

EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DE ARTEPELLIN C DA PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA

Ana Carla Rangel Rosa¹, Leonardo Bindelli Verly², Cecília Fernandes Patta Muller Marques², Gabriel Finotti Alves Vieira², João Victor Andrade², Mário Ferreira Conceição Santos²

¹Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Alto Universitário, S/N, Guararema - 29500-000 – Alegre-ES, Brasil, anacarlarangelrosa@yahoo.com.

²Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde - Departamento de Química e Física, Alto Universitário, S/N, Guararema - 29500-000 – Alegre-ES, Brasil, leobindelli@gmail.com, ceciliafernandespmm@gmail.com, finottigabriel1@gmail.com, joavictorandrade927@gmail.com, mario.f.santos@ufes.br.

Resumo

O estudo teve como objetivo otimizar o método de extração e isolamento do Artepillin C da própolis verde brasileira, utilizando extração ácido-base em solução aquosa. A metodologia empregada incluiu o planejamento experimental Box-Behnken e a Metodologia de Superfície de Resposta para ajustar as condições de extração, considerando variáveis como pH, temperatura e tempo. Os resultados demonstraram que o extrato ácido-base (ExABAr 4) apresentou a maior concentração de Artepillin C, com 55.948 µg, representando 19,35% do extrato total. A análise dos dados confirmou que o tempo de extração é a variável mais significativa, enquanto o volume da solução básica e a temperatura também influenciam o rendimento. Além do Artepillin C, outros compostos bioativos, como ácido cumárico e isosakuranetina, foram isolados com alta pureza. O estudo evidenciou a eficácia do método otimizado, que supera os tradicionais em termos de rendimento e eficiência, com potencial aplicação terapêutica.

Palavras-chave: Extração ácido-base. HPLC-PDA. Box-Behnken. Bioativos. Fracionamento.

Área do Conhecimento: CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA - Química

Introdução

A própolis é uma substância resinosa produzida pelas abelhas a partir de exsudatos coletados de diversas fontes botânicas. Este material é utilizado pelas abelhas para vedar frestas nas colmeias e proteger contra a invasão de microrganismos, fungos e outros agentes externos. Ao longo dos séculos, a própolis tem sido amplamente utilizada na medicina tradicional devido às suas propriedades terapêuticas, incluindo atividades antibacteriana, anti-inflamatória, antioxidante e imunomoduladora (Andrade *et al.*, 2017; Sousa *et al.*, 2007).

Dentre os diferentes tipos de própolis, a própolis verde brasileira destaca-se por seu elevado conteúdo de compostos bioativos, como o Artepillin C, ácido cafeico, ácido cumárico, drupanina e flavonoides como a kaempferide (da Rosa *et al.*, 2017). O Artepillin C, em particular, é um dos principais metabólitos da própolis verde, sendo amplamente estudado por suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e imunomoduladoras. Este composto tem atraído atenção significativa na comunidade científica devido ao seu potencial para aplicação em produtos farmacêuticos e cosméticos. Apesar de suas propriedades promissoras, a extração e o isolamento eficientes de Artepillin C continuam a ser um desafio (Cunha *et al.*, 2021). Métodos convencionais de extração frequentemente resultam em baixos rendimentos e exigem grandes volumes de solventes, o que pode impactar tanto a viabilidade econômica quanto a sustentabilidade ambiental do processo (Silva-Rodrigues, 2024).

Além disso, a complexidade da matriz da própolis verde torna o fracionamento e a purificação dos compostos bioativos uma tarefa complexa, requerendo técnicas avançadas de separação. Neste contexto, o desenvolvimento de métodos de extração e isolamento mais eficientes é essencial para maximizar o aproveitamento do Artepillin C e outros compostos de interesse (Sousa *et al.*, 2019). A extração ácido-base surge como uma técnica promissora para este fim, pois permite a modificação do

estado químico dos compostos, aumentando sua solubilidade em meios aquosos e facilitando a separação. Adicionalmente, o uso de técnicas cromatográficas, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), é fundamental para garantir a pureza e a quantificação precisa dos compostos isolados (Saraiva *et al.*, 2023).

