

ESTUDO METABOLÔMICO DE DIFERENTES PRÓPOLIS AMAZÔNICOS POR UHPLC-MS/MS E MOLECULAR NETWORKING

Beatriz Paes Silva (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Eduardo J. Pilau (Orientador), e-mail: ra107367@uem.br

Universidade Estadual de Maringá/ Departamento de Química/ Maringá, PR.
Centro de Ciências Exatas e da Terra/Maringá, PR

Química / Química Analítica

Palavras-chave: Própolis, Amazônia, UHPLC-QTOF-MS/MS.

Resumo

A própolis, do grego “defesa da cidade”, é um material resinoso obtido de exsudatos de cascas e diversos tecidos vegetais. Muitos compostos já foram identificados de amostras distintas da própolis. Entretanto, são poucos os estudos sobre a própolis amazonense. O objetivo deste trabalho foi analisar as composições químicas de diferentes extratos de própolis obtidos de colônias de abelhas com e sem ferrão, utilizando cromatografia líquida de ultra alta performance acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC- MS/MS) e a ferramenta de Molecular Networking. Após fazer os cálculos para verificação da exatidão de massa (erro) e o confronto manual dos espectros de massa das amostras com dados disponíveis na literatura foram identificados 69 compostos, nas quatro amostras estudadas, com erro menor a 10 ppm. Dos compostos identificados, 55 estão presentes no extrato de própolis formulado com etanol 70%, (EPP), 34 foram extraídos com álcool de cereais (EPAC), 14 compostos foi encontrado na solução aquosa 1 (EPAQ 1) e 22 na solução aquosa 2 (EPAQ 2).

Introdução

A própolis, do grego “defesa da cidade”, é um material resinoso obtido de exsudatos de cascas e diversos tecidos vegetais. Mais de 300 compostos diferentes já foram identificados em amostras distintas da própolis (WAGH, 2013). Contudo, são poucos os estudos da composição química da própolis provinda da região amazônica, menores ainda são os estudos que compara e diferencia a própolis produzidas por abelhas típicas da região, sendo a maioria dos trabalhos mundiais voltados apenas a uma espécie de abelha, *Apis mellifera* (SILVA, 2013).

Devido a sua diversidade química, quantidade de compostos presentes e a concentração de cada um, a caracterização fidedigna e completa do extrato de própolis é uma tarefa difícil para os métodos analíticos convencionais, sendo necessária a utilização de equipamentos mais sofisticados, como o espectrômetro de massas. As informações obtidas com os MS podem ser tratadas a fim de se fazer uma análise por metabolômica (ALONSO, MARSAL e JULIÀ, 2015).

O objetivo deste trabalho foi analisar as composições químicas de diferentes extratos, por meio da cromatografia líquida de ultra alta performance acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC- MS/MS) e a ferramenta de *Molecular Networking*.

Materiais e métodos

As amostras da própolis amazônica foram fornecidas pela Profa Dra Adriana Flach, do Departamento de Química da Universidade Federal de Roraima. Foram quatro extratos da própolis com composições distintas. A primeira era formulada com álcool de cereais (EPAC), a segunda formulada com etanol 70% (EEP) e a terceira e a quarta são formulações aquosas (EPAQ 1 e 2), sendo que na primeira foi utilizado água em temperatura ambiente e na segunda água aquecida a 40°C.

Para cada amostra, foram retirados dois microtubos estéreis contendo 100 mg do material vegetal homogeneizado cada, que foram incorporados a uma solução extratora composta por Clorofórmio, Metanol e Água, 3:1:1 (v/v/v). A mistura foi submetida à agitação em vórtex por 10 s e ultrassom com banho de gelo por 20 minutos. Após filtragem com filtro de seringa com membrana de PTFE hidrofóbico 0,22 µm o solvente foi evaporado com fluxo de nitrogênio. As amostras foram ressuspensas em Acetonitrila e Água 1:1 (v/v) para análise em UHPLC-MS/MS. Foram injetados 0,2 µL dos extratos em UHPLC com coluna C18 acoplado a um espectrômetro de massas do tipo Q-TOF com fonte de electrospray operando no modo positivo. Para a separação cromatográfica foi utilizada como fase móvel uma mistura de solventes em gradiente, em que o solvente A utilizado foi Água acidificada com Ácido Fórmico a 0,1% (v/v) e o solvente B por Acetonitrila acidificada com Ácido Fórmico a 0,1% (v/v). A mistura de gradiente dos solventes A e B foi como segue: 5% B 0-1 min, 70% B 1-10 min, 98% B 12-15 min e mantida a 5% de B 16-20 min a 40°C, sendo os quatro minutos finais destinados à reconstituição da coluna para a próxima análise.

