



Área: Ciência de Alimentos

ÁCIDO P-CUMÁRICO DA PRÓPOLIS DE ABELHAS JATAÍ

Carla Patricia Freitas^{1*}, Denise Bilibio², Lára Franco Santos¹, Nadálin Yandra Botton³,
Ana Caroline Tissiani¹, Luciana Ruschel dos Santos¹

¹Programa de Pós-graduação em Bioexperimentação. Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, Brasil.

²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS), Sertão, RS, Brasil.

³Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS, Brasil.

*E-mail: 182113@upf.br

RESUMO – A própolis é uma substância resinosa e balsâmica produzida pelas abelhas, coletada de brotos e ramos unidas a secreções salivares, cera e pólen. Mais de 300 compostos já foram identificados devido sua composição química ser complexa e variável, diretamente ligada a origem geográfica, botânica, gênero e espécie de abelha, resultando em diferentes atividades biológicas. A padronização dos produtos naturais é uma ferramenta importante para garantir a qualidade, segurança e funções biológicas. Portanto, avaliou-se a composição química dos extratos etanólicos de própolis de abelhas Jataí nas concentrações de 10%, 15% e 20% por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Os resultados mostraram que o ácido p-cumárico foi o único composto detectável nas concentrações de 15% e 20% de EEP.

Palavras-chave: Ácido p-cumárico, Composição, Extrato, Fenólicos, Identificação.

1 INTRODUÇÃO

A meliponicultura refere-se à criação de meliponíneos, conhecida como abelhas nativas ou sem ferrão. A *Tetragonisca angustula* é uma abelha sem ferrão conhecida popularmente como Jataí, pertencente à subfamília das Meliponinas e possui uma distribuição geográfica ampla, sendo encontrada em diversas regiões do Brasil, principalmente na região norte, nordeste e Sul. (VILLAS-BÔAS, 2012).

A própolis é uma combinação de material resinoso e balsâmico coletada pelas abelhas dos ramos, brotos, pólen, flores e exsudatos de árvores unidas com secreções salivares e enzimas produzidas por elas (VASILAKI et al., 2019). As abelhas utilizam a própolis na construção de seus ninhos, como forma de vedamento da colmeia para impedir a entrada de ar e de predadores, além de manter a saúde da colônia e do mel, devido a atividade antimicrobiana presente na sua composição (CAMPOS et al., 2015). A própolis possui propriedades biológicas além da ação antimicrobiana, como propriedades antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora, hipotensiva, cicatrizante, anestésica, antitumoral (FRANCHI et al., 2012), anti-HIV e anticariogênica (PARK et al., 2002), antiviral (CUETO et al., 2011), além de antiprotzoário (GRESSLER et al., 2012) caracterizado pelo sinergismo entre os diversos compostos presentes na própolis.

Apesar da maioria dos estudos estar relacionado a própolis da espécie *Apis mellifera*, motivados pelos resultados significativos dos dados científicos sobre as propriedades farmacológicas da própolis das abelhas, a própolis de muitas espécies de Meliponíneos também tem potencial antimicrobiano, antioxidante e antitumoral (LAVINAS et al., 2019).

Essas propriedades biológicas são devido a composição química da própolis, os constituintes primários são constituídos por 50% de resinas (flavonoides e ácidos fenólicos), 30% de ceras, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de vários compostos orgânicos (FALCÃO et al., 2010) e sua composição química pode variar conforme a origem geográfica, botânica, gênero e espécie de abelha, resultando em diferentes atividades biológicas (TORRES, 2018).

A própolis é constituída por variados compostos químicos e, dentre os fenólicos, os ácidos p-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico como a artepilina C e os flavonoides quercetina, campferida, isosakuranetina, pinocembrina, crisina, naringenina e kaempferol estão frequentemente presentes (PARK et al., 2004).

De acordo com Lanças (2009) as técnicas cromatográficas estão dentre as principais técnicas de separação, principalmente em análise de substâncias com matrizes complexas como fluidos biológicos, produtos naturais e sedimentos de rio, entre outros, devido a sua capacidade de separação dos componentes. As técnicas mais apropriadas para a análise do perfil químico de amostras de própolis são: HPLC-DAD (cromatografia líquida de alta eficiência associada a detecção por absorção eletrônica), LC-MS-MS (cromatografia líquida-espectrometria de massa) e GC-MS (cromatografia gasosa-espectrometria de massa). A cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada à espectrometria de massas é um método moderno, rápido e sensível, que permite avaliar os perfis químicos das amostras e determinar sua composição qualitativamente, configurando uma ferramenta adequada para a avaliação da composição de matrizes complexas como a própolis.