O objetivo deste trabalho realizar o método de extração e isolamento do Artepillin C da própolis verde brasileira. Para alcançar esse objetivo, foi utilizada uma abordagem de extração ácido-base em solução aquosa, com o intuito de ajustar as condições de extração, como pH, temperatura e tempo. Além disso, o estudo visou isolar e identificar outros compostos bioativos presentes na própolis verde, avaliando a eficácia do método otimizado em comparação com os métodos tradicionais e explorando o potencial terapêutico desses compostos.

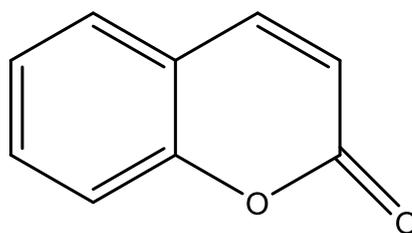
Metodologia

O sistema de Cromatografia Líquida utilizado consiste em um cromatógrafo Shimadzu modelo LC-20AR Prominence, equipado com amostrador automático SIL-10AF, forno de coluna CTO-20A, módulo de comunicação CBM-20A, desgaseificador DGU-20A3R e detector de Arranjo de Diodos (PDA) SPD-M20A. O software Lab Solution® foi utilizado para processamento de dados.

As análises foram realizadas em uma coluna Shim-pack VP-ODS (250 × 4,6 mm, 5 µm; Shimadzu) com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ para quantificação e em uma coluna Shim-pack VP-ODS (250 × 20 mm, 5 µm; Shimadzu) com fluxo de 9,5 mL.min⁻¹ para separações preparativas. Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetros Bruker DPX 400 (400 MHz para 1H e 100 MHz para 13C) e Bruker 300 (300 MHz para 1H e 75 MHz para 13C). As amostras foram dissolvidas em CDCl₃, DMSO, CD₃OD e acetona-d₆.

Cromatografia líquida clássica (CC) e cromatografia líquida de baixa pressão (VLC) foram utilizadas para o fracionamento cromatográfico do extrato de própolis verde, empregando sílica gel 60 (Merck, art. 9385), sílica gel 60H (Merck, art. 7736), sílica gel derivatizada com grupos octil (C18) e coluna Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich). Hexano e acetato de etila foram purificados por destilação. A cumarina de grau HPLC foi usada como padrão interno (Figura 1), adquirida da Sigma-Aldrich (≥98% pureza, Darmstadt, Alemanha).

