UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudos de estabilidade do artepelin C, do ácido *p*-cumárico e avaliação das atividades antimicrobiana, antiparasitária e citotóxica dos produtos de degradação majoritários

Caroline Arruda

Ribeirão Preto
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

CAROLINE ARRUDA

Estudos de estabilidade do artepelin C, do ácido *p*-cumárico e avaliação das atividades antimicrobiana, antiparasitária e citotóxica dos produtos de degradação majoritários

Ribeirão Preto
2019

CAROLINE ARRUDA

Estudos de estabilidade do artepelin C, do ácido *p*-cumárico e avaliação das atividades antimicrobiana, antiparasitária e citotóxica dos produtos de degradação majoritários

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Profº Dr. Jairo Kenupp Bastos

Ribeirão Preto
2019

ARRUDA, C.	**Estudos de estabilidade do artepelin C, do ácido *p*-cumárico e avaliação das atividades antimicrobiana, antiparasitária e citotóxica dos produtos de degradação majoritários.**		DOUTORADO FCFRPUSP 2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Arruda, Caroline
Estudos de estabilidade do artepelin C, do ácido *p*-cumárico e avaliação das atividades antimicrobiana, antiparasitária e citotóxica dos produtos de degradação majoritários. Ribeirão Preto, 2019.
123 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.
Orientador: Bastos, Jairo Kenupp.

1. Própolis Verde. 2. Artepelin C. 3. Estudos de Estabilidade.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Caroline Arruda
Estudos de estabilidade do artepelin C, do ácido *p*-cumárico e avaliação das atividades antimicrobiana, antiparasitária e citotóxica dos produtos de degradação majoritários

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Dedico este trabalho aos meus pais e

as pessoas que me apoiaram e acreditaram em mim

Agradecimento

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Profº Dr. Jairo Kenupp Bastos, meu estimado orientador, por ter aceitado me orientar no desenvolvimento deste trabalho e que sempre esteve presente nos momentos de dúvidas e discussões sobre este trabalho, além de ser uma pessoa incrível, sempre motivando seus orientados a perseguirem seus sonhos.

Aos meus colegas de laboratório: Valdeline, João Paulo, Mohamed, Adriany e mais alguns outros que colaboraram para que este trabalho fosse concluído e, em especial, ao Victor, à Jennyfer e à Marília que sempre me ajudaram nos experimentos, discussões e análise dos resultados. Muito Obrigada!

Aos técnicos do laboratório de farmacognosia Angélica, Mário e Waltinho, que sempre me ajudaram e foram essenciais para o desenvolvimento deste projeto. Agradeço muito a vocês!

Ao técnico Vinícius (FFCLRP-USP) pelas análises de RMN, que foram imprescindíveis para a elucidação estrutural dos compostos obtidos.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP), onde o trabalho foi desenvolvido.

Por fim, agradeço à minha família, em especial aos meus pais, que sempre acreditaram em mim e me deram forças e condições para eu concluir este trabalho. Sem vocês eu não seria nada! Muito obrigada por estarem sempre ao meu lado!

RESUMO

ARRUDA, C. **Estudos de estabilidade do artepelin C, do ácido *p*-cumárico e avaliação das atividades antimicrobiana, antiparasitária e citotóxica dos produtos de degradação majoritários**. 2019. 123f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A Própolis Verde Brasileira (PV) é um importante produto apícola, que apresenta importantes atividades biológicas, tornando-se valiosa no mercado internacional. O principal composto fenólico prenilado na PV é o artepelin C, juntamente com o seu ácido precursor, o ácido *p*-cumárico, ambos contribuem para os efeitos biológicos da PV. Levando isso em conta, avaliou-se o efeito da luz, temperatura e oxigênio do ar no teor destes compostos para se estabelecer as melhores condições de armazenamento e transporte para a PV bruta e para os compostos puros. Também foram avaliados o efeito do artepelin C, do ácido *p*-cumárico e seus produtos de degradação majoritários contra sete linhagens de bactérias orais, linhagens de células cancerígenas (AGP-01 e HeLa) e *L. amazonensis* (promastigotas e amastigotas). Para tanto, o artepelin C e o ácido *p*-cumárico foram submetidos à degradação por cinco dias sob luz solar e temperatura de 50 ºC, fornecendo três isômeros principais do artepillin C e um do ácido *p*-cumárico. Em seguida, foi desenvolvido e validado um método em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa (CLAE-FR) para quantificação destes compostos na PV bruta e em seus extratos. Nos estudos de estabilidade utilizou-se o Design Experimental Fatorial Completo e o Design Composto Central Rotacionado para se estabelecerem as condições desejáveis de armazenamento da própolis bruta e seus metabólitos. Os ensaios biológicos foram realizados *in vitro*. O artepelin C, puro e na PV deve ser mantido protegido da luz e armazenado a temperaturas inferiores a -2,5 ºC para se evitar degradação. O ácido *p*-cumárico pode ser armazenado à temperatura ambiente. Com relação aos efeitos biológicos, consideraram-se promissores os compostos com valores de IC_{50} abaixo de 10 μM, sendo que o ART4 e o isômero Z do artepelin C apresentaram efeito significante contra a linhagem AGP-01 de câncer gástrico e contra *Leishmania amazonensis*, especialmente contra as formas amastigotas. O ácido *p*-cumárico também apresentou atividade promissora contra amastigotas de *L. amazonensis*, enquanto o AC-1, seu isômero Z, foi eficaz contra as formas promastigotas. Estes compostos não foram citotóxicos para CHO-k1, uma linha celular normal, indicando que não são tóxicos para as células normais. Portanto, as melhores condições de armazenamento e transporte para se manter o teor de ambos os compostos na PV são proteção da luz e armazenamento a baixas temperaturas. Além disso, esses compostos são candidatos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos contra leishmaniose e câncer gástrico.

Palavras-chave: Própolis Verde, Artepelin C, Estudos de estabilidade

ABSTRACT

ARRUDA, C. **Stability Studies of artepillin C, *p*-coumaric acid and evaluation of the antimicrobial, antiparasitic and cytotoxic effects of their major degradation products**. 2019. 123f. Thesis (Doctoral). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Brazilian Green Propolis (BGP) is an important bee product because it displays important biological activities. Therefore, it's valuable in the international market. The major prenylated phenolic compound in BPG is (*E*)-artepillin C, along with its precursor (*E*)-*p*-coumaric acid, and they contribute to the biological effects of BGP. Taking that into account, it was evaluated the effect of light, temperature and air oxygen in their content to establish the best storage and transport conditions for both crude BGP and its isolated compounds. It was also evaluated the effect of artepillin C, *p*-coumaric acid, and their major degradation products against seven strains of oral bacteria, cancer cell lines (AGP-01 and He-La) and *L. amazonensis* (promastigotes and amastigotes). For that, artepillin C and *p*-coumaric acid were initially submitted to degradation for five days under sunlight and high temperature (50 ºC), furnishing three major artepillin C isomers and one *p*-coumaric acid isomer. Then, it was developed and validated a Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) method for quantifying these compounds in crude BGP and in its extracts. In the stability studies, it was used a Full Factorial and Central Composite Design to establish the desirable storage conditions. The biological assays were performed *in vitro*. Crude BGP and artepillin C should be kept protected from light and should be storage below -2.5 ºC to prevent degradation. *p*-Coumaric acid can be stored at room temperature. Regarding the biological effects, it was considered the compounds with IC_{50} values below 10 μM. ART4, the Z isomer of artepillin C, displayed significant effect against gastric cancer cell line AGP-01 and against *Leishmania amazonensis*, especially the amastigote form of the parasite. *P*-coumaric acid also showed a promising activity against *L. amazonensis* amastigotes, while AC-1, its Z-isomer, was effective against the promastigote forms. These compounds were not cytotoxic to CHO-k1, a normal cell line, indicating that they are not toxic to normal cells.Therefore, the best storage and transport conditions to keep the content of both compounds in BGP are protection from light at low temperatures. Also, these compounds are promising candidates for development of novel drugs and should be further evaluated.

Keywords: Green Propolis, Artepillin C, Stability studies

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Própolis verde bruta..... 2
Figura 2. Estruturas químicas do artepelin C e do ácido *p*-cumárico..... 3
Figura 3. Método de obtenção do extrato metanólico de própolis verde e da fração diclorometânica..... 12
Figura 4. Experimentos de determinação do tempo necessário para obtenção de produtos majoritários do artepelin C e do ácido *p*-cumárico por degradação forçada..... 15
Figura 5. Preparo das soluções empregadas na confecção da curva analítica do artepelin C..... 23
Figura 6. Preparo das soluções empregadas na confecção das curvas analíticas do ART2 e ART4..... 24
Figura 7. Preparo das soluções empregadas na confecção das curvas analíticas do ART1, ART2, ácido *p*-cumárico e AC-1..... 25
Figura 8. Preparo das soluções empregadas para se avaliar os limites de detecção e quantificação do artepelin C, ácido *p*-cumárico e seus produtos de degradação ART1, ART2, ART3, ART4 e AC-1..... 26
Figura 9. Preparo das soluções para os ensaios de precisão do método analítico..... 27
Figura 10. Preparo das soluções para avaliação da recuperação do método de extração nos níveis alto, médio e baixo..... 29
Figura 11. Cromatograma do padrão autêntico de artepelin em 275 nm obtido por análise por CLAE-FR..... 40
Figura 12. Espectro de UV do padrão de artepelin C obtido por detector DAD..... 41
Figura 13. Cromatograma da Reunião 1 (frações 1-14) obtido através de análise por CLAE-FR a 275 nm..... 41
Figura 14. Cromatograma da reunião 2 (frações 15-19) obtido através da análise desta por CLAE de fase reversa a 257 nm..... 42
Figura 15. Espectro de UV do composto presente na reunião 2 (frações 15-19) e eluído em 64.85 minutos..... 42
Figura 16. Cromatograma da reunião 3 (frações 20-26) obtido através de análise de CLAE de fase reversa..... 43
Figura 17. Espectro de UV do composto presente na reunião 3 (frações 20-26) e eluído em 64.85 minutos..... 43
Figura 18. Cromatograma da reunião 4 (frações 27-31) obtido por análise de CLAE de fase reversa a 275 nm..... 44
Figura 19. Espectro de UV do composto presente na reunião 4 (frações 27-31) eluído após 64.86 minutos..... 44
Figura 20. Cromatograma da reunião 5 (frações 32-40) obtido após análise de CLAE de fase reversa a 275 nm..... 45
Figura 21. Espectro de UV do composto presente na reunião 5 (frações 32-40) eluído após 65.05 minutos..... 45
Figura 22. Cromatograma da reunião 6 (frações 41-47) obtido através de análise por CLAE de fase reversa a 275 nm..... 46
Figura 23. Espectro de UV do composto presente na reunião 6 (frações 41-47) eluído após 65.19 minutos..... 46
Figura 24. Cromatograma da reunião 7 (frações 48-65) obtido através de análise por CLAE de fase reversa..... 47

Figura 25. Cromatograma da reunião 8 (frações 66-104) obtido através de análise por CLAE de fase reversa a 275 nm..... 47
Figura 26. Espectro de ^{1}H do artepelin C isolado de própolis verde..... 49
Figura 27. Cromatograma da amostra de artepelin C após 5 dias de exposição ao sol..... 50
Figura 28. Cromatograma da amostra de artepelin C após 10 dias de exposição ao sol..... 51
Figura 29. Cromatograma da amostra de artepelin C após 15 dias de exposição ao sol..... 51
Figura 30. Cromatograma da amostra de artepelin C após 20 dias de exposição ao sol..... 51
Figura 31. Cromatograma da análise por CLAE da amostra de artepelin C após exposição ao sol por 5 dias..... 52
Figura 32. Espectro de ^{1}H do ART4 em $CDCl_3$ – 500 mHZ..... 55
Figura 33. Espectro de ^{13}C do ART4 em $CDCl_3$ – 125 MHz..... 56
Figura 34. Espectro de massas do artepelin C no modo de análise negativo..... 57
Figura 35. Espectro de massas do artepelin C no modo de análise positivo..... 57
Figura 36. Espectro de massas do ART4 no modo de análise negativo..... 58
Figura 37. Espectro de massas do ART4 no modo de análise positivo..... 58
Figura 38. Estruturas químicas do ART1, ART2, ART3, ART4 e AC-1..... 59
Figura 39. Espectro de ^{1}H do ART1 em $CDCl_3$ – 500 MHz..... 61
Figura 40. Espectro de ^{13}C do ART1 em $CDCl_3$ – 125 MHz..... 62
Figura 41. Espectro de ^{1}H do ART2 em $CDCl_3$ – 500 MHz..... 63
Figura 42. Espectro de ^{13}C do ART2 em $CDCl_3$ – 125 MHz..... 64
Figura 43. Espectro de ^{1}H do ART3 em $CDCl_3$ – 500 MHz..... 65
Figura 44. Espectro de ^{13}C do ART3 em $CDCl_3$ – 125 MHz..... 66
Figura 45. Espectro de massas do ART1 no modo negativo de análise..... 67
Figura 46. Espectro de massas do ART1 no modo positivo de análise..... 67
Figura 47. Espectro de massas do ART2 no modo negativo de análise..... 68
Figura 48. Espectro de massas do ART2 no modo positivo de análise..... 68
Figura 49. Proposta de mecanismo para a formação dos produtos de degradação do artepelin C por exposição deste composto ao calor..... 69
Figura 50. Espectro de ^{1}H do AC-1 em CD_3OD – 500 MHz..... 72
Figura 51. Espectro de ^{13}C do AC-1 em CD_3OD –125 MHz..... 73
Figura 52. Proposta de mecanismo de reação de conversão *E-Z* do ácido *p*-cumárico e artepelin C por exposição solar..... 74
Figura 53. Padrões dos compostos alvo analisados pelo método cromatográfico desenvolvido: 1: ácido *p*-cumárico; 2: AC-1; P.I.: veratraldeído; 3: ART-1; 4: ART-2; 5: artepelin C; 6: ART-4 e 8: ART-3..... 75
Figura 54. Extrato metanólico de própolis enriquecido com os padrões dos compostos-alvo..... 76
Figura 55. Curva analítica do ácido *p*-cumárico..... 78
Figura 56. Curva analítica do AC-1..... 79
Figura 57. Curva analítica do ART1..... 79

Figura 58. Curva analítica do ART2..... 80
Figura 59. Curva analítica do Artepelin C..... 80
Figura 60. Curva analítica do ART4..... 81
Figura 61. Curva analítica do ART3..... 81
Figura 62. Concentrações do artepelin C nos experimentos de estabilidade após 7,14,21 e 30 dias..... 91
Figura 63. Concentrações do ácido *p*-cumárico nos experimentos de estabilidade após 7,14,21 e 30 dias..... 91
Figura 64. Gráficos de superfície de resposta obtidos dos experimentos de estabilidade do artepelin C após 7,14,21 e 30 dias, respectivamente. -1 corresponde à ausência da variável e +1 corresponde à presença, exceto para a temperatura, onde -1 corresponde à -18ºC e +1 à 40ºC. A concentração está expressa em μg/mL..... 92
Figura 65. Gráficos de superfície de resposta obtidos dos experimentos de estabilidade do ácido *p*-cumárico após 7,14,21 e 30 dias, respectivamente. -1 corresponde à ausência da variável e +1 presença, exceto para a temperatura, onde -1 corresponde à -18ºC e +1 à 40ºC. A concentração está expressa em μg/mL..... 93
Figura 66. Gráfico de superfície de resposta da concentração de artepelin C isolado em função da temperatura (ºC) e do tempo (dias)..... 96
Figura 67. Gráficos de desejabilidade da concentração do artepelin C isolado em função da temperatura e do tempo..... 96
Figura 68. Gráfico de superfície de resposta da concentração do ácido *p*-cumárico isolado em função da temperatura (ºC) e do tempo (dias)..... 97
Figura 69. Gráficos de desejabilidade da concentração do ácido *p*-cumárico isolado em função da temperatura e do tempo..... 97
Figura 70. Gráfico de superfície de resposta da concentração de artepelin C na própolis verde em função da temperatura (ºC) e do tempo (dias)..... 98
Figura 71. Gráficos de desejabilidade da concentração do artepelin C na própolis verde bruta em função da temperatura e do tempo..... 99
Figura 72. Gráfico de superfície de resposta da concentração de ácido *p*-cumárico na própolis verde em função da temperatura (ºC) e do tempo (dias)..... 99
Figura 73. Gráficos de desejabilidade da concentração do ácido *p*-cumárico na própolis verde bruta em função da temperatura e do tempo..... 100
Figura 74. Gráfico das concentrações do artepelin C e do ácido *p*-cumárico nos experimentos de estabilidade prolongada..... 102
Figura 75. Média ± DP da % de viabilidade celular em relação ao controle negativo (doxorrubicina 0,5 μM) após 24 h do tratamento com as amostras na linhagem celular AGP-01..... 104
Figura 76. Fração de células sobreviventes ± DP (%) obtidas através dos ensaios de sobrevivência clonogênica. As células foram tratadas com diferentes concentrações de artepelin C, ART4 e doxorrubicina a 0,5 μM e incubadas por 10 dias..... 105
Figura 77. Média ± DP da % de viabilidade celular em relação ao controle negativo (doxorrubicina à 0,5 μM) após 24 h do tratamento com as amostras na linhagem celular CHO-k1..... 108
Figura 78. Média ± DP da % de viabilidade celular em relação ao controle negativo (doxorrubicina à 0,5 μM) após 24 h do tratamento com as amostras na linhagem 108

celular He-La.....