Portanto, o objetivo do estudo foi analisar o perfil químico de amostras de extratos etanólicos de própolis de abelhas Jataí nas concentrações de 10%, 15% e 20%.

2 MATERIAL E MÉTODOS



2.1 AMOSTRA DE PRÓPOLIS

A própolis bruta foi coletada de apiários localizados na região de Sarandi/RS, proveniente de abelhas nativas Jataí (*Tetragonisca angustula*) e acondicionada em sacos plásticos estéreis. Em seguida, foi encaminhado para o laboratório de Microbiologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS), Campus Sertão, onde foi triturada em moinho tipo ciclone e armazenada em recipiente com fechamento hermético envolto por papel alumínio e mantida sob 4° C.

2.2 PREPARO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS (EEP)

Para obtenção dos extratos etanólicos de própolis preparou-se 20 mL de cada solução nas concentrações de 10, 15 e 20% em álcool etílico 40%. Na sequência as soluções foram submetidas a extração em banho de ultrassom em potência de 40 KHz durante 2 horas a temperatura máxima de 40°C (ZAGO et al., 2020). Após, filtrou-se a solução em papel filtro e removeu-se o sobrenadante. Os extratos foram armazenados em frascos âmbar envolvidos por papel alumínio e colocados sob refrigeração a 4°C até sua utilização.

2.3 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS

Os compostos dos extratos etanólicos de própolis nas concentrações de 10%, 15% e 20% foram caracterizados e quantificados usando um sistema HPLC conectado a um espectrômetro de massa com single quadropolo (LCMS 2020; Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com uma fonte de ionização por electro pulverização (ESI) de acordo com o método descrito por Arruda et al. (2018) e Shimadzu (2018) com modificações. Os padrões externos utilizados de referência foram: Ácido Cafeico, Ácido Ferrulico, Ácido Gálico, Catequina, Rutina, Kampferol, Mangiferin, Ácido Fumárico, Quercetina, Ácido p-cumárico.

A separação cromatográfica dos compostos fenólicos foi realizada em uma coluna Shim-pack VP-ODS III (150 × 2,0 mm id, tamanho de partícula 4,6 µm, Shimadzu, Kyoto, Japão) em forno termostato a 40 °C. A temperatura do amostrador automático foi mantida a 15 °C e o volume de injeção foi de 10 µL. AS fases móveis consistia em 0,1% de ácido fórmico em água (eluente A) e acetonitrila (eluente B) a uma taxa de fluxo de 0,40 mL/min. As condições de eluição foram as seguintes: 0-1 min, 5% B; 1-4 minutos, 5 a 60% de B; 4-7 min, 60-70% de B; 7-10 minutos, 70 a 100% de B; 10-10,50 min, 100% B; 10,50-11 min, 100-5% B; 11-15 min, 5% B.

A fonte ESI foi operada no modo de íon negativo com os seguintes parâmetros principais: tensão capilar de 3,5 kV; temperatura do bloco de calor de 200 °C; temperatura da linha de dessolvatação de 250 °C; fluxo de gás de secagem (N₂) de 15 L/min; fluxo de gás de nebulização (N₂) de 1,5 L/min. Para cada padrão, a molécula desprotonada [M-H]⁻ foi usada como íon de identificação do composto e determinação do tempo de retenção.

Os compostos foram caracterizados por comparação de seus padrões de dissociação HPLC-ESI (-) MS e tempo de retenção com os padrões autênticos. A quantificação dos compostos fenólicos caracterizados foi realizada por comparação com a curva de calibração de cada padrão. As soluções de estoque de cada composto padrão (1 mg/mL) foram preparadas em metanol e armazenadas. Uma solução intermediária contendo todos os padrões (10 µg/mL) foi preparada em ácido fórmico a 0,1% em água e as diluições dessa solução foram realizadas em 5 níveis diferentes para as curvas de calibração (1-10 µg/mL). Os dados foram adquiridos e processados pelo software Labsolution (versão 5.53 SP2, Shimadzu).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta o perfil cromatográfico das amostras de própolis nas concentrações de 10%, 15% e 20% de EEP. Nota-se a presença do composto fenólico ácido p-cumárico, o que corrobora o estudo de Socha et al. (2015), no qual também houve predominância deste composto em própolis coletada na Polônia. Em outro estudo realizado por Santos et al., (2017), utilizando extratos de própolis de abelhas Jataí, foram identificados os compostos quercetina, ácido gálico, galocatequina, ácido p-OH-benzóico, cafeína e ácidos cumáricos.