Figura 1 - Padrão interno usado nos métodos analíticos

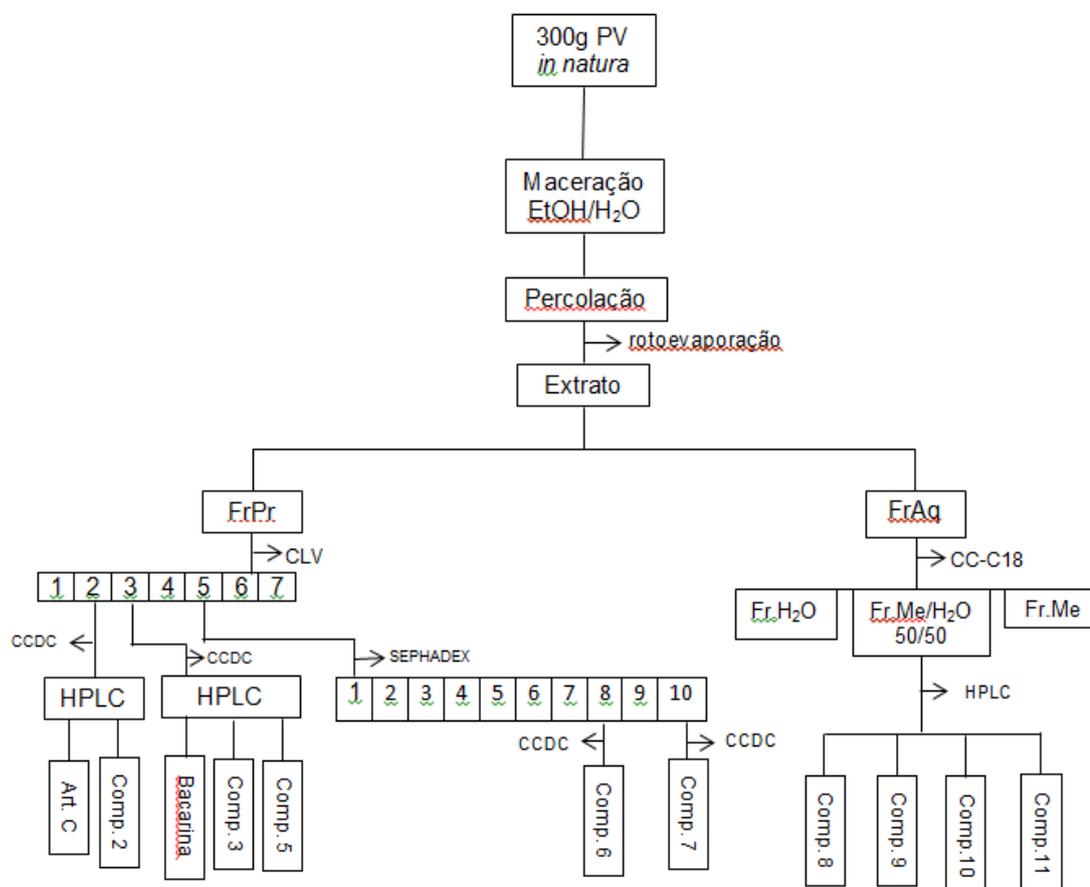


Fonte: Os autores (2024).

A própolis verde brasileira (300 g) foi pulverizada e extraída por maceração dinâmica com solução de etanol (EtOH): água (H₂O) (7:3), seguida de percolação. O extrato filtrado foi concentrado sob vácuo, resultando em dois extratos principais: o extrato precipitado (FrPr) e o extrato aquoso (FrAq). O extrato FrPr foi fracionado com sílica gel 60H (Merck, art. 7736) usando cromatografia líquida de baixa pressão (VLC) com acetato de etila em n-hexano como eluente, produzindo sete frações analisadas por CCDC usando sílica gel PF254 (Merck, art. 9385; 1 mm de espessura) e n-hexano: acetato de etila (7:3). A Fração 2 foi submetida à separação preparativa por HPLC com ácido acético-água (0,1: solvente A) e acetonitrila (solvente B) em condições isocráticas, resultando na obtenção de artepillin C (4,0 g). A Fração 3 foi separada por HPLC, obtendo bacarina (1,5 g) e outros compostos. A Fração 5 foi fracionada por cromatografia em Sephadex LH-20, resultando em kaempferide (200,0 mg) e tetramethoxyflavone (108,0 mg).

O extrato FrAq foi fracionado em coluna com sílica derivatizada com grupos octadecilsilano (C18), obtendo três frações: 100% H₂O, MeOH/H₂O 1/1 (50MeOH) e 100% MeOH (100MeOH). A fração 50MeOH foi submetida a separação preparativa por HPLC, fornecendo ácido cumárico (150,0 mg), ácido cafeico (30 mg), drupanina (15,0 mg) e isosakuranetina (20,0 mg) (Figura 2).

Figura 2 - Fluxograma isolamento

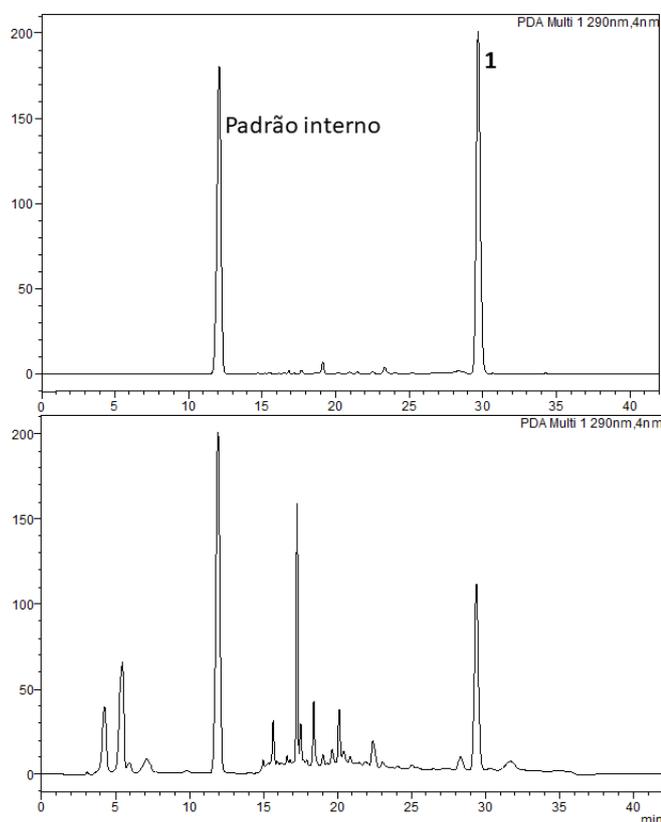


Fonte: Os autores (2024).