Figura 79. Média ± DP da % de viabilidade celular das formas promastigotas de *L. amazonensis* após 24 h do tratamento com as amostras..... 111

Figura 80. Média ± DP da % de viabilidade celular das formas amastigotas de *L. amazonensis* após 48 h do tratamento com artepelin C, ART4, ácido *p*-cumárico e AC-1..... 111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fase Móvel utilizada no fracionamento do extrato diclorometânico da própolis verde..... 13
Tabela 2 – Método cromatográfico usado nas análises da própolis verde e suas frações..... 13
Tabela 3 –Gradiente da fase móvel – CLAE preparativo..... 14
Tabela 4 – Método para isolamento do produto de degradação do ácido *p*-cumárico após cinco dias ao sol 17
Tabela 5. Método utilizado para isolar produtos de degradação do artepelin C obtidos após cinco dias de exposição ao sol..... 17
Tabela 6. Método empregado no isolamento do produto de degradação do artepelin C obtidos após cinco dias na estufa à 50ºC..... 18
Tabela 7. Método desenvolvido para análise de artepelin C, ácido *p*-cumárico e seus produtos de degradação majoritários no extrato de própolis verde..... 20
Tabela 8. Fatores e níveis investigados nos experimentos de robustez do método..... 30
Tabela 9. Condições dos experimentos de robustez do método..... 30
Tabela 10. Design Experimental de Box, Hunter & Hunter para três fatores..... 31
Tabela 11. *Design* Experimental Central rotacionado para dois fatores em três níveis..... 32
Tabela 12. Reunião das frações com perfis cromatográficos semelhantes e suas respectivas massas..... 40
Tabela 13. Compostos isolados após cinco dias de exposição do artepelin C ao sol..... 52
Tabela 14. Dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C do artepelin C e ART4..... 54
Tabela 15. Tabela 15. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C do ART1, ART2 e ART3..... 60
Tabela 16. Dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C do ácido *p*-cumárico (Yi et al. 2010) e do AC-1..... 71
Tabela 17. Parâmetros cromatográficos, espectros de UV dos padrões e dados das curvas analíticas..... 77
Tabela 18. Limites de detecção e quantificação das curvas analíticas dos padrões e seus produtos de degradação majoritários..... 78
Tabela 19. Resíduos das curvas analíticas do artepelin C, ART4, ácido *p*-cumárico e AC-1..... 82
Tabela 20. Resíduos das curvas analíticas do ART1, ART2 e ART3..... 82
Tabela 21. Valores de p das análises de falta de ajuste “lack of fit” das curvas analíticas..... 83
Tabela 22. Dados de precisão e exatidão do método..... 83
Tabela 23. Precisão e exatidão dos padrões nas concentrações de 0,36 a 6,0 μg/mL..... 84
Tabela 24. Recuperação do método de extração..... 85
Tabela 25. Robustez do método cromatográfico..... 87
Tabela 26. Valores de p das análises de ANOVA dos experimentos do “Full Factorial Design” considerando a presença ou ausência de luz, alta temperatura e oxigênio do ar na concentração do artepelin C e o ácido *p*-cumárico..... 90

Tabela 27. Dados estatísticos das análises de ANOVA de “lack of fit” e de regressão do modelo quadrático para a variável resposta concentração. Variáveis: X1: temperatura (ºC) e X2: tempo (dias)..... 95
Tabela 28. Concentração do artepelin C e ácido *p*-cumárico nos experimentos de estabilidade prolongada..... 101
Tabela 29. Valores de IC_{50} do artepelin C, do ácido *p*-cumárico e de seus produtos de degradação contra células da linhagem AGP-01..... 104
Tabela 30. Valores de IC_{50} do artepelin C, do ácido *p*-cumárico e de seus derivados para as linhagens tumorais AGP-01, He-La e não tumoral CHO-K1 e índice de seletividade destes compostos para AGP-01..... 109
Tabela 31. Valores de IC_{50} do artepelin C, do ácido *p*-cumárico e de seus derivados para as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e índice de seletividade destes compostos..... 112
Tabela 32. Valores de CIM e CBM do artepelin C, do ácido *p*-cumárico e de seus produtos de degradação majoritários contra bactérias bucais..... 114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PV	Própolis verde
AcOEt	Acetato de etila
ANOVA	Análise de variância
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-PREP	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa
DAD	Detector de Arranjo de Diodos / Diode Array Detector
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetil sulfóxido
EM	Espectrometria de Massas
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
J	Constante de acoplamento
m/z	Razão massa carga
MeOH	Metanol
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Tr	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Lista de figuras iii
Lista de tabelas vii
Lista de abreviaturas e símbolos ix

1. INTRODUÇÃO 1
1.1 Própolis: composição química..... 1
1.2 Importância econômica da própolis verde..... 2
1.3 Própolis verde, ácido *p*-cumárico, artepelin C e atividades biológicas..... 3
1.4 O câncer e a importância da descoberta de novos fármacos..... 4
1.5 Doenças bucais associadas a micro-organismos..... 5
1.6 Doenças negligenciadas e a leishmaniose..... 6
1.7 Estabilidade de produtos de origem natural..... 6

2. OBJETIVOS..... 9
2.1 Objetivos Gerais..... 9
2.2 Objetivos Específicos..... 9

3. MATERIAL E MÉTODOS 11
3.1 Isolamento do artepelin C..... 11
3.1.1 Obtenção do extrato bruto de própolis verde..... 11
3.1.2 Fracionamento do extrato de própolis verde..... 11
3.2 Obtenção dos produtos de degradação majoritários do artepelin C e do ácido *p*-cumárico..... 14
3.2.1 Determinação do tempo necessário para obtenção de produtos de degradação do artepelin C e do ácido *p*-cumárico..... 14
3.2.2 Degradação forçada do artepelin C e do ácido *p*-cumárico..... 16
3.2.3 Isolamento dos produtos de degradação majoritários obtidos por degradação forçada do artepelin C e do ácido *p*-cumárico por exposição ao sol..... 16
3.2.4 Isolamento dos produtos de degradação majoritários por degradação forçada do artepelin C por exposição ao calor..... 18
3.3 Desenvolvimento e validação de método em CLAE de Fase Reversa para quantificação do artepelin C, ácido *p*-cumárico e seus produtos de degradação..... 19
3.3.1 Desenvolvimento do método..... 19
3.3.2 Validação do método..... 20
3.3.2.1 Seletividade..... 21
3.3.2.2 Linearidade..... 21
3.3.2.3 Limites de detecção e quantificação..... 25
3.3.2.4 Precisão e Exatidão..... 27
3.3.2.5 Recuperação..... 28
3.3.2.6 Robustez..... 29
3.4 Ensaios de estabilidade do artepelin C e do ácido *p*-cumárico..... 30
3.4.1 Determinação dos principais fatores responsáveis pela degradação do artepelin C e do ácido *p*-cumárico..... 30

3.4.2 Otimização das condições de armazenamento do artepelin C, do ácido *p*-cumárico e da própolis verde..... 31
3.4.3 Estabilidade Prolongada..... 33
3.5 Ensaios biológicos..... 33
3.5.1 Atividade antimicrobiana..... 33
3.5.1 Atividade antiparasitária..... 35
3.5.1.1 Atividade leishmanicida contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*..... 35
3.5.1.1.1 Triagem da atividade leishmanicida contra promastigotas de *L. amazonensis*..... 35
3.5.1.1.2 Determinação da concentração inibitória de 50% (CI_{50}) das formas promastigotas de *L. amazonensis*..... 36
3.5.1.2 Avaliação *in vitro* contra as formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*..... 36
3.5.2 Atividade citotóxica..... 38
3.5.2.1 Ensaios de viabilidade celular..... 38
3.5.2.2 Ensaios de Sobrevivência clonogênica..... 39

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 39
4.1 Isolamento do artepelin C..... 39
4.2 Obtenção, isolamento e identificação dos produtos de degradação..... 50
4.2.1 Produtos de degradação do artepelin C..... 50
4.2.1.1 Degradação do artepelin C por exposição ao sol..... 50
4.2.1.2 Degradação do artepelin C por exposição ao calor..... 59
4.2.2 Produto de degradação do ácido *p*-cumárico..... 70
4.3 Desenvolvimento e validação de método analítico em CLAE-FR para quantificação do artepelin C, ácido *p*-cumárico e seus produtos de degradação majoritários em extrato de própolis..... 74
4.3.1 Seletividade..... 75
4.3.2 Linearidade..... 76
4.3.3 Precisão e Exatidão..... 83
4.3.4 Recuperação..... 85
4.3.5 Robustez..... 86
4.4 Estabilidade do artepelin C e do ácido *p*-cumárico..... 87
4.4.1 Determinação dos principais fatores responsáveis pela degradação do artepelin C e do ácido *p*-cumárico..... 87
4.4.2 Otimização das condições de transporte e armazenamento do artepelin C e do ácido *p*-cumárico..... 93
4.4.3 Estabilidade prolongada..... 101
4.5 Ensaios Biológicos..... 102
4.5.1 Ensaios de citotoxidade e sobrevivência clonogênica..... 102
4.5.2 Ensaios antiparasitários contra *Leishmania*..... 109
4.5.3 Ensaios antimicrobianos contra bactérias bucais..... 114

5. CONCLUSÕES 115

6. REFERÊNCIAS..... 116

1. INTRODUÇÃO

1.1 Própolis: composição química

A própolis é um produto apícola formada por um conjunto complexo de componentes coletados por abelhas da espécie *Apis mellifera*, tais como resinas de diversas partes das plantas (ramos, flores, pólen, botões e exsudatos de árvores), que são depositados na colmeia juntamente com saliva e enzimas deste inseto para, principalmente, fazer a assepsia e manter a temperatura adequada para as abelhas na colmeia. É constituída, basicamente, de resina (50% da mistura, consistindo majoritariamente em flavonoides e ácidos fenólicos), ceras (30%), óleos essenciais (10%), pólen (5%) e outras substâncias orgânicas (5%). Entre os compostos presentes, podem ser observados hidrocarbonetos, alcoóis, ácidos alifáticos e aromáticos, ésteres e seus derivados, aldeídos, cetonas, flavonoides, ácidos graxos, terpenoides, aminoácidos, açúcares, lignanas, vitaminas, minerais, entre outros (Berretta et al., 2017).

A composição química da própolis está intimamente ligada à flora de cada região geográfica, sendo, portanto, diferente de acordo com as espécies vegetais que servem de fonte para a coleta da resina. Em relação às própolis brasileiras, estas podem ser divididas em vários tipos, destacando-se a própolis verde, proveniente do sudeste brasileiro, cuja principal fonte vegetal para sua produção é a *Baccharis dracunculifolia*, conhecida popularmente por alecrim-do-campo (Costa et al., 2019, 2018).

A própolis verde brasileira (figura 1) possui composição química característica, pois contêm majoritariamente compostos fenólicos prenilados, como o artepelin C, bacarina e drupanina, assim como ácidos fenólicos, como o precursor biossintético destes compostos, o ácido *p*-cumárico.

Este tipo de própolis, devido à sua composição química, possui diversos benefícios para a saúde, agindo como antioxidante, por exemplo. Isso mostra que vários dos compostos fenólicos isolados da própolis verde, inclusive os prenilados, são responsáveis por várias das suas atividades biológicas. Portanto, ela é usualmente empregada em alimentos, bebidas e suplementos com boa aceitação popular. (Berretta et al., 2017; Fukuda et al., 2015; Kyoko Naramoto, 2014).

Figura 1. Própolis Verde Bruta

1.2 Importância econômica da própolis verde

Uma vez que o artepelin C e o ácido *p*-cumárico possuem inúmeras atividades biológicas e estão presentes na própolis verde em concentração apreciável, o valor comercial deste tipo de própolis no mercado internacional é alto. No mercado japonês, a própolis verde possui alto valor comercial, uma vez que em 2010 o preço de um quilograma de própolis verde era aproximadamente U$ 90,00, enquanto que a mesma quantidade de mel era vendida por U$ 3,00 (Berretta et al., 2017).

Devido ao grande interesse de outros países pela própolis verde brasileira, aproximadamente 75% da produção brasileira deste produto apícola são exportados, principalmente para o Japão (Avelino & dos Santos, 2018). O interesse do Japão pela própolis verde é justificado tanto pelo consumo, sendo um dos exemplos mais relevantes o uso desta como auxiliar no tratamento de câncer; como pelas pesquisas japonesas relacionadas principalmente à composição química e às atividades biológicas deste tipo de própolis, destacando-se os estudos com o artepelin C (Toreti et al., 2013; Urushisaki et al., 2011).

A alta demanda de própolis verde, em especial dos países asiáticos, como o Japão, é essencial para a sustentação da economia que gira ao redor deste produto e para seu valor consideravelmente lucrativo: a produção brasileira de própolis é estimada em 140 toneladas, sendo a maior parte (100 toneladas) de própolis verde. Como aproximadamente 80% do total da produção de própolis verde vêm de Minas

Gerais, mais especificamente a região próxima ao rio São Francisco na Serra da Canastra, os apicultores desta região dependem da produção da própolis verde de boa qualidade para que tal produto seja exportado (Berretta et al., 2017).

