

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ARTEPILLIN C EM EXTRATOS ÁCIDO-BASE DE PRÓPOLIS VERDE

**Giulia Stavrakas Miranda, João Victor Andrade, Ana Carla Rangel Rosa,
Gabriela dos Santos Medeiros, Mário Ferreira Conceição Santos.**

Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Alto
Universitário, S/N - Guararema, Alegre - ES, 29500-000 – Alegre, ES, Brasil,
giustavrakas@gmail.com, joao.andrade.75@edu.ufes.br, anacarlarangelrosa@yahoo.com, _
gabsufes@gmail.com, mariosantos408@gmail.com.

Resumo

O objetivo principal desse estudo foi obter um extrato enriquecido em artepillin C, a partir da própolis verde brasileira. Para isso foi utilizada a metodologia de extração ácido-base em solução aquosa; um cromatógrafo Shimadzu modelo LC-20AR Prominence, com diferentes componentes foi empregado para análise, incluindo uma coluna Shim-pack VP-ODS. A quantificação do artepillin C foi realizada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) utilizando um sistema de gradiente de fase móvel; e o método foi validado, demonstrando alta sensibilidade e precisão, com um coeficiente de correlação de 0,9998 na curva de calibração. A análise estatística validou os resultados obtidos. A exatidão e robustez do método foram avaliadas, mostrando que o extrato enriquecido apresentou uma concentração de 266,86 µg/mL, correspondendo a 21,05% da amostra. A melhoria na metodologia de extração contribuiu para aumentar os teores de artepillin C, ressaltando sua importância na formulação farmacêutica.

Palavras-chave: HPLC. Validação. Extração. Produto natural.

Área do Conhecimento: Farmacologia.

Introdução

A própolis é uma resina sintetizada pelas abelhas usando diversas fontes botânicas (GHISALBERTI, 1979). É utilizado como material de proteção das colmeias contra diversos agentes microbiológicos (SALATINO *et al.*, 2011). A atividade antibacteriana da própolis é demonstrada por vários artigos da área (JM, 2000; VIÉGAS *et al.*, 2011). O extrato da própolis é componente de muitas formulações farmacêuticas, utilizada para diversos fins, como cicatrização, anti-inflamatório, antibacteriano, antiviral e imunomodulador (JM, 2000; MACHADO *et al.*, 2016; KALIL *et al.*, 2019). Entre os tipos de própolis conhecidas temos a própolis verde, ela contém uma quantidade significativa de ácido caféico, ácido cumárico, drupanina e artepilin C, todos derivado do ácido cinâmico (VIEGAS *et al.*, 2017). O artepillin C atua como um componente anti-inflamatório e antibacteriano quando combinada com outros compostos presentes na própolis verde (TAKZAREE *et al.*, 2016).

Como a legislação brasileira permite o uso de fitoterápicos no processo terapêutico, a própolis verde pode ser uma excelente fonte de extratos enriquecidos com os metabolitos majoritários que possuem alguma ação terapêutica. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo obter o extrato ácido base da própolis verde rico em artepillin C. Para análise do extrato e quantificação do artepillin C foi desenvolvido um método por HPLC.

Metodologia

Podemos descrever que esse trabalho foi executado da seguinte forma: Todos os procedimentos desse trabalho foram realizados nos laboratórios da Unifran em Franca no estado de São Paulo. O sistema de Cromatografia Líquida consistia em um cromatógrafo Shimadzu modelo LC-20AR Prominence de três bombas equipado com um amostrador automático SIL-10AF, um forno de coluna CTO-20A, um módulo de barramento de comunicação CBM-20A, um desgaseificador em linha DGU-20A3R, e um detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A. As amostras foram dissolvidas em CDC13