Os espectros de massas obtidos foram pré-processados e organizados em formato matricial utilizando o *software* ProfileAnalysis. A Análise de Componentes Principais foi feita através do *software* MATLAB R2007b e pacote de ferramentas computacionais do PLS-Toolbox.

A identificação putativa dos íons de interesse foi realizada a partir do cálculo do erro de massa em conjunto com a comparação entre o padrão de fragmentação obtido e o descrito na literatura.

Resultados e Discussão

O mapa químico gerado foi visualizado com o auxílio do *software* Cytoscape 2.8 (Figura 1). As amostras foram divididas em grupos para facilitar a montagem. Sendo eles: grupo 1 (G1, vermelho) para os dados pertencentes às amostras de EtOH 70%, grupo 2 (G2, azul claro) referente às amostras do EPAC, grupo 3 (G3, azul escuro) para as amostras de formulação aquosa 1 (EPAQ 1) e o grupo 4 (G4, verde) para amostras EPAQ 2. Os bancos de dados espectrais disponíveis no GNPS promoveram a seleção de 156 compostos, com provável identificação, pertencentes às quatro amostras.



Figura 1. Mapa químico gerado com as quatro amostras da própolis. A cor vermelha corresponde ao grupo 1 (EEP), azul claro ao grupo 2 (EPAC), azul escuro ao grupo 3 (EPAQ 1) e verde ao grupo 4 (EPAQ 2).

Após fazer os cálculos para verificação da exatidão de massa (erro) e o confronto manual dos espectros de massa das amostras com dados disponíveis na literatura foram identificados 69 compostos, nas quatro amostras estudadas, com erro menor a 10 ppm. Dos compostos identificados, 55 estão presentes no extrato de própolis formulado com etanol 70%, (EPP), 34 foram extraídos com álcool de cereais (EPAC), 14 compostos foi encontrado na solução aquosa 1 (EPAQ 1) e 22 na solução aquosa 2 (EPAQ 2). Como a formulação com etanol 70% conseguiu extrair mais compostos que as demais formulações, podemos considerá-la a mais eficiente. Dentre os compostos identificados, podemos ressaltar: alcaloides, ésteres, terpenos, aminoácidos, ácidos fenólicos, dentre outros grupos. Estes resultados corroboram com os achados de Rivera-Yañez e colaboradores (2020).

Conclusões

Considerando a gama de composto bioativos identificado na própolis amazônica, podemos concluir que ela pode agir como: anti-obesogênico, anti-glicêmico, contra a depressão, antibacteriano, anti-inflamatório, antioxidante, dentre outras. Contudo, os dados obtidos são apenas de caráter exploratório sendo necessário mais pesquisa para estimar a concentração de cada composto na própolis, a sua biodisponibilidade e a sua eficácia de fato no organismo perante uma patologia.

Agradecimentos

UEM/DQI, PIBIC/CNPq.

Referências

ALONSO, A.; Marsal, S.; Julià, A. Analytical Methods in Untargeted Metabolomics: State of the Art in 2015. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**. v. 3, p. 23, 2015.

SILVA, E. C. C., Muniz M. P., Nunomora, C. S. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas, **Quim. Nova**, v. 36, n. 5, p. 628-633, 2013

WANG, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p.828-837, 2016.

RIVERA-YAÑEZ N, Rivera-Yañez CR, Pozo-Molina G, Méndez-Catalá CF, Méndez-Cruz AR, Nieto-Yañez O. Biomedical Properties of Propolis on Diverse Chronic Diseases and Its Potential Applications and Health Benefits. **Nutrients**, v. 29, n. 1, p. 13-78, 2020.