1.3 Própolis verde, ácido *p*-cumárico, artepelin C e atividades biológicas

O artepelin C (figura 2) é um composto fenólico prenilado que está presente em alto teor na própolis verde, assim como o ácido *p*-cumárico, (figura 2) sendo estes considerados seus marcadores químicos (Berretta et al., 2017; Costa et al., 2018).

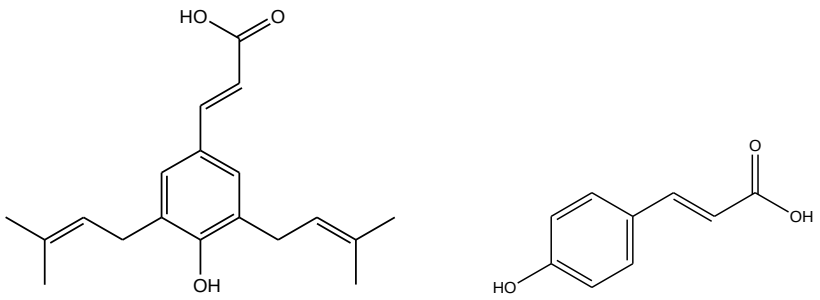


Figura 2. Estruturas químicas do artepelin C e do ácido *p*-cumárico

Devido à presença de tais compostos, a própolis verde, além de desempenhar a importante função de selar as fendas nas colmeias para manter a temperatura adequada para as abelhas, promove diferentes atividades biológicas, o que é interessante do ponto de vista farmacológico (Berretta et al., 2017). Algumas destas atividades já descritas na literatura são: a atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais (Búfalo et al., 2010), anti-inflamatória (Mariano et al., 2018), gastroprotetora (Barros et al., 2007), antiparasitária (Pontin et al., 2008) e antidiabética (Kitamura et al., 2013).

Dos compostos prenilados presentes na própolis verde, o artepelin C é o mais abundante (Jorge et al., 2008) e provavelmente contribui de forma significativa com as atividades biológicas do extrato de própolis verde, pois o artepelin C isolado demonstrou diversos efeitos, como a atividade gastroprotetora (Costa et al., 2018), citotóxica contra linhagens de células tumorais (Oliveira et al., 2014), anti-inflamatória (Paulino et al., 2008), antidiabética (Choi et al., 2011) e antigenotóxica

(Monteiro Neto et al., 2011). O ácido *p*-cumárico também desempenha diversos efeitos biológicos, como antiulcerogênico (Barros et al., 2008), antimicrobiano, anticâncer e antimutagênico (Pei et al., 2016).

Observando-se as diversas atividades da própolis verde, artepelin C e ácido *p*-cumárico, ressalta-se o efeito citotóxico, antimicrobiano e antiparasitário. Considerando-se a importância da descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento do câncer, da leishmaniose, bem como de novos agentes antimicrobianos, a própolis verde apresenta potencial para tal.

1.4 O câncer e a importância da descoberta de novos fármacos

As chamadas DCNTs (Doenças Crônicas Não Transmissíveis) são, nos dias atuais, responsáveis por muitos dos casos de morbidades e mortalidade e o câncer é uma das mais relevantes de tais doenças. A Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2015 estimou o câncer como a principal ou a segunda principal causa das mortes de pessoas com menos de 71 anos em 91 de 172 países e este ocupou a terceira ou quarta posição em outros 22 países. Em 2018, a GLOBOCAN (Estatística Global de Câncer) mostra que em 2018 a estimativa chegou a 18.1 milhões de novos casos de câncer e 9.6 milhões de mortes causadas pelo câncer (Bray et al., 2018).

Dentre os diversos tipos de câncer, o que afeta o estômago se destaca, pois afeta milhares de pessoas ao redor do mundo: o câncer gástrico é um dos tipos mais comuns de câncer e causa a morte na maioria dos pacientes afetados. Uma das razões é que, geralmente, os pacientes dão início ao tratamento tardiamente, quando a doença já se encontra em estágio avançado. Além disso, a taxa de reincidência das células cancerígenas é alta. Outra razão importante é a falta de medicamentos eficientes na cura desta patologia, pois os fármacos e tratamentos disponíveis atualmente não são suficientes para a cura total deste tipo de câncer (Li et al., 2017).

Tendo em vista a relevância e gravidade desta moléstia, a própolis tem sido objeto de pesquisa contra diferentes células tumorais e sua atividade pode ser atribuída ao efeito antioxidante, melhora do sistema imunológico, diminuição da proliferação das células cancerígenas, bloqueio de vias de sinalização de oncogenes e diminuição da angiogênese. Tais atividades estão intimamente ligadas à

composição química da própolis e alguns dos compostos que participam do efeito antitumoral foram identificados como crisina, galangina, cardanol e artepelin C (Patel, 2016).

Entre estes compostos, estudos mostram que o artepelin C é um forte candidato a fármaco contra esta moléstia, pois apresenta efeito citotóxico frente a inúmeras linhagens celulares, geralmente provocando efeito antiproliferativo, citotóxico e/ou apoptótico. Alguns exemplos destas linhagens são: células gástricas, do cólon, pulmão, leucêmicas, entre outras. Além disso, o artepelin C, assim como outros compostos fenólicos, participa do efeito preventivo a inúmeros tipos de carcinomas (Androutsopoulos et al., 2010; Szliszka et al., 2012).

1.5 Doenças bucais associadas a micro-organismos

Além do câncer, inúmeras doenças causadas por micro-organismos também são recorrentes na atualidade: *Streptococcus mutans*, por exemplo, é uma das principais bactérias causadoras da cárie e a importância de compostos bactericidas e/ou bacteriostáticos reside na relação das doenças dentárias com inúmeras outras patologias, como diabetes, doenças cardíacas, hipertensão arterial, esclerose múltipla, entre outras; além de serem doloridas. As leveduras do gênero *Candida* e as bactérias da espécie *E. coli* geralmente são inócuas ao ser humano, porém, em organismos com o sistema imunológico comprometido, podem assumir caráter patogênico, provocando candidíase e doenças gastrintestinais, respectivamente (Croxen et al., 2013; Kim and Sudbery, 2011; Patra et al., 2015).

A própolis, além de seus inúmeros outros usos, também é empregada como agente antimicrobiano contra bactérias bucais. Tal atividade é devida, principalmente aos compostos fenólicos, flavonoides, ácidos aromáticos e ésteres. Além disso, enxaguatórios bucais contendo própolis se mostraram menos tóxicos às células de fibroblastos gengivais em comparação à clorexidina. Formulações à base de 5, 10 e 15% de própolis e quitosana demonstraram atividade antimicrobiana semelhante à da clorexidina (Franca et al., 2014).

Em relação ao efeito antimicrobiano do artepelin C, este é ativo contra uma ampla gama destes, inclusive contra bactérias cariogênicas, como o *Enterococcus faecalis*; e também contra outros micro-organismos, como *Staphylococcus aureus*,

Pseudomonas aeruginosa, *Escherichia coli*, e espécies de *Candida* (Estrada et al., 2008).

1.6 Doenças negligenciadas e a leishmaniose

Leishmaniose é um grupo de doenças causadas por parasitas do gênero *Leishmania* spp. responsáveis por muitas mortes e doentes no mundo. Além disso, a leishmaniose é classificada como uma doença negligenciada e está presente principalmente em países em desenvolvimento. Esta parasitose é uma das doenças tropicais mais comuns e atinge cerca de 12 milhões de pessoas em mais de 98 países. Os fármacos mais comumente utilizados para o tratamento da leishmaniose são os medicamentos antimoniais pentavalentes, pentamidina e anfotericina B, que não são totalmente ativos oralmente e os parasitas estão mais resistente a estas drogas a cada dia. Tais medicamentos também causam diversos efeitos colaterais (Akhoundi et al., 2017). Portanto, essas doenças são importantes no cenário mundial e fármacos mais eficazes e seguros são necessários para um tratamento efetivo.

Tendo em vista a descoberta de compostos de origem natural com atividade antiparasitária, PONTIN e colaboradores (2008) avaliaram e constataram o efeito leishmanicida do extrato hidroalcoólico da própolis verde, que é constituído majoritariamente por derivados prenilados do ácido *p*-cumárico, como o artepelin C e por ácido *p*-cumárico. Portanto, estas atividades podem ser atribuídas em parte a estes compostos.

Considerando-se, então, a importância atual destas doenças, a necessidade de medicamentos inovadores e as atividades da própolis verde, a avaliação de seus compostos majoritários artepelin C e ácido *p*-cumárico, assim como de seus derivados estruturais quanto às atividades antimicrobiana, citotóxica contra diferentes linhagens de células tumorais e antiparasitária é importante, pois tais compostos podem ser promissores candidatos a novos fármacos.

1.7 Estabilidade de produtos de origem natural

Matérias primas provenientes de plantas ou de outros produtos de origem natural são, muitas vezes, utilizadas para a produção de fitoterápicos, para comercialização ou para exportação e devem ter sua estabilidade avaliada, pois a

deterioração do produto indica baixa qualidade da matéria-prima e, portanto, diminui seu valor. Estudos de estabilidade levam a melhores condições de transporte e armazenamento destes produtos, mantendo e/ou aumentando seu valor agregado. A avaliação da estabilidade de tais produtos quando expostos à luz, altas temperaturas e presença de oxigênio é muito relevante, pois são condições às quais as matérias-primas são usualmente submetidas quando são transportadas e armazenadas(Arimboor et al., 2015).

Em relação à própolis verde, devido à presença de muitos compostos majoritários insaturados, como o ácido *p*-cumárico, artepelin C, bacarina e drupanina, torna-se ainda mais importante a avaliação de sua estabilidade frente a estes fatores, pois a presença de oxigênio no ar, luz e altas temperaturas são fatores conhecidos por causarem a degradação de compostos com ligações duplas (Rodriguez-Amaya, 2019).

Daskalaki et al (2009) avaliaram a influência da presença de oxigênio em óleo de oliva e mostraram que, em temperatura ambiente, no escuro e com pouco oxigênio disponível, por volta de 30% de derivados do hidroxitirosol foram degradados em 15 meses de armazenamento. Da mesma forma, o conteúdo de tais compostos diminui em 60% e 90% após 30 e 90 minutos de exposição do óleo de oliva à alta temperatura, respectivamente.

A luz ultravioleta emitida pela luz do sol e por lâmpadas usadas na iluminação de ambientes internos pode também propiciar a degradação de compostos insaturados, especialmente nas ligações duplas: o ácido (*E*)-2,2-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-benzopiran-6-propenoico, um composto isolado de própolis, após exposição à luz UV a 365 nm, sofreu isomerização na ligação dupla (de *E* para *Z*) (Hirota et al., 2000).

Portanto, estudos sobre a estabilidade do artepelin C e do ácido *p*-cumárico em diferentes condições de luminosidade, temperatura e oxigênio são de extrema importância, pois através destes, novas condições de embalagem, transporte e armazenamento podem ser sugeridas de modo a minimizar o processo de degradação. Além disso, para que seja possível a constatação do teor destes metabólitos na própolis verde bruta é necessário um método analítico capaz de fornecer tais dados com confiabilidade. Ademais, a identificação dos principais produtos de degradação do artepelin C e do ácido *p*-cumárico, assim como a comparação de seus efeitos biológicos é importante, devido ao alto valor da própolis

verde brasileira, especialmente no mercado internacional, podendo agregar ainda mais valor à própolis verde bruta e seus produtos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

- Investigar os principais fatores responsáveis pela degradação do artepelin C e do ácido *p*-cumárico isolados e na própolis verde,
- Isolar e identificar os produtos de degradação majoritários,
- Desenvolver um método cromatográfico em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para análise dos principais produtos de degradação e seus precursores;
- Realiza os seguintes ensaios biológicos *in vitro* do artepelin C, do ácido *p*-cumárico e de seus produtos de degradação: antiparasitário contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*, citotóxico contra as linhagens AGP-01, He-La e CHO-k1 e antimicrobiano contra bactérias bucais.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar o artepelin C a partir da própolis verde utilizando-se diferentes modalidades cromatográficas. O ácido *p*-cumárico foi adquirido comercialmente;
- Submeter o artepelin C e o ácido *p*-cumárico a degradação forçada (exposição a altas temperaturas e à luz solar) para obtenção dos produtos de degradação majoritários;
- Isolar os produtos de degradação utilizando-se diferentes modalidades cromatográficas;
- Elucidar a estrutura química dos produtos de degradação majoritários com o auxílio de métodos físicos de análise, como Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas;
- Desenvolver um método analítico utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de fase reversa para quantificar o artepelin C, ácido *p*-cumárico e os principais produtos de degradação no extrato de própolis verde;
- Utilizando-se Designs Experimentais, realizar estudos de estabilidade com a própolis verde, com o artepelin C e com o ácido *p*-cumárico, expondo as amostras a diferentes condições: presença e ausência de luz, presença ou ausência

de oxigênio do ar, temperaturas abaixo de 0 ºC, temperatura ambiente, temperaturas ≥ 40ºC;

- Determinar as condições ideais de armazenamento e transporte da própolis verde bruta, do artepelin C e do ácido *p*-cumárico isolados;
- Realizar ensaios com os produtos de degradação e com seus precursores contra linhagens de células tumorais, sendo estas a AGP-01 (câncer gástrico) e a He-La (câncer cervical), e contra a linhagem de células normais CHO-k1 (células de ovário de hamster chinês);
- Realizar ensaios antimicrobianos de tais compostos para avaliar a atividade contra as bactérias bucais *Streptococcus mutans, Streptococcus mitis, Streptococcus sobrinus, Streptococcus sanguinis, Streptococcus salivarius, Lactobacillus casei e Enterococcus faecalis*;
- Avaliar a atividade antiparasitária do artepelin C, do ácido *p*-cumárico e de seus produtos de degradação majoritários contra as formas amastigota e promastigota de *Leishmania amazonensis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolamento do artepelin C

3.1.1 Obtenção do extrato bruto de própolis verde

A própolis verde bruta foi fornecida pela empresa Apis Flora®, localizada na cidade de Ribeirão Preto-SP. Para obter-se o extrato concentrado nos compostos fenólicos presentes na própolis verde, especialmente o artepelin C, 1 kg de própolis verde congelada foi pulverizada. Após, esta foi submetida à extração com 4 L de metanol por 48 h. Este processo foi realizado repetido três vezes. Em seguida, os extratos foram reunidos e o volume concentrado em rotaevaporador à vácuo até 30% do volume inicial. Então, o extrato foi mantido em geladeira por 24 h para precipitação das ceras, seguido de filtração em papel de filtro.

3.1.2 Fracionamento do extrato de própolis verde

O extrato resultante teve seu volume aumentado para 4 L com a adição de metanol, seguido de partição três vezes com 1000 mL de hexano para remoção dos compostos mais apolares presentes no extrato. Em seguida, foi acrescentada água à solução metanólica até se obter a proporção de solventes metanol:água 6:4, seguido de partição três vezes com 1000 mL de diclorometano. Utilizou-se diclorometano para particionar a fração hidroalcoólica com o objetivo de obter-se uma fração mais concentrada em artepelin C. Tal fração, após secagem utilizando-se rotaevaporador à vácuo, forneceu 400 g (Figura 3).