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

e os espectros foram calibrados com os sinais do solvente em 7,26 (^1H) e 77,0 (^{13}C). Cromatografia líquida clássica e a vácuo (respectivamente CC e VLC; colunas de vidro de 450 X 25 mm e 50-100 mm i.d.) foram usadas para o fracionamento cromatográfico do extrato de própolis verde usando sílica gel 60 (Merck, art. 9385) e sílica gel 60H (Merck, art. 7736). Hexanos comerciais e acetato de etila (EtOAc) foram purificados por destilação em nossas instalações. A própolis verde brasileira (100g) foi adquirida da Apis Flora Comercial Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil (número do lote: 65400918). O extrato (18 g) foi fracionado usando gel de sílica 60H (Merck, art. 7736) usando cromatografia líquida de baixa pressão (VLC) com quantidades crescentes de acetato de etila em n-hexano como eluente (2 L cada fração) de 0 a 50 % acetato. Este procedimento forneceu sete frações que foram analisadas por CCD usando sílica gel PF254 (Merck art. 9385; 1 mm de espessura) e n-hexano:acetato de etila isocrático 7:3 como fase móvel após a evaporação do solvente. A fração 2 (90% HEX/10% AcOET) foi submetida a separação preparativa por HPLC com ácido acético-água (0,1: solvente A) e acetonitrila (solvente B) sob condições isocráticas como se segue: 75% de B: 25% de A por 30 minutos, para fornecer artepillin C (1) (4,0 g) e ácido 2-propenóico, 3-[2,2-dimetil-8-(3-metil-2-buten-1-il)-2H-1- benzopiran-6-il]-, (2E)- (30 mg, 2). As soluções analíticas foram preparadas dissolvendo 1,0 mg da amostra mais 0,5 mg de cumarina, utilizada como padrão interno em 5 mL de acetonitrila, seguida de filtração através de um filtro seringa UNIFLO 25/0,2 PTFE (Whatman/Schleicher & Schuell, Maidstone, UK). Uma série de diluição do metabólito artepillina C (1) (400,0, 300,0, 200,0, 100,0, 80,0, 60,0, 40,0 e 20,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) com padrão interno (cumarina; 100,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi preparada em acetonitrila. Em seguida, alíquotas de 10,0 μL dessas soluções foram injetadas no equipamento de HPLC, em triplicata.

Para a obtenção do extrato ácido-base da própolis verde enriquecido com artepillin C (ExABAr), soluções aquosas ácidas e básicas foram utilizadas. O programa Plackett-Burmann (uma ferramenta de planejamento experimental) foi utilizado. Uma série de variáveis foram computadas para serem avaliadas de forma experimental através do método analítico validade. Os experimentos que obtiveram o maior teor de artepillin C no extrato foram considerados promissores. As variáveis utilizadas na extração e o número de extratos obtidos estão especificados na tabela 1. Foram obtidos 8 extratos (ExABAr 1 – 8).

Tabela 1 – Condições obtidas para os oito experimentos de extração ácido-base a partir do software Plackett-Burmann.

Experimento	A pH NaOH	B pH HCL	C vol. sol NaOH	D Temperatura	E Tempo
1	13,7	5,0	10	45	20
2	9,7	5,0	30	25	60
3	9,7	1,0	30	45	20
4	13,7	1,0	30	45	60
5	9,7	5,0	10	45	60
6	13,7	1,0	10	25	60
7	13,7	5,0	30	25	20
8	9,7	1,0	10	25	20

Fonte: os autores, 2021.

As soluções analíticas dos extratos ácido-base (ExABAr) foram preparadas dissolvendo 1,0 mg da amostra mais 0,5 mg de cumarina, usado como padrão interno em 5 mL de acetonitrila, seguido de filtração através de um filtro de seringa UNIFLO 25/0,2 PTFE (Whatman/Schleider & Schuell Maidstone, UK). Uma série de diluições do metabólito artepillina C (800, 600, 400, 200, 160, 120, 80, 40 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) com padrão interno (cumarina 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram preparadas em acetonitrila. Em seguida, alíquotas de 20 μg dessas soluções foram injetadas no equipamento de HPLC em triplicata para a quantificação dos extratos ExABAr (1-8). As curvas analíticas lineares foram obtidas plotando a razão de área dos padrões cromatográficos individuais para o padrão interno de cumarina versus a concentração dos padrões dos metabólitos utilizados. O coeficiente de correlação foi calculado usando o Microsoft Excel®. Os valores de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foram determinados com base no desvio padrão da resposta (σ) e na inclinação da curva analítica (S), usando as expressões $\text{LOD} = 3,3 \sigma/S$ e $\text{LOQ} = 10 \sigma/S$. A seletividade do método foi verificada comparando-se os dados espectrais do PDA nas regiões ascendentes, superior e descendente dos respectivos picos