Resultados

Os métodos de extração e fracionamento utilizados permitiram a obtenção de extratos ricos em Artepillin C. A quantificação realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Figura 3) acoplada a um detector de matriz de diodos (PDA) revelou que o extrato ácido-base (ExABAr 4) apresentou a maior concentração de Artepillin C, com 55.948 µg, representando 19,35% do extrato total. O extrato FrPr fracionado por cromatografia líquida de baixa pressão (VLC) resultou na obtenção de 40 g de Artepillin C da Fração 2, confirmando a eficácia do fracionamento para isolar este composto.

Figura 3 - Cromatogramas de HPLC-PDA mostrando artepillin C (1) e cumarina (padrão interno), obtido nas condições analíticas estabelecidas utilizando sistema gradiente de fase móvel constituído por A (solução aquosa de ácido acético 0,1%) e B (acetonitrila), conforme segue: 30% de B (0-10 min), 30-55% de B (10-11 min), 55% de B (11-32 min), 55-30% de B (32-33 min), 30% de B (33-42 min). O volume injetado foi de 20 μ L, a taxa de fluxo foi ajustada em 1 mL \cdot min⁻¹, a temperatura da coluna foi ajustada em 40 °C e a detecção foi em 290 nm.



Fonte: Os autores (2024).

Discussão

A análise dos resultados demonstrou que os métodos de extração e fracionamento utilizados foram eficazes na obtenção de extratos ricos em artepillin C, confirmando sua presença significativa nos extratos da própolis verde. O uso de etanol e água na maceração dinâmica possibilitou a extração eficiente de compostos bioativos, com o extrato concentrado resultando em duas frações principais: o extrato precipitado (FrPr) e o extrato aquoso (FrAq) (SUN *et al.*, 2022). Segundo Contieri *et al.* (2022), a combinação de solventes polares e apolares é eficaz na extração de compostos fenólicos e flavonoides da própolis.

A cromatografia líquida de baixa pressão (VLC) com acetato de etila em n-hexano foi crucial para a separação das frações do extrato FrPr, permitindo a identificação da Fração 2 como a mais promissora para a obtenção de artepillin C. Segundo Rosenfeld (2019), a cromatografia líquida é uma técnica robusta para o isolamento de compostos específicos de matrizes complexas como a própolis. A subsequente separação preparativa por HPLC da Fração 2, utilizando ácido acético-água e acetonitrila, resultou na obtenção de artepillin C. Takzaree *et al.* (2016) confirmam a eficácia da HPLC para a purificação de artepillin C e outros flavonoides da própolis.

O fracionamento do extrato FrAq usando sílica derivatizada (C18) e gradientes de metanol e água possibilitou a separação de três frações distintas, com a fração 50MeOH fornecendo ácido cumárico, ácido cafeico, drupanina e isosakuranetina. Esses compostos são amplamente reconhecidos por suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Segundo Feyzi *et al.* (2023), Jeong *et al.* (2023), e Santos *et al.* (2024), esses compostos possuem relevantes propriedades biológicas que podem ser exploradas terapeuticamente.

A comparação dos dados obtidos com a literatura mostrou que a metodologia aplicada foi capaz de isolar compostos com propriedades biológicas relevantes, corroborando a importância do artepillin C na modulação do sistema imunológico e suas atividades antioxidantes e antimicrobianas. Segundo Viega *et al.* (2017) e Kalil *et al.* (2019), a alta concentração de artepillin C nos extratos obtidos é promissora para suas aplicações terapêuticas, especialmente considerando suas propriedades imunomoduladoras e antimicrobianas.

Conclusão

O trabalho demonstrou que a técnica de extração ácido-base é eficaz para isolar Artepillin C da própolis verde brasileira. A combinação de extração dinâmica com etanol e água e o uso de cromatografia líquida (VLC e HPLC) possibilitou a obtenção de Artepillin C com alta pureza, alcançando uma concentração significativa de 19,35% no extrato total. Além disso, outros compostos bioativos como ácido cumárico, ácido cafeico, drupanina e isosakuranetina foram identificados, ressaltando o potencial terapêutico da própolis verde.