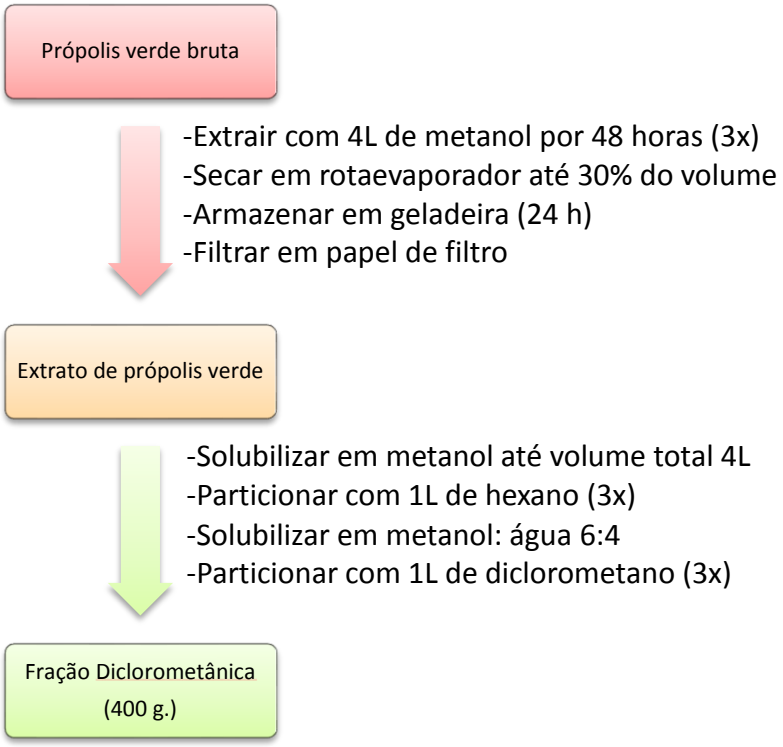


Figura 3. Método de obtenção do extrato metanólico de própolis verde e da fração diclorometânica

Parte da fração diclorometânica (54,55 g.), após concentração por rotaevaporação, foi liofilizada e fracionada por meio de cromatografia em coluna de fase normal, empregando-se uma coluna de vidro de 30 cm x 8 cm. Como fase estacionária foram utilizadas 450 g de sílica gel 60 (60-200 µm) (Across organics®) e como fase móvel hexano (Hex): acetato de etila (AcOEt) em gradiente crescente de polaridade: de 95:5 (Hex:AcOEt) até 100% AcOEt (tabela 1). Foram coletadas 236 frações de 1000 mL cada e, após análise por cromatografia em camada delgada, tais frações foram reunidas em subfrações, de acordo com o perfil cromatográfico destas. Além disso, foi utilizado padrão de artepelin C nas análises por cromatografia em camada delgada para identificar quais eram as frações ricas em tal composto para que fossem reunidas.

Tabela 1. Fase Móvel utilizada no fracionamento do extrato diclorometânico da própolis verde

Fase Móvel	Frações
Hexano: AcOEt (95:05)	1-65
Hexano: AcOEt (90:10)	66-103
Hexano: AcOEt (85:15)	104-143
Hexano: AcOEt (80:20)	144-149
Hexano: AcOEt (70:30)	150-189
Hexano: AcOEt (60:40)	190-209
Hexano: AcOEt (1:1)	210-234
AcOEt	235-236

As 14 subfrações (frações reunidas) foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em cromatógrafo da Waters® acoplado ao detector de arranjo de diodos, com auxílio do software Empower, utilizando o método descrito por MACHADO et al. (2012). Em tais análises foi utilizada coluna Shim-Pack CLC-ODS (M), shimadzu 4,6 mm x 250 mm, diâmetro de partícula de 5 µm, diâmetro de poro de 100 Å. A fase móvel empregada foi gradiente de metanol (B) e água acidificada (A). A solução de água acidificada foi preparada adicionando-se ácido fórmico 85% PA em água Milli-Q a uma concentração de 0,1%, resultando em uma solução de pH 2,7. Esta solução foi filtrada utilizando-se membrana para filtração de 0,45 µm. O método possui fluxo da fase móvel 0,8 mL/min., detecção a 275 nm e tempo de análise de 77 min, sendo a proporção dos solventes A e B descritas na tabela 2. Antes das análises, as 14 subfrações foram dissolvidas em metanol (grau HPLC) na concentração de 1 mg/mL e filtradas em membrana de 0,45 µm. Os cromatogramas das amostras foram comparado ao do padrão autêntico de artepellin C.

Tabela 2. Método cromatográfico usado nas análises da própolis verde e suas frações

Tempo (min)	Solvente (%)	
	Metanol	Água Acidificada
0	20	80
70	95	5
75	20	80
77	20	80

Após identificação das subfrações ricas em artepelin C, estas foram purificadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência preparativa (Cromatógrafo da Shimadzu) com detector Ultra Violeta utilizando como fase estacionária coluna preparativa C18 Shimadzu Shim-pack (20 × 250 mm, 5 µm) e como fase móvel gradiente de metanol e água acidificada (com ácido fórmico pH 2,7) com tempo total de análise de 23 min (tabela 3). Em cada análise, foram realizadas injeções de 500 µL de amostra na concentração de 200 mg/mL solubilizadas em metanol (grau HPLC). O método utiliza vazão de fase móvel igual a 8 mL/min. e detecção em 275 nm e 310 nm. O artepelin C, nestas condições, possui tempo de retenção de 14,3 min (Costa et al., 2018).

Tabela 3. Gradiente da fase móvel – CLAE preparativo

Tempo (min)	**Solvente (%)**	
	Metanol	**Água Acidificada**
0	80	20
15	95	5
18	95	5
19	80	20
23	80	20

Após purificado, o artepelin C isolado foi solubilizado em $CDCl_3$ e analisado em espectrômetro Bruker (DRX-500) em 500 MHz e 125 MHz para ^{1}H e ^{13}C, respectivamente, para confirmação de sua estrutura química.

3.2 Obtenção dos produtos de degradação majoritários do artepelin C e do ácido *p*-cumárico

3.2.1 Determinação do tempo necessário para obtenção de produtos de degradação do artepelin C e do ácido *p*-cumárico

Com o objetivo de se obterem os produtos de degradação majoritários do artepelin C e do ácido *p*-cumárico, primeiramente, foram realizados experimentos para determinar-se o tempo de exposição de tais compostos ao sol e à temperatura de 50ºC necessários para obtenção de quantidade significativa de produtos de degradação. Para tanto, 20 mg de cada composto foram

solubilizados em 10 mL de AcOEt e transferidos para um Erlenmeyer de 50 mL de capacidade, os quais foram fechados hermeticamente. As amostras foram expostas ao sol por 12 h ao dia pelo período de 30 dias. Amostras também foram colocadas em estufa de circulação de ar a 50 ºC, protegidas da luz, pelo mesmo período. Para verificar a degradação do artepelin C e do ácido *p*-cumárico e a formação de produtos de degradação, aproximadamente 500 µL de amostra eram retirados de cada frasco a cada sete dias, secos, solubilizados em 1 mL de metanol grau HPLC e analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência utilizando-se o método analítico desenvolvido por Machado et al. (2012) e descrito na subseção anterior (Figura 4).

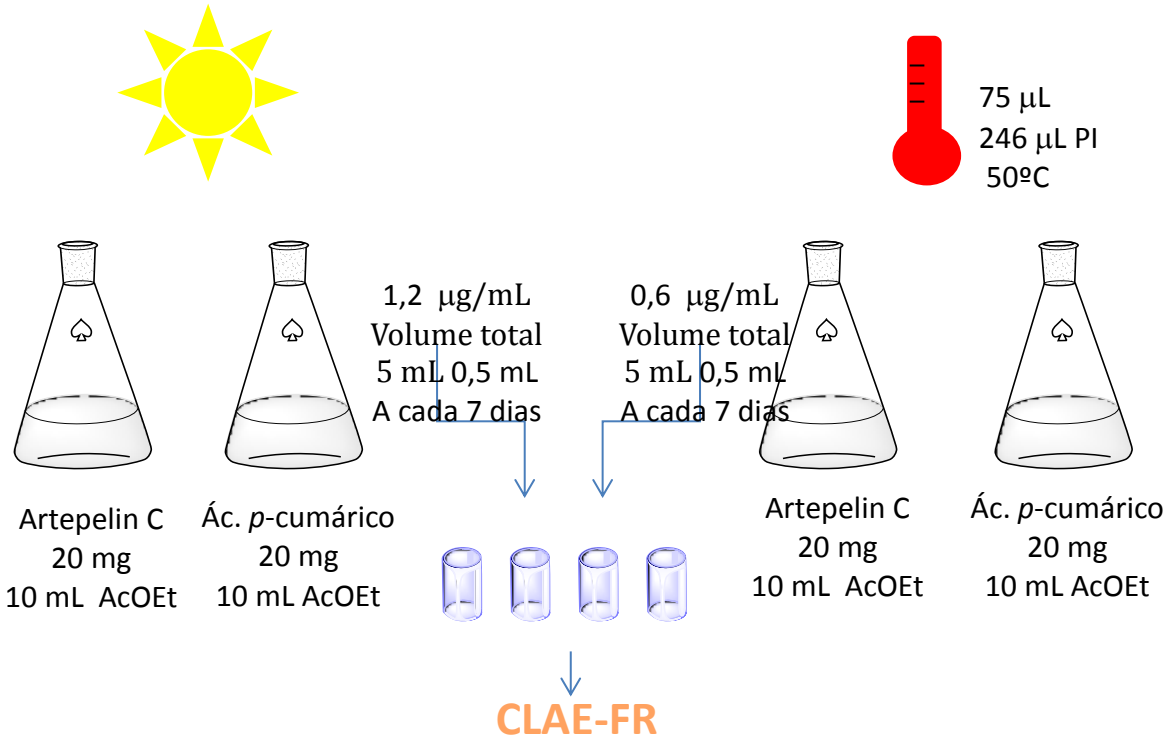


Figura 4. Experimentos de determinação do tempo necessário para obtenção de produtos majoritários do artepelin C e do ácido *p*-cumárico por degradação forçada

Considerando-se que o período de exposição dos padrões por cinco dias ao sol e à temperatura de 50ºC era suficiente para a formação de produtos degradação majoritários, tais experimentos foram feitos em maior escala visando obterem-se maiores quantidades dos produtos de degradação para serem

posteriormente utilizados no desenvolvimento e validação do método em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa e também nos ensaios biológicos.

3.2.2 Degradação forçada do artepelin C e do ácido *p*-cumárico

Para obtenção dos produtos de degradação majoritários, os padrões de artepelin C e de ácido *p*-cumárico foram submetidos à degradação forçada por exposição à luz solar: 200 mg de cada composto foram solubilizados em 100 mL de AcOEt em frascos hermeticamente fechados e expostos ao sol pelo período de cinco dias. A mesma quantidade de artepelin C, nesta mesma concentração, foi exposta ao calor (50ºC) em estufa de circulação de ar pelo mesmo período. O ácido *p*-cumárico, como não sofreu degradação significativa por exposição ao calor por 30 dias, não foi submetido a este experimento em maior escala.

Após degradação forçada do artepelin C e do ácido *p*-cumárico, seus produtos de degradação majoritários foram isolados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência semipreparativa.

3.2.3 Isolamento dos produtos de degradação majoritários obtidos por degradação forçada do artepelin C e do ácido *p*-cumárico por exposição ao sol

Foram obtidos um produto de degradação majoritário do artepelin C e um do ácido *p*-cumárico por exposição ao sol. Estes produtos foram isolados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa (CLAE-FR) semipreparativa.

Para isolamento do produto de degradação do ácido *p*-cumárico foi selecionada como fase estacionária a coluna Kromasil® C18- 250 mm × 10 mm- 5 µm e como fase móvel o gradiente de metanol e água acidificada (0,1% de ácido fórmico) (Tabela 4), com tempo total de eluição de 26 min. Em cada eluição, foram injetados 50 µL de amostra solubilizada em metanol- grau HPLC na concentração de 200 mg/mL. A vazão de fase móvel utilizada foi 4,6 mL/min. Neste método o ácido *p*-cumárico possui tempo de retenção de 8.5 min. e seu produto de degradação 10.5 min.

Tabela 4. Método para isolamento do produto de degradação do ácido *p*-cumárico após cinco dias ao sol

Tempo (min)	Solvente (%)	
	Metanol	Água Acidificada com 0,1% de ácido fórmico
0	25	75
20	50	50
22	50	50
24	25	75
26	25	75

Para isolamento do produto de degradação do artepelin C foi empregada a mesma coluna cromatográfica como fase estacionária, porém, como fase móvel o solvente orgânico foi substituído por acetonitrila, visto que a resolução não foi satisfatória utlizando-se metanol. Além disso, foram adicionados modificadores de fase móvel à água, sendo estes metanol (5%) e ácido fórmico (0,4%) a fim de melhorar a separação cromatográfica. O modo de eluição selecionado foi gradiente (tabela 5), com tempo total de eluição de 67 min. O volume de injeção, concentração da amostra e vazão da fase móvel foram os mesmos utilizados para isolamento do produto de degradação do ácido *p*-cumárico. Neste método o artepelin C e seu produto de degradação possuem tempos de retenção de 36.0 e 36.6 min, respectivamente.

Tabela 5. Método utilizado para isolar o produto de degradação majoritário do artepelin C obtido após cinco dias de exposição ao sol

Tempo (min)	Solvente (%)	
	Acetonitrila	Água Acidificada com 0,4% de ácido fórmico+5% de metanol
0	20	80
60	95	5
63	95	5
65	20	80
67	20	80

3.2.4 Isolamento dos produtos de degradação majoritários por degradação forçada do artepelin C por exposição ao calor

Da degradação forçada do artepelin C por exposição ao calor (50ºC) foram obtidos três compostos e, como estes estavam em uma mistura menos complexa em comparação ao produto de degradação do artepelin C por degradação solar, o tempo de eluição do método de isolamento pôde ser menor, sendo este de 26 min. Como fase estacionária também foi utilizada a coluna Kromasil mencionada na subseção anterior e como fase móvel utilizaram-se acetonitrila como solvente orgânico e água+0,4% de ácido fórmico+5% de metanol como fase aquosa (Tabela 6). O volume de injeção foi de 50 μL para cada separação (amostra na concentração de 200 mg/mL) e vazão de 4,6 mL/min. Os três produtos de degradação e o artepelin C possuem tempos de retenção de 7,5; 8,5; 17,8 e 11,4, respectivamente.

Tabela 6. Método empregado no isolamento dos produtos de degradação do artepelin C obtidos após cinco dias na estuda à 50 ºC

	Solvente (%)	
Tempo (min)	**Acetonitrila**	**Água Acidificada com 0,4% de ácido fórmico+5% de metanol**
0	55	45
20	82	18
22	82	18
24	55	45
26	55	45

Após o isolamento dos produtos de degradação, todos eles (ambos obtidos por degradação do ácido p-cumárico e do artepelin C por exposição ao sol e do artepelin C por exposição ao calor) foram analisados por RMN de ^{1}H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz), além de RMN bidimensional (HSQC, HMBC) em espectrômetro Bruker® para a determinação estrutural destes compostos. Ainda, foram analisados por injeção direta em espectrômetro de massas Thermo Scientific Exactive Plus Orbitrap™ ⁻electrospray- (H-ESI II) nos modos positivo e negativo de ionização em modo full scan com m/z entre 120-1200.