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

de ácido caféico, ácido cumárico, drupamina e artepelin C com os da literatura. Todos os espectros coincidiram, confirmando que nenhum outro metabólito coeluiu com os compostos-alvo.

A precisão foi avaliada medindo-se a precisão intra-dia e a precisão inter-dias. A precisão intra-dia foi realizada em triplicata e a precisão inter-dias foi determinada pela análise na mesma semana entre dois dias consecutivos das mesmas soluções descritas anteriormente. As médias da concentração do padrão de referência obtido em cada dia foram comparadas através do teste t ($p < 0,05$) usando o programa GraphPad Prism 5.0. A exatidão foi determinada pelo método de adição de padrão. Este procedimento estabelece as quantidades altas, médias e baixas de cada padrão de referência na amostra. Valores referentes a 75%, 50% e 25% da concentração de cada padrão já quantificado (artepelin C) durante o ensaio da precisão. A robustez do método foi avaliada através do design experimental Plackett-Burmann, no qual são realizados três experimentos, variando-se quatro fatores. Para a avaliação da robustez, utilizamos os fatores: temperatura, solvente, comprimento de onda e fluxo. Também foram estabelecidos níveis de variação para cada um destes fatores, os quais são representados como +1 e -1 em referência à variação acima ou abaixo do valor nominal. Ao finalizar as análises, foram obtidas duas respostas (y) para cada experimento: relação entre a área do pico padrão de referência e a área do pico do padrão interno, e tempo de retenção relativo (Trr), que consiste na relação entre o tempo de retenção do padrão de referência e o do padrão interno). Todas as determinações foram feitas em triplicata. A análise dos dados de quantificação para o produto artepelin C foi realizada usando o software Microsoft Excel®.

Resultados

Após a obtenção do extrato ácido-base, o teor de artepelin C foi determinado utilizando o método analítico de HPLC de fase reversa desenvolvido. A tabela 2 mostra o teor de artepelin C nos extratos obtidos. O extrato ExABAr 4 é o segundo extrato que possui maior teor de artepelin C. Este extrato possui pH extremos na adição ácido-base (13,7 e 1,0). O extrato que apresentou maior teor de artepelin C foi o ExABAr 7, que possui pH alcalino extremo (13,7). Além disso, a temperatura e tempo de extração são os maiores da série dos 8 experimentos. Por outro lado, os experimentos com teor zero (ExABAr 3 e ExABAr 8) são os que possuem o pH de extração mais brando bem como menores tempos de retenção.

Tabela 2 – Teor de artepelin C nos extratos ExABAr (1 – 8).

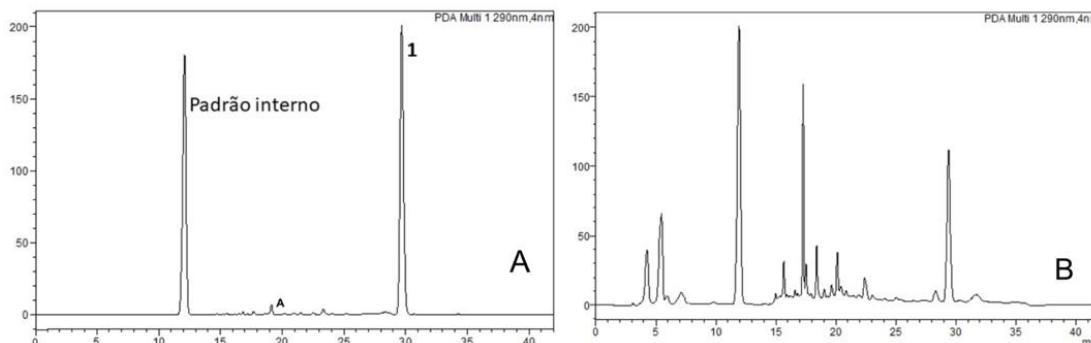
Experimentos (extratos)	Massa (µg) dos extratos	Concentração do artepelin C (µg)	Resposta (massa x concentração)
			Teor (%)
1	179000,00	65902,726	36,817
2	144333,33	4525,016	3,13
3	133500,00	0,000	0
4	289000,00	111897,299	38,71
5	66666,67	1901,141	2,85
6	221666,67	81287,843	36,67
7	147500,00	62939,058	42,67
8	147500,00	0,000	0

