis é muito mais variada, destacando flavonoides e uma ampla variedade de compostos fenólicos (SAWAYA *et al.*, 2011). A análise do pólen destas amostras de própolis do estado de Minas Gerais compreende as plantas *Astronium sp.*, Alecrim-do-campo, *Eucalyptus sp.*, *Hyptis sp.* e *Polyanthes vernonia*. Assim, a origem botânica da resina própolis verde pode ser recolhida a partir de botões de alecrim-do-campo (PARK *et al.*, 2004;. BASTOS *et al.*, 2000). Por isso, os estudos sobre as atividades biológicas da própolis devem ser complementados por informações sobre a sua composição química e origem

botânica da amostra, ou pelo menos menção da origem geográfica, de modo que estas atividades biológicas podem ser relacionadas com um tipo específico de própolis (DE FUNARI *et al.*, 2007).

Várias atividades terapêuticas que envolvem a própolis têm sido observadas experimentalmente, tanto *in vitro* e *in vivo*, incluindo antitumoral (GULCELIK *et al.*, 2012;. FROZZA *et al.*, 2013.), Antioxidante (FROZZA *et al.*, 2013;. LAGOURI *et al.*, 2013;. MELLO E HUBINGER, 2012), anti-inflamatório (SZLISZKA *et al.*, 2013;. SHI *et al.*, 2012), hepatoprotector (V AMBARDEKAR *et al.*, 2012), imunomodulação (ORSATTI *et al.*, 2010) e antimicrobiana (KALOGEROPOULOS *et al.*, 2009).

O conhecimento destes inúmeros benefícios faz à própolis ser amplamente utilizada no Brasil, e da Lei nº 1283/50 e nº 7,889 / 89 e Resolução - RDC nº 138, de 29 de maio de 2003. Assim, pequenos apicultores, indústrias e outros produtores de mel, realizam a extração da própolis com álcool cereais e vendem o produto em lojas locais. O resíduo resultante da extração da própolis verde é chamado de borras de própolis. Assim, pequenos apicultores ao produzirem o extrato de própolis, descartam grandes quantidades de borras que não tem utilidade, mas que poderia ser utilizada devido ao rico potencial.

Segundo Correa *et al.*, 2016 impressões digitais MS mostram que as substâncias bioativas da própolis verde ainda permanecem nos resíduos da própolis mesmo depois da extração, demonstrando a presença de marcadores de própolis verde como do Artepillin C e o ácido dicafeoilquínico, além de demonstrar que a borra de própolis ainda apresenta atividades biológicas antioxidante e antimicrobiana.

Verificando-se a falta do uso da borra de própolis verde, este estudo teve como objetivo verificar e quantificar a composição química deste resíduo da própolis verde, no intuito de aproveitamento desse produto rico em compostos.

2. METODOLOGIA

2.1. AMOSTRAS

As amostras de própolis verde e borras de própolis verde foram coletadas em 2014 e fornecidas para o IFSULDEMINAS no município de Inconfidentes (Minas Gerais, Brasil), após a exploração convencional. A borra de própolis verde foi armazenada a 18 ° C até a extração.

2.2. EXTRATOS

Cento e cinquenta gramas de resíduo da própolis foram triturados e extraiu-se em 1000 ml de etanol PA, à temperatura ambiente. Após esse período, a solução extraída foi filtrada e o solvente foi retirado e a partir da solução com um evaporador rotativo, obtendo-se o extrato bruto de borras de própolis.

2.3. UPLC-ESI (-) – IMPRESSÕES DIGITAIS - MS / MS e ESI (-)

As análises cromatográficas das soluções etanólicas dos extratos de borra de própolis secas (1 mg/mL) foram realizadas num cromatógrafo UPLC Acquity acoplada com um espectrómetro de massa TQD Acquity (Waters Micromass-Manchester, Inglaterra), com

uma fonte de ESI. Utilizou-se uma coluna C18 Waters Acquity BEH (2,1 milímetros x 50 mm x 1,7 M de tamanho de partícula). O solvente A era de água mili-Q purificada com ácido fórmico a 0,1% e o solvente B foi acetonitrilo. A taxa de fluxo foi de 0,2 ml / min e 5 uL das amostras foram injetadas; com um gradiente linear a partir de 5% de acetonitrilo e aumentando a até 100% de metanol em nove minutos, realizada até 12 minutos e, em seguida, voltando às condições iniciais, seguido por re-equilíbrio da coluna. ESI ionização em modo de íon negativo foi utilizado sob as seguintes condições: -3,50 capilar kV, Cone de -30 V, fonte de temperatura de 150 ° C, A dessolvatação Temperatura 350 ° C e energia de colisão 25V, a aquisição de dados entre 100 e 800 m / z. Os compostos foram identificados por comparação dos seus espectros de fragmentação ESI-MS/MS com os dados da literatura (MARCUCCI *et al.*, 2008;.. SAWAYA *et al.*, 2011).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. INSERÇÃO DIRETA DE ESPECTROMETRIA DE MASSA