Outras variações podem ocorrer conforme o método de extração utilizado, o solvente, a quantidade de amostras, uso de colunas de diferentes polaridades e o desenvolvimento de sistemas de índices de retenção e outros artifícios, onde podem ocorrer erros na análise qualitativa devido aos tempos de retenção para a identificação dos analitos. Apesar do tempo de retenção ser característico de um composto, ele não é único, ou seja, vários compostos podem ter o mesmo tempo de retenção nas condições cromatográficas empregadas (LANÇAS, 2009). Em nosso estudo, na amostra de 10% de própolis, os compostos ácido cafeico, ácido ferrulico, ácido gálico, catequina, kampferol, mangiferin, ácido fumárico e quercetina utilizados no padrão não foram detectáveis, provavelmente pelo tempo de retenção utilizado ou as amostras com baixas concentrações.



As concentrações de ácido p-cumárico encontradas nas amostras EEP de 15% e 20% e o tempo de retenção não mostrou diferença entre as amostras, portanto, o EEP na concentração de 15% é indicado porque utiliza menos amostra (m/v) do que o EEP 20%.

Tabela 1- Caracterização química da própolis de abelhas Jataí nas concentrações de 10%, 15% e 20%.

Nome	Tempo de retenção (min.)	Concentração no EEP (µg/mL)
Ácido p-cumárico		
EEP 10%	n.d	n.d
EEP 15%	5,652	0,463
EEP 20%	5,647	0,464

EEP – extratos etanólicos de própolis; n.d – não detectado.

O ácido p-cumárico possui um forte potencial antifúngico, como cita Cardoso et al. (2017), ao avaliarem a atividade antifúngica do ácido p-cumárico de forma isolada ou em combinação com os ácidos cafeico e dihidrocinâmico sobre *C. albicans*, induzindo a uma atividade imunomoduladora.

Marcucci & Bankova (1999) mostraram que a própolis brasileira, principalmente das regiões sul e sudeste, são constituídos por derivados do ácido p-cumárico, compostos que possuem atividade biológica como ação antimicrobiana e antitumoral. Também Miorin et al. (2003) avaliaram a composição química de extratos etanólicos de amostras de própolis de *T. angustula* e *A. mellifera* dos estados do Paraná e Minas Gerais e obtiveram como resultados altas concentrações de ácido fenólico derivados do ácido cinâmico e ácido p-cumárico nas própolis oriundas de *A. mellifera*. No entanto, em amostras de própolis de *T. angustula*, baixas concentrações destes compostos foram encontrados.

A composição química da própolis é muito variável e dependente da procedência da amostra, em função das fontes vegetais disponíveis às abelhas para sua produção (MOHTAR et al., 2020). Estudos mostram que existe semelhança qualitativa entre os compostos químicos da própolis de abelhas Jataí independente da área geográfica devido a planta mais utilizada para a produção da própolis ser a *Schinus terebinthifolius* ou “aroeira-vermelha” amplamente distribuída no território brasileiro e também utilizada pelas abelhas *A. mellifera* (DEGÁSPARI et al., 2005; SAWAYA et al., 2004).

4 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos, pode-se concluir que os extratos etanólicos de própolis de abelhas Jataí (15% e 20%) possuem concentrações semelhantes do composto fenólico ácido p-cumárico, responsável por atividades biológicas como ação antimicrobiana e antitumoral conforme demonstrado em literatura, podendo ser utilizado em estudos da medicina humana e veterinária. Assim, a concentração de EEP 15% é a mais indicada pois utiliza menor quantidade de amostra.

5 AGRADECIMENTOS

A Universidade de Passo Fundo (UPF), ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – IFRS Campus Sertão e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e todos os colaboradores deste projeto.

6 REFERÊNCIAS

- ARRUDA, H. S.; PEREIRA, G. A.; MORAIS, D. R. de.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. M. Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 245, p. 738 – 749, abr. 2018.
- CAMPOS, J. F.; DAS SANTOS, U. P.; DA ROCHA, P. D. S.; DAMIÃO, M. J.; BALESTIERI, J. B. P.; CARDOSO, C. A. L., et al. Antimicrobial, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Cytotoxic Activities of Propolis from the Stingless Bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí). **Evidence-based Complement Altern Med**. 2015.
- CARDOSO, E. O.; CONTI, B. J.; SANTIAGO, K. B.; et al. Phenolic compounds alone or in combination may be involved in propolis effects on human monocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 1, p. 99-108, 2017.
- CUETO, A. P.; ALVES, S. H.; PILAU, M.; WEIBLEN, R.; KUBIÇA, T. F.; LOVATO, L. T. Atividade antiviral do extrato de própolis contra o calicivírus felino, adenovírus canino e vírus da diarreia viral bovina. **Cienc Rural**. 2011;41(10):1800–6.
- DEGÁSPARI C. H., WASZCZYNSKYJ N., PRADO M. R. M. Atividade 855 antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**. v. 29, n. 3, p. 617-622, 2005.