Fonte: os autores, 2021.

A curva de calibração foi construída a partir de nove pontos, obtida traçando-se a razão de área da artepelin C para o padrão interno (cumarina) em relação às concentrações padrão, e seu coeficiente de correlação linear (r) foi $r = 0,999884$. Assim, foi obtido o coeficiente de determinação (r^2) $r^2 = 0,999787$. Os valores de limite de detecção e limite de quantificação foram $LOD = 1,057458 \mu\text{g/mL}$ e $LOQ = 3,204417 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Tais resultados mostram que o método desenvolvido é linear e sensível de acordo com os valores estabelecidos pela ANVISA. Na figura 1 mostra uma comparação entre cromatogramas de HPLC-DAD típicos obtidos para a amostra (extrato ácido-base mais cumarina) e para o padrão analítico (artepelin C mais cumarina).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Figura 1 – Cromatogramas de HPLC-DAD mostrando (A) o padrão analítico de artepelin C e cumarina (padrão interno) e (B) o extrato ácido-base rico em artepelin C contendo cumarina, obtido nas condições analíticas estabelecidas.



Fonte: os autores, 2021.

Os valores de CV para as concentrações de artepelin C foram inferiores a 5% e as médias obtidas nos diferentes dias não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$). A concentração obtida de artepelin C foi de $266,86 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, o que correspondeu a um teor de 21,05%, mostrando que o método de extração relatado aumentou os teores desses compostos no extrato de acordo com os relatos da literatura. A precisão intra-dia foi determinada através da análise em triplicata do extrato. A precisão inter-dias foi avaliada em dois dias consecutivos. O valor de concentração e tempo de retenção relativo (Trr) para o padrão de referência, bem como seu desvio padrão relativo (CV%) foi verificado sendo todos menores que 5%, conforme preconizado pela ANVISA. É importante ressaltar também que as médias dos valores obtidos em dias diferentes não apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$). A exatidão do método foi avaliada através da adição de concentrações em níveis alto, médio e baixo do padrão de referência, analisando-se cada solução em triplicata. Assim foi possível calcular a exatidão do método que, de acordo com a ANVISA, deve compreender um intervalo de 80% a 120%. Pode-se observar também que os valores de desvio padrão relativo (CV%) foram inferiores a 5%, assim como para a precisão. Os valores de CV% para a robustez foram menores que 20% quando todos os fatores foram considerados, exceto para a porcentagem de acetonitrila na resposta de concentração e tempo de retenção, o que indica que a acetonitrila na fase móvel pode acarretar coeluição do artepelin C.