3.3 Desenvolvimento e validação de método em CLAE de Fase Reversa para quantificação do artepelin C, ácido *p*-cumárico e seus produtos de degradação

3.3.1 Desenvolvimento do método

O método inicialmente utilizado para analisar o extrato de própolis e seus compostos isolados artepelin C e ácido *p*-cumárico (Machado et al., 2012) não apresentou boa resolução cromatográfica para diversos dos produtos de degradação no extrato de própolis utilizando-se o método descrito por Sousa et al (2007). Este também não forneceu seletividade para alguns dos compostos de interesse, porém percebeu-se que o uso de acetonitrila como solvente orgânico ao invés de metanol resultava em melhor separação dos compostos de degradação na própolis verde. Então, diferentes gradientes de acetonitrila e água acidificada foram avaliados quanto à seletividade cromatográfica em extratos de própolis. Modificadores de fase móvel, como ácido fórmico e isopropanol também foram investigados quanto à melhora dos parâmetros cromatográficos. Finalmente, selecionou-se como fase móvel o gradiente descrito na tabela 7, sendo B acetronitrila + 2% de isopropanol e A: água + 0.4% de ácido fórmico + 5% de metanol + 2% de isopropanol.

Tabela 7. Método desenvolvido para análise de artepelin C, ácido *p*-cumárico e seus produtos de degradação majoritários no extrato de própolis verde

	Solvente (%)	
Tempo (min)	**Acetonitrila + 2% de isopropanol (B)**	**Água Acidificada com 0,4% de ácido fórmico+5% de metanol+2% de isopropanol (A)**
0	20	80
3	20	80
4	25	75
15	25	75
20	45	55
40	45	55
45	60	40
68,83	80	20
70	20	80
80	20	80

O equipamento empregado para estas análises foi o cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência da Waters ®, com bomba binária, injetor automático, detector de arranjo de diodos e software Empower para obtenção dos dados. O volume de injeção selecionado foi 15 µL, vazão de fase móvel 1 mL/min e coluna cromatográfica Phenomenex LUNA 5 µm C18- 100, 250 X 4,6 mm com pré-coluna C18 4 X 3,0 mm.

3.3.2 Validação do método

Nos experimentos de validação, os seguintes parâmetros foram avaliados: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, recuperação e robustez. Todos os experimentos foram feitos em triplicata e todos os padrões e amostras foram solubilizados em metanol grau HPLC.

Para tais experimentos, foram seguidos os manuais disponibilizados pelo ICH (2005) e pela ANVISA (2003; 2017).

3.3.2.1 Seletividade

Como o método analítico foi desenvolvido em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa utilizando detector de arranjo de Diiodos (DAD), a seletividade foi avaliada considerando a pureza cromatográfica do sinal do analito no comprimento de onda de 300 nm e, ainda, considerando o espectro de ultravioleta dos picos cromatográficos correspondentes aos analitos no início, meio e final do pico.

A seletividade também foi estabelecida de acordo com a eficiência de separação entre os picos cromatográficos (resolução), que foi medida através da equação Rs=2(dR2-dR1)/(wb2+wb1), sendo Rs ≥ 1,25 suficiente para fins quantitativos, considerando que, quando Rs=1,0 há somente 2% de sobreposição quando as concentrações dos dois compostos são iguais. Rs acima de 1,5 indica separação completa de duas bandas cromatográficas (Collins et al., 2006).

Como padrão interno foi selecionado o veratraldeído, considerando que tal composto absorve em comprimento de onda de 300 nm, seu tempo de retenção é diferente do tempo de retenção dos analitos e dos outros compostos presentes no extrato de própolis verde. A concentração de padrão interno utilizado nas análises foi determinada como 25 µg/mL.

Também foram considerados os tempos de retenção dos compostos de interesse e os tempos de retenção relativos destes (tr do analito/tr do padrão interno).

3.3.2.2 Linearidade

Após avaliação a seletividade do método, foram preparadas diferentes soluções dos padrões em cinco concentrações e analisadas pelo método desenvolvido.

As soluções foram preparadas em triplicata a partir da diluição de três diferentes soluções estoques dos padrões, seguidas por adição do padrão interno à 25 µg/mL. Todas as soluções foram preparadas em metanol grau HPLC.

Para determinação das concentrações dos padrões nas curvas analíticas foram consideradas as faixas de trabalho de cada composto e a linearidade das respostas. As concentrações das soluções de artepelin C foram 3,6; 6,0; 24; 60 e 90

μg/mL, do ART2 e ART4 foram 6,0; 15; 42; 60 e 90 μg/mL e do ART1, ART3, ácido *p*-cumárico e seu produto de degradação (AC-1) 6,0; 24; 60; 90 e 105 μg/mL. O preparo das soluções foi realizado conforme descrito nas figuras 5, 6 e 7.

A partir dos dados obtidos destas curvas foi possível obter-se o valor do coeficiente angular da reta, que deve ser estatisticamente diferente de zero para ser considerado significativo (ANVISA, 2017) e do valor dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2) obtidos, que avaliam a linearidade do método. A ANVISA (2017) considera aceitável valores de coeficientes de correlação acima de 0,999.

As equações das retas, que permitem o cálculo das concentrações dos padrões também foram obtidas, sendo estimadas a partir do método dos mínimos quadrados. Obtiveram-se também as representações gráficas de cada curva analítica, que mostram a reposta analítica obtida em função da concentração do analito.

Além disso, para confirmação da homocedasticidade dos dados, o gráfico de dispersão dos resíduos e seus valores máximos e mínimos também foram obtidos.

As curvas analíticas, os dados obtidos e análises estatísticas foram feitas utilizando-se o software Statistica ®.

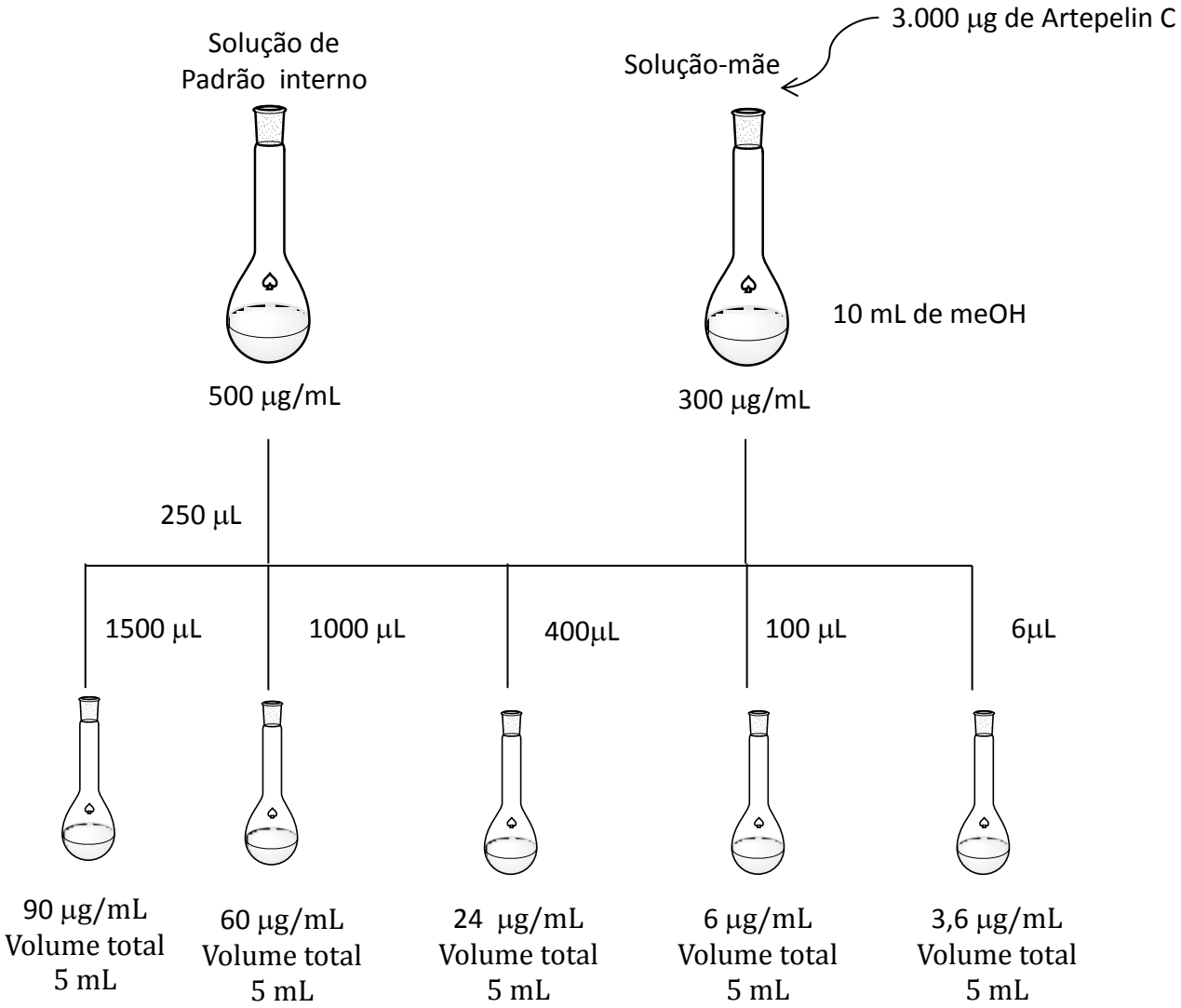


Figura 5. Preparo das soluções empregadas na confecção da curva analítica do artepelin C

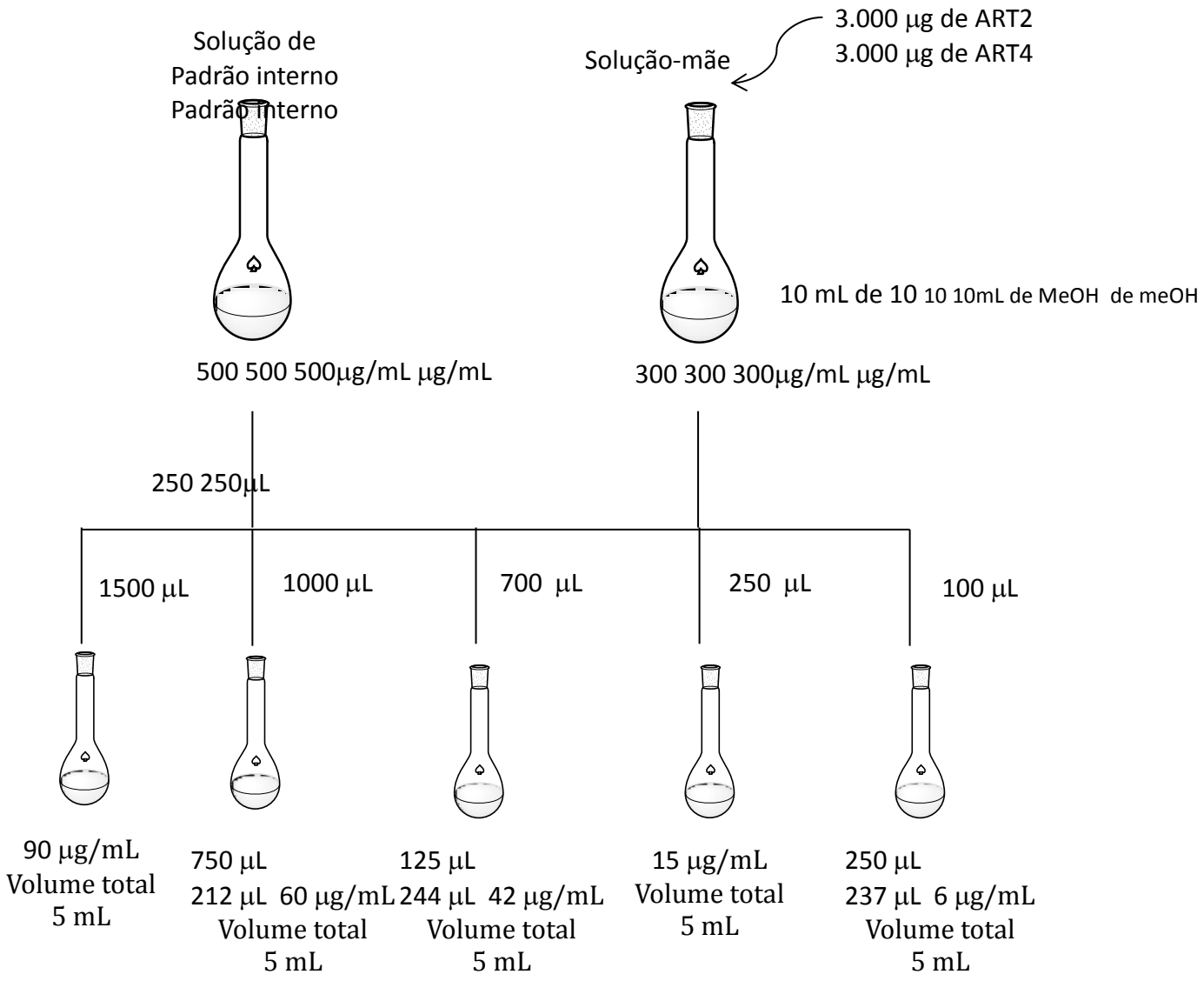


Figura 6. Preparo das soluções empregadas na confecção das curvas analíticas do ART2 e ART4

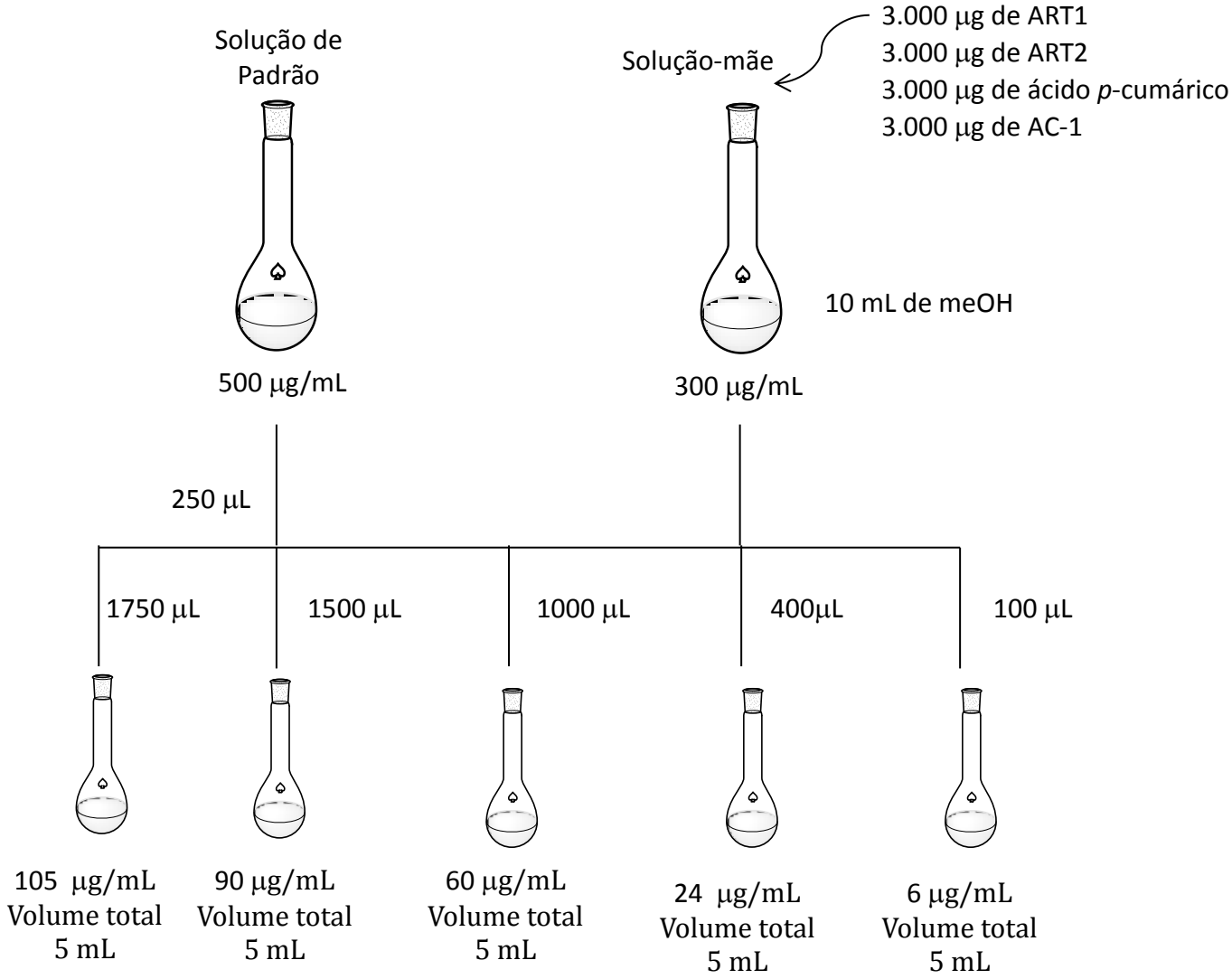


Figura 7. Preparo das soluções empregadas na confecção das curvas analíticas do ART1, ART2, ácido *p*-cumárico e AC-1.