A metodologia empregada não apenas aumentou a eficiência da extração, mas também destacou a relevância dos compostos bioativos isolados para aplicações farmacêuticas e cosméticas. O sucesso obtido com a técnica de extração ácido-base e as análises cromatográficas reforça a sua utilidade na otimização do aproveitamento dos compostos da própolis verde, sugerindo a necessidade de mais estudos para explorar totalmente o seu potencial terapêutico.

Referências

- ANDRADE, J. K. S., DENADAI, M., DE OLIVEIRA, C. S., NUNES, M. L., & NARAIN, N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, p. 129-138, 2017.
- CUNHA, G. F., SOARES, J. C., SOUSA, T. L. D., EGEEA, M. B., ALENCAR, S. M. D., BELISARIO, C. M., & PLÁCIDO, G. R. Standardization proposal to quality control of propolis extracts commercialized in Brazil: A fingerprinting methodology using a UHPLC-PDA-MS/MS approach. **Food Research International**, v. 161, p. 111846, 2022.
- DA ROSA, J. A. N., DO NASCIMENTO PAZ, F. A., DE SOUZA, A. P., LEHMANN, M., & DIHL, R. R. Disponível em: <http://www.eventos.ulbra.br/index.php/eucf/eucf3/paper/view/2449>. Acesso em: 25 ago. 2024.
- FEYZI, NEDA; EBADI, AHMAD; DASTAN, DARA. Chimgin from *Ferula haussknechtii* as AChE inhibitor and confirmation of the absolute configuration. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1-10, 2023.
- JEONG, E. W., BAEK, Y., & LEE, H. G. Development of propolis extract-loaded nanoparticles with chitosan and hyaluronic acid for improving solubility and stability. **Lwt**, v. 181, p. 114738, 2023.
- 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.
- ROSENFELD, L. G., BACAL, N. S., CUDER, M. A. M., SILVA, A. G. D., MACHADO, Í. E., PEREIRA, C. A., & MALTA, D. C. Prevalência de hemoglobinopatias na população adulta brasileira: Pesquisa Nacional de Saúde 2014-2015. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 22, n. Suppl 02, p. E190007. SUPL. 2, 2019.
- SANTOS, M. F. C., MIRADA, G. S., DO COUTO, J. O., DE OLIVEIRA COSTA, G., RANGEL ROSA, A. C., GAMBETA BORGES, C. H., & AMBRÓSIO, S. R. A validated ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry method for the quantification of Brazilian green propolis main compounds. **Natural Product Research**, p. 1-7, 2024.

SARAIVA, E., COSTA, C., SILVA, C., OLIVEIRA, F., RIBEIRO, I., ROCHA, L., & AZEVEDO, M. M. Extratos de folhas, flores, frutos e raízes como indicadores ácido-base. **APeDuC Revista- Investigação e Práticas em Educação em Ciências, Matemática e Tecnologia**, v. 4, n. 1, p. 171-183, 2023.

SILVA-RODRIGUES, G. Visão geral sobre os produtos naturais e suas aplicações: uma revisão. **Revista CPAQV-Centro de Pesquisas Avançadas em Qualidade de Vida**, v. 16, n. 1, 2024.

SOUSA, J. P. L. M., PIRES, L. D. O., PRUDÊNCIO, E. R., SANTOS, R. F., SANT'ANA, L. D., FERREIRA, D. A. S., & CASTRO, R. N. Estudo químico e potencial antimicrobiano da própolis brasileira produzida por diferentes espécies de abelhas. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 5, p. 1480-1497, 2019.

TAKZAREE, N., HADJIAKHONDI, A., HASSANZADEH, G., ROUINI, M. R., & MANAYI, A. Synergistic Effect of Honey and Propolis on Cutaneous Wound Healing in Rats. **Acta Medical Iranica**, v. 54, n. 4, p. 233-239, 2016.

VEIGA, R. S., DE MENDONÇA, S., MENDES, P. B., PAULINO, N., MIMICA, M. J., LAGAREIRO NETTO, A. A., & MARCUCCI, M. C. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 4, p. 911-920, 2017.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio do Laboratório de Química Orgânica e Farmacognosia (LBQOFARM).