- FALCÃO, S. I.; VILAS-BOAS, M.; ESTEVINHO, L. M.; BARROS, C.; DOMINGUES, M. R. M.; CARDOSO, S. M. Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: Usual and unusual compounds. **Anal Bioanal Chem.** 2010;396(2):887–97.
- FRANCHI, G. C.; MORAES, C. S.; TORETI, V. C.; DAUGSCH, A.; NOWILL, A. E.; PARK, Y. K. Comparison of effects of the ethanolic extracts of Brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. **Evidence-based Complement Altern Med.** 2012.
- GRESSLER, L. T.; DA SILVA, A. S.; MACHADO, G.; ROSA, L. D.; DORNELES, F. Susceptibility of Trypanosoma evansi to propolis extract in vitro and in experimentally infected rats. **Res Vet Sci.** 93(3):1314–7, 2012.
- LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”?. **Scientia Chromatographica**, 1(2):35-61, 2009.
- LAVINAS, F. C.; MACEDO, E. H. B. C.; SÁ, G. B. L.; AMARAL, A. C. F.; SILVA, J. R. A.; AZEVEDO, M. M. B, et al. Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: promising sources of biologically active compounds. **Brazilian J Pharmacogn.** 29(3):389–99, 2019.
- MARCUCCI M. C, BANKOVA V. Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis. **Current Topics in Phytochemistry.** v. 2: p. 115-123, 1999.
- MIORIN P.L., LEVY N.C. JR., CUSTODIO A.R., BRETZ W.A., MARCUCCI M.C. Antibacterial activity of honey and propolis from Apis mellifera and Tetragonisca angustula against Staphylococcus aureus. **Journal of Applied Microbiology.** 95, 913–920, 2003.
- MOHTAR, Lina G. et al. Comparative study of different methodologies for the determination the antioxidant activity of Venezuelan propolis. **Microchemical Journal**, v. 158, p. 105244, 2020.
- PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; AGUIAR, C. L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, 32(6):997–1003, 2002.
- PARK, Y.K., PAREDES-GUZMAN, J.F., AGUIAR, C.L., ALENCAR, S.M. Chemical constituents in Baccharis dracunculifolia as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 1100–1103, 2004.
- PARK, Y.K., ALENCAR, S.M., AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 2502–2506, 2002.
- SANTOS, L.; HOCHHEIM, S.; BOEDER, A. M.; KROGER, A.; TOMAZZOLI, M. M.; NETO, R. D.P; MARASCHIN, M.; GUEDES, A.; CORDOVA, C. M.M. Chemical characterization, antioxidant, cytotoxic and antibacterial activity of propolis extracts and isolated compounds from the Brazilian stingless bees *Melipona quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula*, Journal of Apicultural Research, 56:5, 543-558, 2017. DOI: 10.1080/00218839.2017.1371535
- SAWAYA, A. C. H. F.; TOMAZELA, D. M.; CUNHA, I. B. S.; et al. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. **The Analyst**, v. 129, p. 739-744, 2004.
- SHIMADZU. Análise qualitativa e quantitativa de compostos fenólicos empregando o LCMS-8040. **Application News** – nº MS - 04, 2018.
- SOCHA, R.; GALKOWSKA, D.; BUGAJ, M.; JUSZCZAK, L. Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland. **Natural Products Research**, v. 29, n. 5, p. 416-422, 2015.
- TORRES, A. R. Universidade Federal De Santa Maria Programa De Pós - Graduação Em Farmacologia. **Caracterização Química e avaliação das atividades antimicrobiana, antinociceptiva e anti - inflamatória do própolis da Melipona Quadrifasciata.** Santa Maria – Rs. 2018.
- VASILAKI, A.; HATZIKAMARI, M.; STAGKOS-GEORGIADIS, A.; GOULA, A. M.; MOURTZINOS, I. A natural approach in food preservation: Propolis extract as sorbate alternative in non-carbonated beverage. **Food Chem** [Internet]. 2019; 298(June):125080. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125080>
- VILLAS-BÔAS, J. K. Manual Tecnológico: Mel de Abelhas sem Ferrão. **Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN)**, Brasil, n. 1, 96 p., 2012.
- ZAGO, G. R.; GOTTARDO, F. M.; BILIBIO, D.; FREITAS, C. P.; BERTOL, C. D.; DICKEL, E. L.; SANTOS, L. R. Pomegranate (*Punica granatum* L.) peel lyophilized extract delays lipid oxidation in tuscan sausages. **Ciência Rural**, v.50:4, 2020.