3.3.2.3 Limites de detecção e quantificação

Através da curva analítica, utilizando-se o ponto de intersecção dos eixos, quando x=0, e a inclinação da curva, pode-se calcular uma estimativa dos limites de detecção e quantificação através das equações: $LD = \frac{3{,}3*\sigma}{\mathrm{IC}}$ e $LQ = \frac{10*\sigma}{\mathrm{IC}}$, respectivamente, sendo IC a inclinação da curva analítica e σ o desvio padrão do intercepto com o eixo Y de três curvas analíticas.

Tendo o objetivo de se confirmar tais limites, foram construídas novas curvas analíticas contendo cinco pontos abaixo da menor concentração das curvas analíticas, sendo estes 6,0; 3,6; 2,4; 1,2 e 0,36 (figura 8). Para se avaliarem os limites de quantificação, foram consideradas as menores concentrações de cada composto que podem ser calculadas com precisão e exatidão. Para os limites de detecção, as menores concentrações de cada analito que podem ser distinguidas da linha de base.

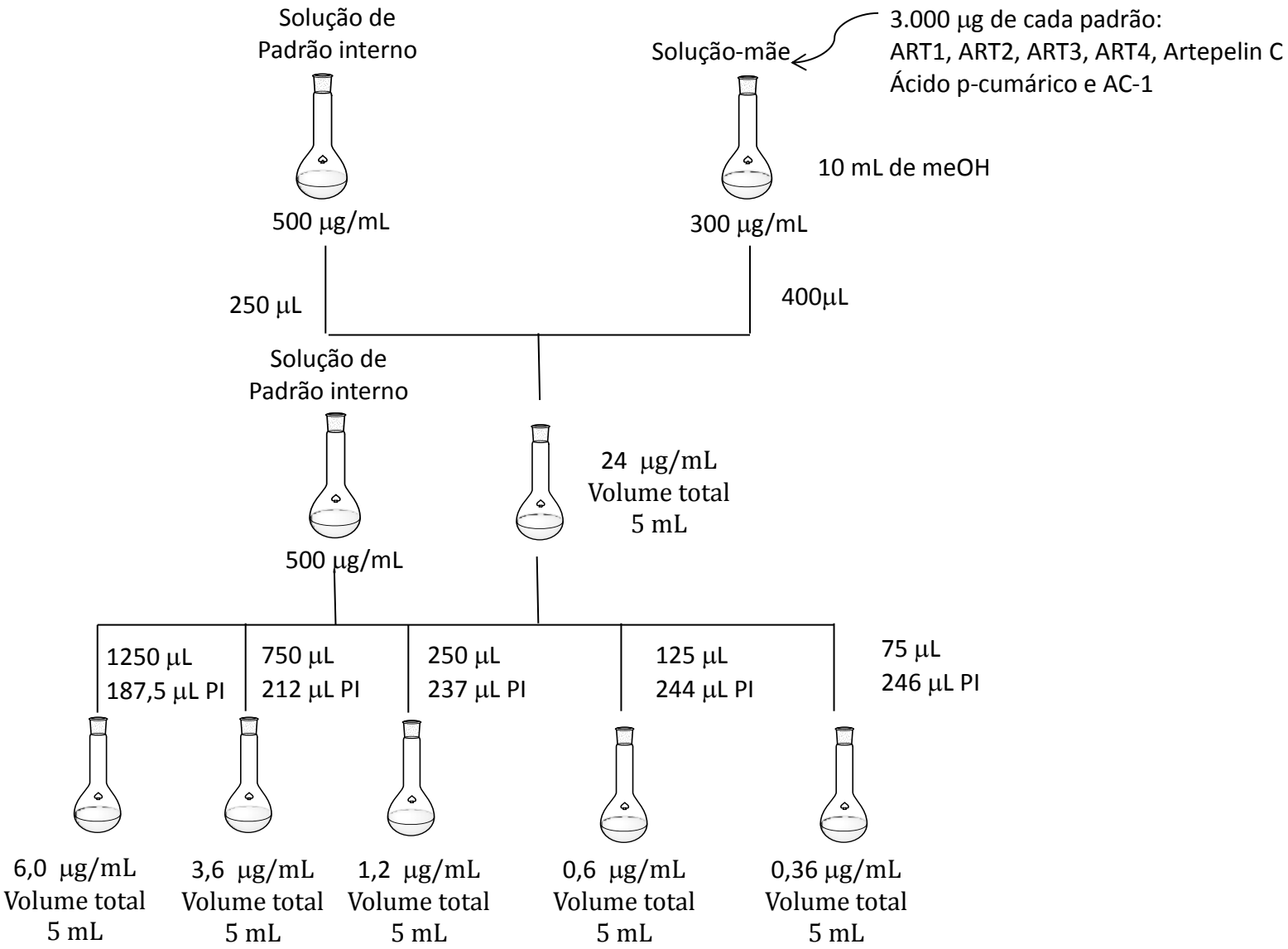


Figura 8. Preparo das soluções empregadas para se avaliarem os limites de detecção e quantificação do artepelin C, do ácido *p*-cumárico e de seus produtos de degradação ART1, ART2, ART3, ART4 e AC-1.

3.3.2.4 Precisão e Exatidão

A precisão do método foi avaliada através da repetitividade dos resultados das análises dos padrões em três diferentes concentrações dentro da faixa linear de trabalho, sendo estas nos níveis alto (60 μg/mL), médio (42 μg/mL para o artepelin C e ART2; e 24 μg/mL para os outros compostos) e baixo (6 μg/mL).

Para medir-se a precisão foram consideradas a proximidade entre o Desvio Padrão Relativo (DPR) dos resultados obtidos de três análises realizadas no mesmo dia para a precisão intra-dias e em três dias consecutivos para a precisão inter-dias (ou precisão intermediária). Os resultados das análises levaram em conta a razão da área do pico cromatográfico de cada padrão e da área do pico cromatográfico do padrão interno a 25 μg/mL.

As soluções para avaliação da precisão foram preparadas conforme a figura 9.

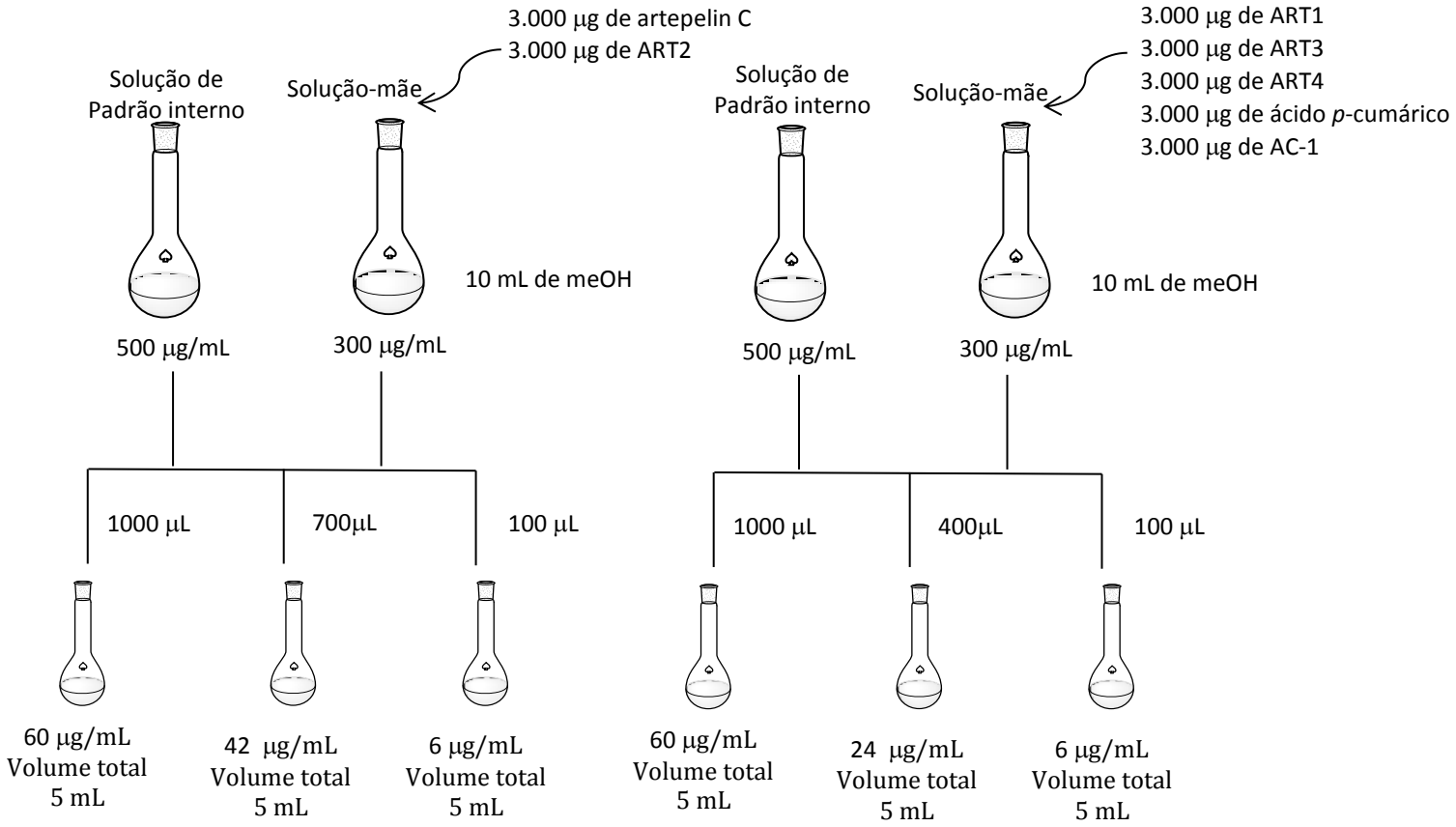


Figura 9. Preparo das soluções para os ensaios de precisão do método analítico

As mesmas soluções utilizadas nos experimentos de precisão foram empregadas para se avaliar a exatidão do método analítico. Foram comparados os valores teóricos e reais das concentrações e calculou-se a exatidão do método nos níveis alto, médio e baixo da faixa linear de trabalho.

3.3.2.5 Recuperação

Em virtude do uso de um método de extração para obterem-se as amostras de extrato de própolis verde que foram utilizadas nos estudos de estabilidade, foi avaliada também a recuperação deste método: para isso, 100 μL de soluções dos padrões a 105, 60 e 30 μg/mL (níveis alto, médio e baixo, respectivamente) foram adicionados a 2.5 mg de própolis verde bruta pulverizada.

Após, o solvente foi evaporado e, então 1 mL de uma solução metanólica de padrão interno na concentração de 25 μg/mL foi adicionada à própolis bruta e a amostra foi deixada em maceração por 1 h à temperatura ambiente. Filtrou-se o extrato metanólico. Tal processo foi repetido três vezes, seguido por análise utilizando-se o método analítico desenvolvido em CLAE de fase reversa (figura 10).

As concentrações das amostras foram comparadas à concentração do controle (extrato de própolis verde sem adição dos padrões) e calculou-se a porcentagem de recuperação em relação à concentração teórica.

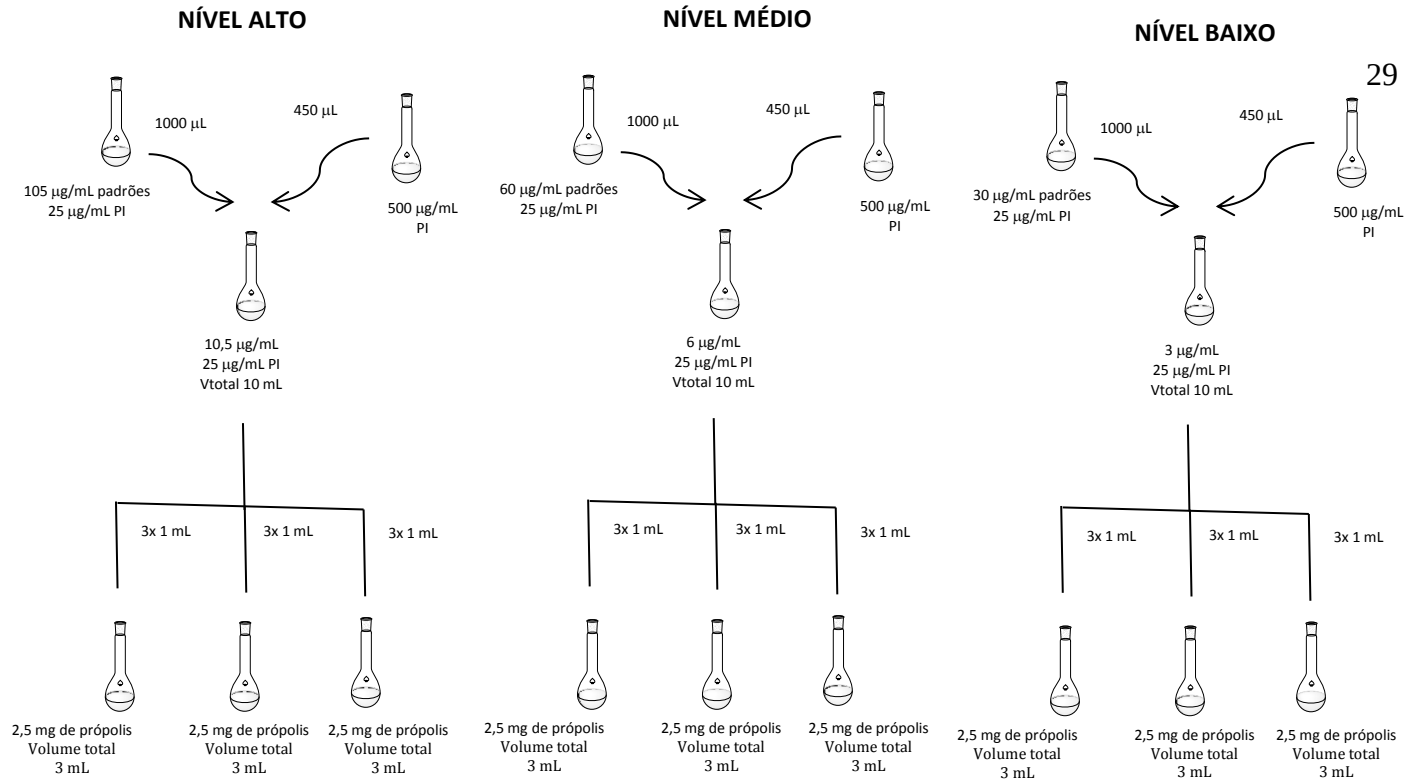


Figura 10. Preparo das soluções para avaliação da recuperação do método de extração nos níveis alto, médio e baixo.