A Inserção direta ESI (-) - MS impressões digitais das amostras de extrato de própolis verde e borras de própolis verde, identificou certo marcador de iões característicos de própolis verde brasileira nas duas amostras de acordo com os dados publicados (MARCUCCI *et al.*, 2008; SAWAYA *et al.*, 2011), (Figura 1).

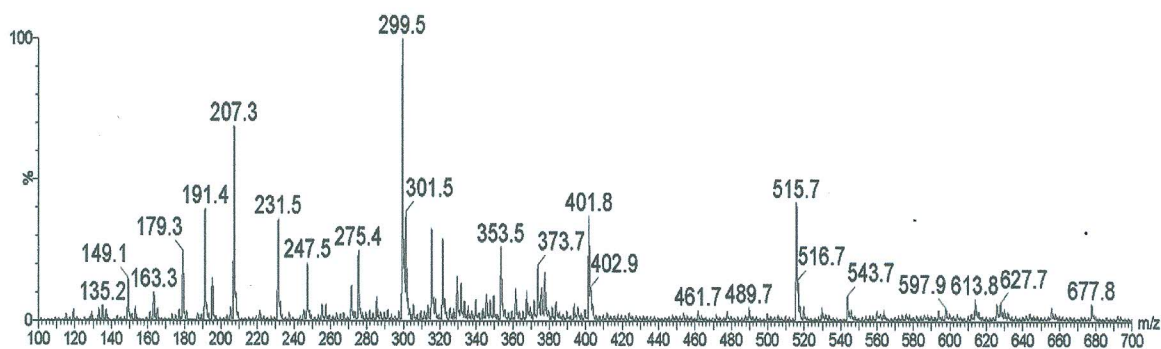


Figura 1 - ESI (-) - MS impressão digital do extrato etanólico de borra de própolis verde.

A Inserção direta da espectrometria de massa de impressões digitais (ESI (-) - MS) (SAWAYA *et al.*, 2011) tem provado ser um método rápido e confiável para a caracterização própolis, no entanto, quantificar extrato de própolis verde e borras de própolis

verde, separação cromatográfica foi usado para evitar erros de identificação. A própolis é uma mistura complexa, de modo que a separação e identificação dos compostos individuais é uma tarefa difícil, incluindo isômeros ou análogos (SHI *et al.*, 2012). A análise quantitativa dos extratos por UPLC (Figura 2) mostrou um perfil cromatograma típico de extrato de própolis e metanol permitiu a confirmação de 13 substâncias fenólicas (Tabela 3): ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido 3- [4-HY droxy-3- (oxo-butenil) -fenil acrílico] ácido, 3,4-di-hidroxi-5-prenylcinnamic, ácido 3,4-diplenyl-4-hidroxicinâmico, Kaempferide, dihydrokaempferid, 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenil -2H-1-benzopiran-6-propenóico, ácido 3-cafeoilquínicos, ácido 5-cafeoilquínico, 15-acetoxi-cupressic ácido, ácido 4,5-dicaffeoylquinnic, ácido 3,4-dicafeoilquínico, confirmada com as suas estruturas químicas de acordo com a MS dados e retenção do tempo em comparação com os dos compostos padrão. A Tabela 1 a seguir apresenta os compostos presentes no extrato etanólico da Própolis verde.

Tabela 1 - Caracterização de compostos presentes no extrato etanólico de própolis verde e projeto da própolis verde:

[M-H]- m/z	Nome	Tempo de retenção	Concentração (mg/mL)		Principais fragmentos m/z
			Borra de própolis	Própolis verde	
163	p-coumaric acid	2.58	1.83	1.91	163 (10), 119 (100), 93 (15)
179	caffeic acid	2.07	1.68	1.98	179 (10), 135 (100) 107 (10)
231	3-[4-hydroxy-3-(oxo-butenyl)-phenyl acrylic] acid	4.82	2.31	2.67	231 (10), 187 (50), 132 (100),
247	3,4-dihydroxy-5-prenylcinnamic acid	3.52	1.74	1.80	247 (20), 203 (100), 185 (10), 148 (55)
299	3,4-diplenyl-4-hydroxycinnamic acid	5.30	2.06	2.12	299 (10), 284 (5), 255 (98), 244 (10), 200 (100), 145 (10)
299	Kaempferide	6.34	3.01	3.40	299 (10), 284 (100), 255 (30), 200 (25), 164 (10), 151 (20), 107 (10)
301	dihydrokaempferid	4.24	1.82	1.99	301 (100), 205 (10), 185 (70), 131 (70)
315	3-hydroxy-2,2-dimethyl-8-prenyl-2H-1-benzopyran-6-propenoic acid	5.73	2.05	2.46	315 (15), 297 (10), 285 (10), 271 (20), 253 (100), 241 (95), 198 (50), 186 (10)
353	3-caffeoylquinic acid	1.58	1.67	1.68	353 (10), 191 (100), 179 (65), 173 (40), 135 (45)
353	5-caffeoylquinic acid	1.93	1.84	2.02	353 (10), 191 (100), 179 (65), 173 (40), 135 (45)
361	15-acetoxy-cupressic acid	3.79	1.71	1.72	361 (100), 301 (30)
515	4,5-dicaffeoylquinnic acid	2.97	1,73	2.07	515 (10), 353 (100), 191 (52), 179 (75), 173 (75), 135 (10)
515	3,4-dicaffeoylquinic acid	3.00	2,39	2.64	515 (10), 353 (100), 191 (52), 179 (75), 173 (75), 135 (10)

A abundância relativa dos principais compostos presentes na própolis verde e borra de própolis verde, demonstraram que o processo de extração tradicional de própolis em Minas Gerais, no Brasil, não é eficaz, resultados esse que corroboram com Corrêa *et al.*, 2016 que verifica a perda de potenciais produtos naturais .

As concentrações presentes em ambas às amostras mensuradas, com base na curva de calibração do ácido cafeico, apresentam valores muito semelhantes (Tabela 3), indicando grande concentração de compostos naturais na amostra de borra quando comparada com o controle. Assim podem-se justificar futuras prospecções e aplicações para a borra de própolis já que esses resultados demonstram a presença dos constituintes ativos na borra de própolis verde.

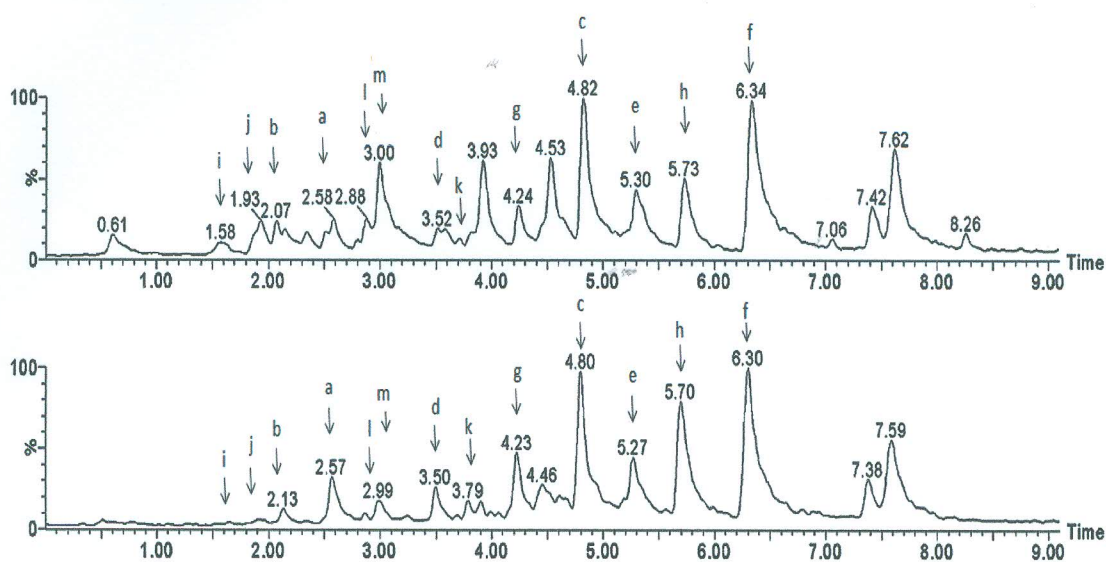


Figura 2.-Cromatogramas Representante UPLC de extratos etanólicos de própolis verde e borras própolis verde com tempos de retenção das substâncias identificadas: a) ácido p-cumárico; b) ácido cafeico; c) 3- [4-HY droxy-3- (oxo-butenil) acrílico -fenil]; d) ácido 3,4-di-hidroxi-5-prenylcinnamic; e) Ácido 3,4-diplenyl-4-hidroxicinâmico; f) Kaempferide; g) dihydrokaempferid; h) 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopiran-6-propenóico; i) ácido 3-cafeoilquínico; j) ácido 5-cafeoilquínico; k) ácido 15-acetoxi-cupressic; G) ácido 4,5-dicaffeoylquinnic; m) ácido 3,4-dicafeoilquínico.