Discussão

De acordo com os resultados mostrados na tabela 2 pode-se observar que o pH é uma variável chave na extração em grande quantidade do artepelin C, o que está de acordo com as características estruturais do metabólito. O grupo cinamil presente na estrutura molecular confere a este composto um caráter ácido (SHAHINOZZAMAN *et al.*, 2020). Tal característica torna possível combinar o artepelin C com uma solução básica para formar sal. Considerando esta propriedade, diferentes métodos de extração podem ser utilizados. Metodologias de extração ácido-base em solução aquosa para a obtenção de compostos puros e extratos ricos são amplamente utilizadas em casos como do artepelin C. Por exemplo, os alcalóides são extraídos por extração ácido-base, porque o nitrogênio alcalino está presente (YUBIN *et al.*, 2014; TORRES *et al.*, 2021). A vantagem da extração básica é transformar as moléculas de artepelin C em sais orgânicos, aumentando a solubilidade em água, sendo o método de extração relativamente simples. No entanto, a principal desvantagem deste método é a necessidade de mais solução de extração e dificuldade de concentração (YUBIN *et al.*, 2014; TORRES *et al.*, 2021). Para um maior refinamento de experimentos seguintes visando a maior obtenção do artepelin C, os pH extremos (14 e 1) serão considerados fundamentais no próximo nível de planejamento experimental usando o software Plackett-Burmann. Ou seja, sem os pH adequados, a extração de artepelin C não será eficiente. Sendo assim, os parâmetros a serem otimizados no planejamento experimental Plackett-Burmann, em experimentos seguintes, serão o volume da solução básica de hidróxido de sódio (NaOH), temperatura e tempo. As condições do experimento 7 serão consideradas como ponto de partida no próximo design tipo Plackett-Burmann, considerando essas condições como mínimas para o planejamento experimental.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Conclusão

Alguns dos problemas tradicionais da tecnologia de extração são o baixo rendimento e o alto custo de purificação. O presente estudo descreveu a obtenção de extrato ácido-base rico em artepillin C otimizado em oposição aos métodos tradicionais. Tal fato foi confirmado através das melhorias das condições de extração de artepillin C. Com os dados obtidos no presente trabalho, será possível o delineamento de novos experimentos através do planejamento Plackett-Burmann para a otimização das condições de extração do artepillin C.

Referências

ANVISA, 2003. in: ANVISA (Ed.), Diário Oficial da União, Brasília, 2003.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. **Bee world**, v. 60, n. 2, p. 59-84, 1979.

YUBIN, J.; MIAO, Y.; BING, W.; YAO, Z. The extraction, separation and purification of alkaloids in the natural medicine. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 1, p. 338-345, 2014.

KALIL, M. A., SANTOS, L. M., BARRAL, T. D., RODRIGUES, D. M., PEREIRA, N. P., SÁ, M. D. C. A., & PORTELA, R. W. Brazilian green propolis as a therapeutic agent for the post-surgical treatment of caseous lymphadenitis in sheep. **Frontiers in veterinary science**, v. 6, p. 399, 2019.

MACHADO, B. A. S., SILVA, R. P. D., BARRETO, G. D. A., COSTA, S. S., SILVA, D. F. D., BRANDAO, H. N., & PADILHA, F. F. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. **PLoS one**, v. 11, n. 1, p. e0145954, 2016.

SALATINO, A., FERNANDES-SILVA, C. C., RIGHI, A. A., & SALATINO, M. L. F. Propolis research and the chemistry of plant products. **Natural product reports**, v. 28, n. 5, p. 925-936, 2011.

SFORCIN, J.M. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **J Ethnopharmacol.**, v. 73, p. 243-249, 2000.

SHAHINOZZAMAN, M.D.; BASAK, B.; RASHIDUZZAMAN, E.; ROZARIO, P.; OBANDA, D. N. Artepillin C: A comprehensive review of its chemistry, bioavailability, and pharmacological properties. **Fitoterapia**, v. 147, 2020.

TAKZAREE, N., Hadjiakhondi, A., Hassanzadeh, G., Rouini, M. R., & Manayi, A. Synergistic effect of honey and propolis on cutaneous wound healing in rats. **PubMed**, v. 54, n. 4, 2016.

TORRES, D. da S. et al. influência do método extrativo no teor de flavonoides de *Cnidocolus Quercifolius* Pohl (Euphorbiaceae) e atividade antioxidante. **Química Nova**, v. 41, n. 7, pp. 743-747, 2018.

VIÉGAS, E. K. D. **Propriedade antibacteriana da própolis verde sobre bactérias contaminantes da fermentação etanólica**. 2011. Tese – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.