3.3.2.6 Robustez

Para avaliação da robustez do método, o *design* de Plackett–Burman foi selecionado. Através dele, é possível se avaliarem pequenas variações em relação aos fatores determinados em níveis de (+1) e (-1), sendo os valores desses limites individualizados (Heyden et al, 2001; Moreira et al., 2013).

Os fatores e níveis investigados no teste de robustez e a tabela contendo o esquema do *Design* experimental de Plackett–Burman para sete fatores e oito experimentos estão nas tabelas 8 e 9, respectivamente. Os cálculos do efeito de cada fator, tanto em relação ao tempo de retenção relativo (trr), quanto em relação à razão entre área do padrão e área do padrão interno foram feitos através da equação: $Ex = \frac{\sum y(+) - \sum y(-)}{n/2}$. O coeficiente de variação em porcentagem também foi calculado para melhor interpretação dos efeitos. Estes experimentos foram executados em três diferentes concentrações: em nível alto, intermediário e baixo da curva analítica, sendo estes em 6, 42 e 90 µg/mL.

Tabela 8. Fatores e níveis investigados nos experimentos de robustez do método

Fatores	Abreviação	Unidades	Limites	Nível (-1)	Nível (+1)	Nominal
Comprimento de onda do detector	λ	nm	± 5	295	305	300
Temperatura da coluna	Temp.	^{o}C	± 5	25	35	30
Volume de amostra injetado	Inj.	µL	± 0,5	14,5	15,5	15
Vazão da fase móvel	Vaz.	mL/min	± 0.05	0.95	1.05	1.0

Tabela 9. Condições dos experimentos de robustez do método

	Fatores				Resposta
Exper. nº	**λ**	**Temp.**	**Inj.**	**Vaz.**	***y***
1	+1	+1	+1	-1	*y1*
2	-1	+1	+1	+1	*y2*
3	-1	-1	+1	+1	*y3*
4	+1	-1	-1	+1	*y4*
5	-1	+1	-1	-1	*y5*
6	+1	-1	+1	-1	*y6*
7	+1	+1	-1	+1	*y7*
8	-1	-1	-1	-1	*y8*

3.4 Ensaios de estabilidade do artepelin C e do ácido *p*-cumárico

3.4.1 Determinação dos principais fatores responsáveis pela degradação do artepelin C e do ácido *p*-cumárico

Inicialmente, avaliaram-se os efeitos de luz, temperatura e oxigênio do ar na degradação do artepelin C e do ácido *p*-cumárico através de *Design* Experimental de Box, Hunter & Hunter.

Os fatores foram avaliados em dois níveis, sendo estes presença ou ausência, exceto para temperatura (nível alto: 40 ºC, nível baixo: -18 ºC). O *Design* foi obtido com auxílio do software Statistica® versão 8.0.

Em cada experimento, 50 µg de cada composto isolado foram colocados em frascos de vidro transparente e armazenados segundo as condições de luz, temperatura e oxigênio determinadas pelo *Design* experimental (tabela 10). Os

experimentos foram executados em quatro lotes, sendo estes em tempos de 7, 14, 21 e 30 dias.

Para incubação dos compostos nas condições especificadas para cada experimento, os frasquinhos de vidro contendo as amostras foram colocados em recipientes feitos de alumínio, redondos e com altura de 15 cm com total vedação. A lâmpada utilizada foi uma luz fria (luz do dia) da marca Taschibra® LED 500 lumens, 6W 6500K, eficiência luminosa 83 lm/W. Nos experimentos sem a presença de oxigênio do ar, foi adicionado nitrogênio a cada frasquinho, que foram então fechados com tampa de alumínio e selados com parafina. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

As amostras foram analisadas pelo método validado, que foi empregado para quantificação do artepelin C, do ácido *p*-cumárico e dos produtos de degradação isolados anteriormente.

Tabela 10. Design Experimental de Box, Hunter & Hunter para três fatores

Experimento	**Luz**	**Temperatura**	**Oxigênio**
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1

3.4.2 Otimização das condições de armazenamento do artepelin C, do ácido *p*-cumárico e da própolis verde

Após a determinação dos fatores responsáveis pela degradação do artepelin C e do ácido *p*-cumárico, com o objetivo de se estabelecer a condição ótima de armazenamento da própolis verde, foi empregado outro *Design* experimental, o Central rotacionado (*Central Composite Design*). Foram selecionados dois fatores experimentais, sendo estes a temperatura (X_1) e o tempo (X_2).

Para se estabelecer o número de experimentos (N), o *Design* Experimental Central Rotacionado utiliza a equação $N = 2k(k-1) + C_0$, onde k corresponde ao número de fatores e C_0 ao número de pontos centrais. Portanto, um total de 10

experimentos foram conduzidos em um único bloco. X_1 e X_2 foram avaliados nos níveis baixo, médio e alto, sendo estes -10, 20 e 40ºC, respectivamente, para X_1; e 10, 20 e 30 dias, respectivamente, para X_2. Além disso, dois “star points” foram avaliados para cada fator (-α e +α, com rotatabilidade 1,414 (Arruda et al., 2019)), sendo estes -20 ºC e 50 ºC para X_1 e 6 e 34 dias para X_2. O puro erro foi determinado utilizando-se quatro replicatas.

De acordo com Albuquerque et al (2017), a equação polinomial de segunda ordem $Y = \beta_0 + \sum \beta_i \chi_i + \sum \beta_{ii} \chi_i^2 + \sum \beta_{ij} \chi_i \chi_j$ explica a metodologia de superfície de resposta dos Designs experimentais, onde Y corresponde à resposta e β_0, β_i, β_{ii} e β_{ij} aos coeficientes nos modelos constante, linear e quadrático; e as interações entre os coeficientes, respectivamente. Xi e Xj representam as variáveis independentes.

As equações e outros parâmetros estatísticos, como o coeficiente de determinação (R) e a adequação ao modelo pelas análises de falta de ajuste (“lack of fit”) foram obtidos através do software Statistica ®. Para a determinação da melhor condição de armazenamento e transporte, foi utilizada a função de desejabilidade no Statistica ®: as concentrações de artepelin C e de ácido *p*-cumárico variaram de indesejáveis (0,0) a desejáveis (1,0), sendo estas as menores e maiores concentrações experimentais, respectivamente.

Nestes experimentos, as amostras (ambos os compostos puros e a própolis bruta) foram protegidas da luz e avaliadas quanto à sua estabilidade expondo-se 50 μg dos compostos puros e 2,5 mg de própolis às condições determinadas em cada experimento (tabela 11). Após, a própolis verde foi submetida ao processo extrativo descrito na subseção de recuperação. As amostras foram então analisadas pelo método desenvolvido e validado em CLAE de fase reversa.

Tabela 11. *Design* Experimental Central rotacionado para dois fatores em três níveis

	Temperatura (ºC)	Tempo
1	-10	10
2	-10	30
3	40	10
4	40	30
5	-20	20
6	50	20
7	15	6
8	15	34
9 (C)	15	20
10 (C)	15	20

3.4.3 Estabilidade Prolongada

Após estabelecidas as condições ótimas de transporte e armazenamento do artepelin C e ácido p-cumárico puros e na própolis verde, verificou-se se estas condições eram também ótimas a longo prazo. Para tanto, 50 μg de cada composto puro e 2,5 mg de própolis foram colocados em pequenos frascos de vidro, protegidos da luz com papel alumínio e armazenados em freezer com temperatura aproximada de -10ºC pelos períodos de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 meses.

Então, a própolis foi submetida à extração previamente descrita e analisada pelo método desenvolvido e validado em CLAE-FR. As amostras contendo os compostos puros também foram analisadas. Foi quantificada então a porcentagem de perda durante tal período.

3.5 Ensaios biológicos

Os ensaios de atividade antimicrobiana, citotóxica e antiparasitária foram realizados na Universidade de Franca em colaboração com o Profº Dr. Carlos Henrique Gomes Martins, com a Profª Dra. Raquel Alves dos Santos e com a Profª Dra. Lizandra Guidi Magalhães, respectivamente.

Os micro-organismos utilizados foram bactérias bucais, sendo estas *S. mutans, S. mitis, S. sobrinus, S. sanguinis, S. salivarius, L. casei* e *E. faecalis;* os parasitas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/PH8) e as linhagens celulares AGP-01, He-La e CHO-K1 (experimentos realizados com células entre a 3ª e 8ª passagens).

3.5.1 Atividade antimicrobiana

Os micro-organismos empregados nestes estudos pertencem à “American Type Culture Collection” (ATCC) e foram mantidos sob criopreservação à -80 ºC na coleção do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LaPeMA) na Universidade de Franca.

Foi avaliada a atividade antibacteriana contra os micro-organismos bucais *Streptococcus mutans* ATCC 25275, *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478, *Streptococcus mitis* ATCC 49456, *Lactobacillus casei* ATCC 11578, *Streptococcus salivarius* ATCC 25975, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556 e *Enterococcus faecalis* ATCC 4082. Para tanto, foram efetuados ensaios que avaliam a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).

A metodologia empregada é baseada em manuais do CLSI 2007 e 2009 e foi descrita por Bardají et al. (2016). Para determinação da concentração inibitória mínima foi utilizado o método de microdiluição em microplaca e para a preparação dos inóculos e realização dos ensaios foram utilizadas bactérias de crescimento de 24 h em meio BHI (Brain Heart Infusion). Os inóculos foram padronizados em 5×10^5 Unidades Formadoras de Colônica (UFC)/mL.

Para tais estudos, as amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (1,6 mg de cada composto em 40 μL de DMSO) e caldo BHI (960 μL). A concentração de DMSO no meio foi igual a 4% e esta mesma solução de meio + DMSO a 4% foi utilizada como controle negativo.

Após a preparação do meio contendo as amostras a serem testadas, com uma alça de platina estéril, as culturas de bactérias foram transferidas para tubos com 10 mL de solução salina estéril. Com o objetivo de se obter a concentração de micro-organismos 5×10^5 UFC/mL, padronizou-se a suspensão através da comparação da turbidade desta com um tubo de uma solução com turbidez 0,5 na escala de Mc Farland (0,1 mL de $BaCl_2$ 1% + 9,9 mL de H_2SO_4 a 1%. Então, as suspensões de bactérias foram diluídas para se obter uma concentração final de inóculo 5×10^5 UFC/mL.

Em microplacas foram depositados 100 μL de caldo BHI contendo o inóculo e 100 μL das soluções dos compostos a serem testados. Foram feitas diluições seriadas, obtendo-se os compostos em concentrações entre 400 e 0,195 µg/mL, com o volume final de 100 µL em cada poço. Dicloroidrato de clorexidina foi utilizado como controle positivo e somente o meio + solvente como controle negativo para a avaliação das culturas bacterianas. Foram realizados os controles de esterilidade do caldo, das amostras e dos padrões, bem como os controles de crescimento das culturas. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa bacteriológica por 24 h.

Após o tempo de incubação foram adicionados 30 µL de resazurina em cada poço, na concentração de 0,02% em solução aquosa. Para a realização da leitura observou-se a mudança de coloração da mesma através de uma reação de oxiredução. Neste ensaio também foi determinado o efeito bactericida ou bacteriostático das amostras, retirando-se uma alíquota de cada poço antes da adição da resazurina e incubando-se novamente em meio BHI por mais 24 h.

3.5.1 Atividade antiparasitária

3.5.1.1 Atividade leishmanicida contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*

3.5.1.1.1 Triagem da atividade leishmanicida contra promastigotas de *L. amazonensis*

Inicialmente foi feita uma triagem com o extrato de própolis verde, artepelin C, ácido *p*-cumárico e compostos de degradação majoritários. A concentração das amostras utilizada na triagem foi 50 µM para os compostos isolados e 50 µg/mL para o extrato de própolis verde.

Nestes ensaios, as formas promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco) enriquecido com 10% de soro bovino fetal (Cutilab) e 1% de penicilina 10.000 UI/mL + estreptomicina 10 mg/mL (Cutilab), de pH igual a 7,4 a 25 ºC em estufa BOD (Quimis) durante cinco dias, no qual inicia-se a fase estacionária. Após este período, 1 x 10^6 parasitas foram adicionados aos pocinhos de placa de 96 poços contendo o meio de cultura.

Para avaliação do efeito leishmanicida das amostras, estas foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionadas nas concentrações de 50 µM ou 50 µg/mL aos pocinhos que continham os parasitas. As placas de 96 poços foram incubadas por 24 h a 25 ºC em estufa BOD (Quimis) e a inibição do crescimento dos parasitas foi avaliada através da contagem de parasitas vivos por contagem em câmara de Neubauer (Global Glass), considerando-se a motilidade flagelar. Anfotericina B (Eurofarma) a 1 µg/mL foi utilizada como controle positivo e o meio RPMI 1640 + 0,1% de DMSO como controle negativo.

Os resultados foram expressos em porcentagem de lise em comparação ao controle negativo. As amostras que demonstraram porcentagem de lise acima de 50% foram utilizadas nos experimentos seguintes.

3.5.1.1.2 Determinação da concentração inibitória de 50% (CI_{50}) das formas promastigotas de *L. amazonensis*

As amostras que inibiram mais de 50% dos parasitas vivos na triagem da atividade leishmanicida contra as formas promatigotas foram avaliadas em menores concentrações: os parasitas foram cultivados como descrito na seção anterior e por volta de 1 x 10^6 promastigotas foram adicionadas aos pocinhos de placas de 96 poços. As amostras, dissolvidas em DMSO, foram adicionadas aos poços em cinco diferentes concentrações, sendo estas 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 μM por diluição seriada.

As placas de 96 poços contendo as amostras e parasitas foram então incubadas por 24 h a 25 ºC em estufa BOD (Quimis) e após, a quantidade de parasitas vivos foi determinada como feito na triagem, por contagem em câmara de Neubauer considerando-se a motilidade flagelar. Anfotericina B (Eurofarma) a 1 μg/mL foi utilizada como controle positivo e o meio RPMI 1640 + 0,1% de DMSO como controle negativo. Assim como na triagem, os resultados foram apresentados como a porcentagem de lise em comparação com o controle negativo. Os experimentos foram feitos em triplicata.