3. CONCLUSÃO

A borra de própolis verde é um resíduo industrial e farmacêutico importante para nosso conhecimento. A análise cromatográfica por UPLC-ESI (-) - MS / MS, descobriram que o método de extração realizada por pequenos apicultores brasileiros não é eficaz, já que as concentrações dos íons marcadores da borra ficaram muito próximas das concentrações encontradas na própolis. Desta forma verifica-se a necessidade de futuras prospecções e aplicações para a borra de própolis.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANKOVAA, V. S. B., ASTROB, S. L. D. E. C., & ARCUCCIC, M. C. M. (2000). Review article Propolis: recent advances in chemistry and plant origin, 31, 3–15.

BANKOVA, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 114–7.

BASTOS, E., OLIVEIRA, V. D. C., & SOARES, A. E. E. (2000). Microscopic characterization of the green propolis, produced in Minas Gerais State, Brazil. *Honeybee Science*, 21(4), 179–180.

CORRÊA, Wallace Ribeiro et al. ESI-MS fingerprinting of residues of green propolis, and evaluation of their antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Apicultural Research*, p. 1-7, 2016.

DE FUNARI, C. S., DE OLIVEIRA FERRO, V., & MATHOR, M. B. (2007). Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(2), 206–212.

FALCÃO, S. I., FREIRE, C., & VILAS-BOAS, M. (2013). A Proposal for Physicochemical Standards and Antioxidant Activity of Portuguese Propolis. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(11), 1729–1741.

FROZZA, C. O. D. S., GARCIA, C. S. C., GAMBITO, G., DE SOUZA, M. D. O., SALVADOR, M., MOURA, S., ROESCH-ELY, M. (2013). Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 52, 137–42.

GREENAWAY, W., SCAYSBROOK, T., & WHATLEY, F. R. (1990). The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. *Bee world*, 71(3), 107–118.

GULCELIK, N., ZEYBEK, D., KAYMAZ, F., GENÇAY, O., SALIH, B., SORKUMN, K., ASAN, E. (2012). Antitumor Activity of Propolis on Differentiated Cancer Cell Lines. *Medicine Science/International Medical Journal*, 1(4), 1.

LAGOURI, V., PRASIANAKI, D., & KRYSTALLY, F. (2013). Antioxidant Properties and Phenolic Composition of Greek Propolis Extracts. *International Journal of Food Properties*, (just-accepted).

MARCUCCI, M. C., SAWAYA, A. C. H. F., CUSTODIO, A. R., PAULINO, N., & EBERLIN, M. N. (2008). HPLC and ESI-MS typification: New approaches for natural therapy with Brazilian propolis. *Scientific Evidence of the Use of Propolis in Ethnomedicine*, 33–54.

MELLO, B. C. B. S., & HUBINGER, M. D. (2012). Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian green propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different pH values. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(12), 2510–2518.

PARK, Y. K., PAREDES-GUZMAN, J. F., AGUIAR, C. L., ALENCAR, S. M., & FUJIWARA, F. Y. (2004). Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1100–1103.

SAWAYA, A. C. H. F., BARBOSA DA SILVA CUNHA, I., & MARCUCCI, M. C. (2011). Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chemistry Central journal*, 5(1), 27.

ORSATTI, C. L., MISSIMA, F., PAGLIARONE, A. C., BACHIEGA, T. F., BÚFALO, M. C., ARAÚJO, J. P., & SFORCIN, J. M. (2010). Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. *Phytotherapy Research*, 24(8), 1141–1146.

SHI, H., YANG, H., & ZHANG, X. (2012). Identification and Quantification of Phytochemical Composition and Anti-inflammatory and Radical Scavenging Properties of Methanolic Extracts of Chinese Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(50), 12403–12410.

SZLISZKA, E., KUCHARSKA, A. Z., SOKOL-LETOWSKA, A., MERTAS, A., CZUBA, Z. P., KROL, W., & (2013). Chemical Composition and Anti-Inflammatory Effect of Ethanolic Extract of Brazilian Green Propolis on Activated J774A.1 Macrophages. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2013, 976415.

V AMBARDEKAR, R., R MAHADIK, K., R PARADKAR, A., & M HARSULKAR, A. (2012). Enhancement of Hepatoprotective Efficacy of Propolis by Fabrication of Liposomes, as a Platform Nano-Formulation for Multi-Component Natural Medicine. *Current Drug Delivery*, 9(5), 477–486.