As concentrações que foram capazes de inibir 50% do crescimento dos parasitas (CI_{50}) foram determinadas através de curvas de regressão não-linear obtidas pelo software *GraphPad Prism* 5.0.

3.5.1.2 Avaliação *in vitro* contra as formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*

Após avaliação do efeito das amostras em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, os compostos que demonstraram efeito significativo foram também testados contra as formas amastigotas, que são as formas intracelulares deste parasita.

Então, primeiramente cultivaram-se promatigotas de *L. amazonensis*: 5 x10^6 promastigotas foram incubadas por 24 h a 33 ºC em estufa BOD (Quimis). Estas foram cultivadas em 10 mL de meio RPMI 1640 (Gibco) enriquecido com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) e 1% de penicilina 10.000 UI/mL+ estreptomicina (10 mg/mL) em pH ácido (5,5).

Para a obtenção de células de macrófagos, 500 μL de tioglicolato de sódio 3% (Biolog) foram administrados a camundongos Balb/c intraperitonealmente. Após 72 h, 5 mL de tampão fosfato salina gelado foram utilizados para lavar o peritônio destes animais. A suspensão de células obtida foi centrifugada em tubo Eppendorf a 1000 rpm durante 10 min a 4 ºC. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados o meio RPMI 1640 gelado (10 mL) enriquecido com soro bovino fetal (10%) e penicilina 10.000 UI/mL+ estreptomicida 10 mg/mL .

Em seguida, 2 x 10^5 macrófagos/mL foram adicionados aos pocinhos de placa de 24 poços que continham lamínulas de formato circular (13 mm) e meio RPMI 1640 enriquecido. Os macrófagos foram incubados por 24 h a 37 ºC com atmosfera de 5% de CO_2. Então, 2 x 10^6 promastigotas/mL foram adicionadas aos poços que continham os macrófagos e reincubadas por mais 4 h a 37 ºC com atmosfera de $C0_2$ a 5%.

As células de *L. amazonensis* que não foram capazes de infectar os macrófagos foram removidas e novo meio de cultura foi acrescentado aos poços. As amostras (artepelin C, ART4, ácido *p*-cumárico e AC-1) foram adicionadas aos poços nas concentrações de 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 μM. Como controle positivo foi utilizada a anfotericina B a 1 μg/mL e como controle negativo o meio RPMI1640 com 1% de DMSO. As placas contendo as células infectadas e as amostras foram incubadas por 48 h a 37 ºC e 5% de CO_2.

As lamínulas foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa. Contou-se o número de amastigotas em 100 células aleatórias de cada lamínula e, através de comparação com os controles positivo e negativo, determinou-se a porcentagem de morte. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

Determinou-se o CI_{50} através de curvas de regressão não-linear utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0.

3.5.2 Atividade citotóxica

3.5.2.1 Ensaios de viabilidade celular

Para os ensaios de avaliação da atividade citotóxica das amostras foram empregadas as linhagens AGP-01, HeLa e CHO-K1, sendo as duas primeiras linhagens de células tumorais (células gástricas e cervicais, respectivamente) e a última de células normais (células de ovário de hamster chinês). Os experimentos foram feitos com células entre a terceira e oitava passagens. As células foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e armazenadas em nitrogênio líquido até o uso.

Dois dias antes dos ensaios, 3x 10^5 células foram tratadas com 0.15% tripsina e 0.08% EDTA em tampão fosfato salino (PBS) e transferidas para frascos de cultura de células contendo 5 mL de meio, sendo este o meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium Salts) completo suplementado com mistura de nutrientes F10 (1:1), soro bovino fetal (10%), penicilina e estreptomicina a 100 μg/mL. O cultivo foi feito a 37 ºC em atmosfera de CO_2 a 5%.

Então, as células foram transferidas para placas de 96 poços e cultivadas nas mesmas condições por mais um dia. O meio foi removido dos poços e as amostras, após dissolvidas no meio + DMSO (0.1%) a 100, 10, 1 e 0.6 μM, foram adicionadas a cada poço, em triplicata. Como controle positivo, foi empregado DMSO a 10% e como controle negativo o meio de cultura.

Após 24 h de incubação, foi realizada coloração das células com sulforrodamina B: removeu-se o meio dos pocinhos e fixaram-se as células com 50 μL de ácido tricloroacético a 10% a temperatura de 4 ºC por uma hora. Então, as células foram lavadas cinco vezes com água destilada e secas.

Foram adicionados 50 μL de uma solução de sulforrodamina B (0.4% em ácido acético 0.1% em água) a cada poço e as placas foram incubadas por 30 min. Após lavagem com ácido acético 1%, 150 μL de tampão Tris (10 mM) foram adicionados a cada poço e passados 15 min, a absorbância foi medida em leitor de ELISA (Bio-Tek FL-600 Microplate Fluorescence Reader) a 550 nm.

Foi também utilizado o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software, USA) para cálculo dos valores de IC_{50}.

3.5.2.2 Ensaios de Sobrevivência clonogênica

Além dos ensaios de citotoxidade, foram realizados também os de sobrevivência clonogênica do artepelin C e ART4 utilizando-se a linhagem celular de câncer gástrico AGP-01.

Empregou-se o protocolo descrito por Cunha et al (2016): 500 células foram transferidas para placas de seis poços contendo 3 mL de meio de cultura completo. As células foram incubadas por 4 h.

Posteriormente, os compostos foram adicionados aos pocinhos contendo as células nas concentrações de 30, 15 e 7,5 μM (Artepelin C) e 20, 10 e 5 μM (ART4) e estas foram reincubadas por mais 24 h. Então, o meio foi substituído por um novo e as placas foram incubadas por 10 dias a 37 ºC, 5% de CO_2.

As colônias de células foram fixadas com metanol, ácido acético e água na proporção de 1:1:8 (v/v/v) e coradas com Giemsa 5% em tampão fosfato Sorensen (pH 6.8). Estas foram então comparadas ao controle negativo pelo teste T, considerando-se estatisticamente os tratamentos com valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento do artepelin C

Após o fracionamento do extrato diclorometânico da própolis verde por cromatografia em coluna aberta, conforme descrito em materiais e métodos, as frações com perfis cromatográficos semelhantes, conforme observado nas análises por cromatografia em camada delgada, foram reunidas. As frações, nas quais se observou a presença de artepelin C, foram também analisadas por CLAE de fase reversa utilizando-se o método descrito por Machado et al (2012).

A massa de cada fração está descrita na tabela 12 e os cromatogramas do padrão de artepelin C e das frações de 1 a 8 em 275 nm nas figuras 11, 13, 14, 16, 18, 20, 22, 24 e 25, respectivamente. Além de se compararem os tempos de retenção, compararam-se também os espectros de UV dos compostos presentes nas frações com tempo de retenção semelhante ao do padrão autêntico.

Tabela 12. Reunião das frações com perfis cromatográficos semelhantes e suas respectivas massas

Frações finais	Frações iniciais reunidas	Massa (g.)
1	1-14	4,09
2	15-19	5,09
3	20-26	4,56
4	27-31	1,86
5	32-40	1,20
6	41-47	0,87
7	48-65	2,14
8	66-104	6,41
9	105-143	9,57
10	144-149	0,75
11	150-189	9,83
12	190-209	2,51
13	210-234	3,02
14	235-236	2,38

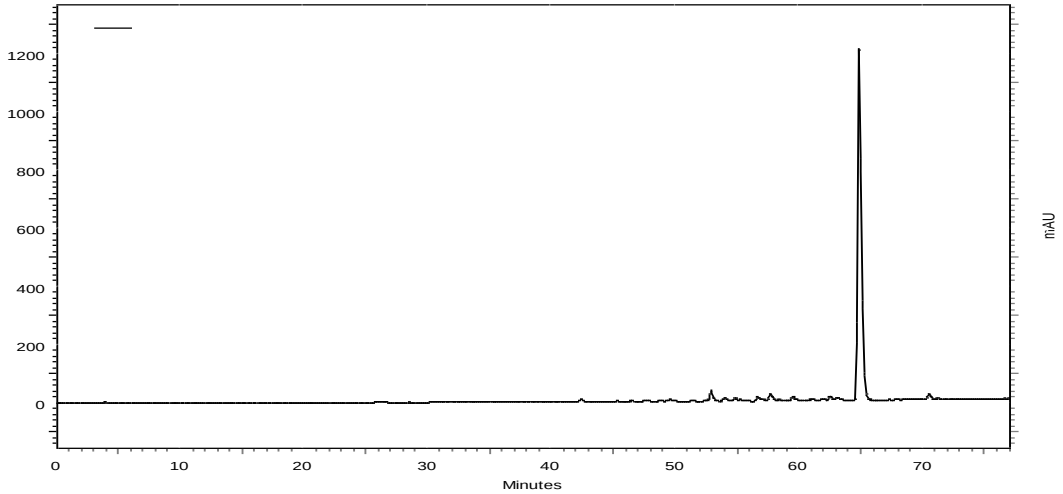


Figura 11. Cromatograma do padrão autêntico de artepelin C em 275 nm obtido por análise por CLAE-FR

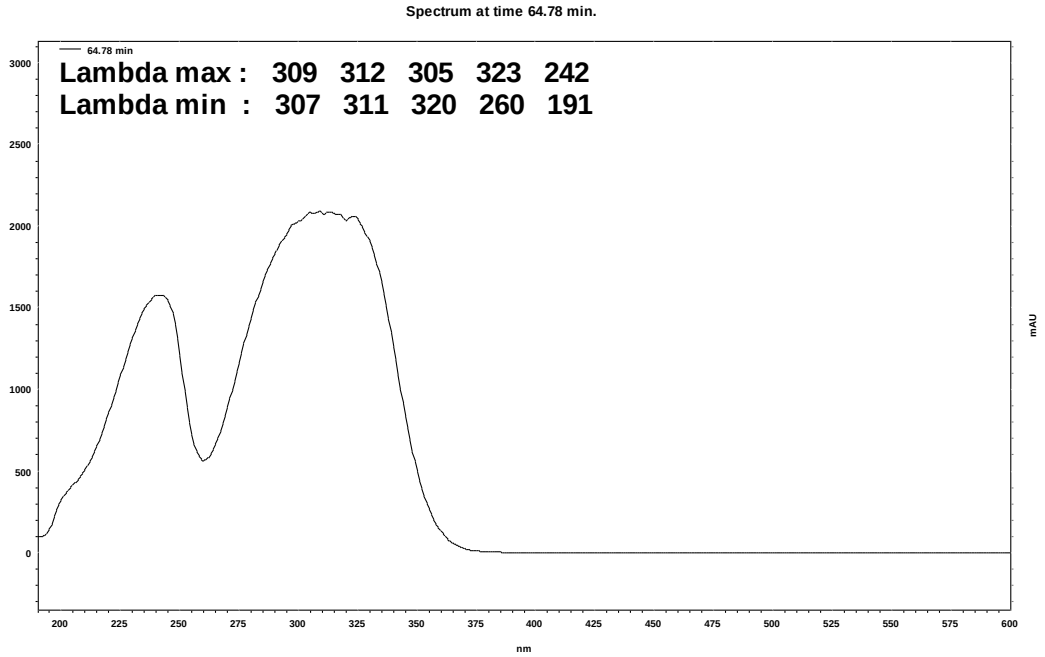


Figura 12. Espectro de UV do padrão de artepelin C obtido por detector DAD

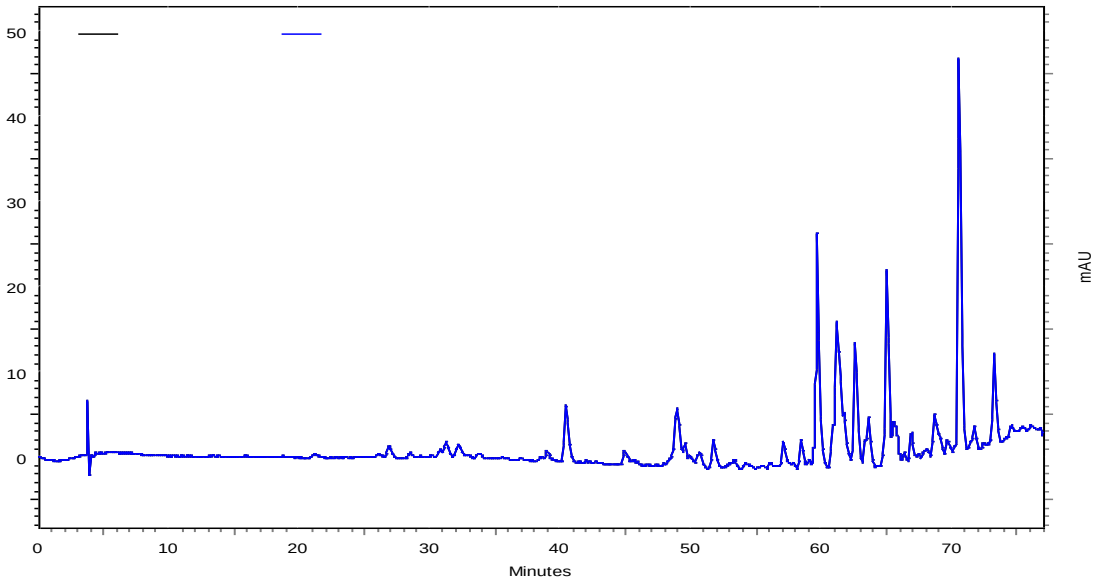


Figura 13. Cromatograma da fração final1 obtido através de análise por CLAE-FR a 275 nm

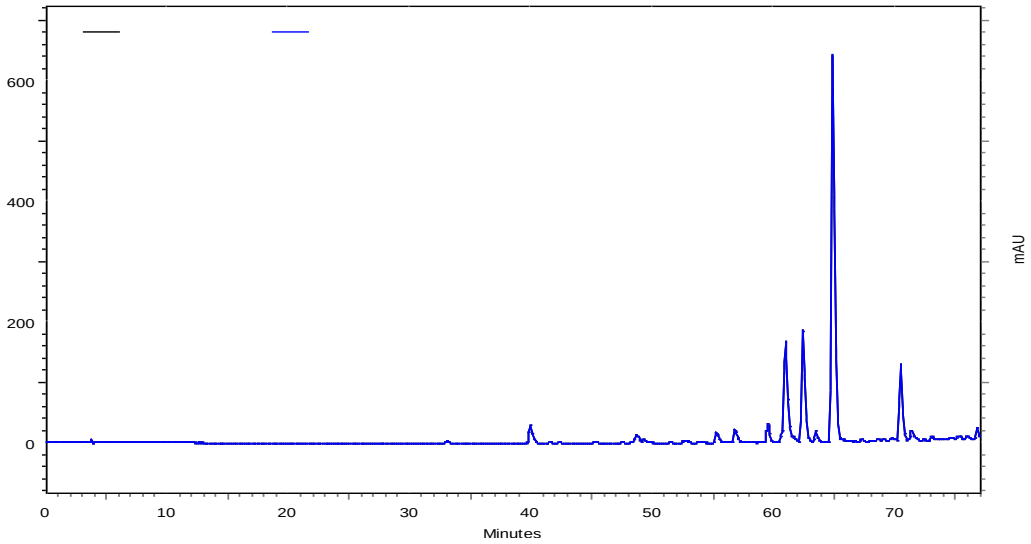


Figura 14. Cromatograma dafração final 2 obtido através da análise desta por CLAE de fase reversa a 257 nm

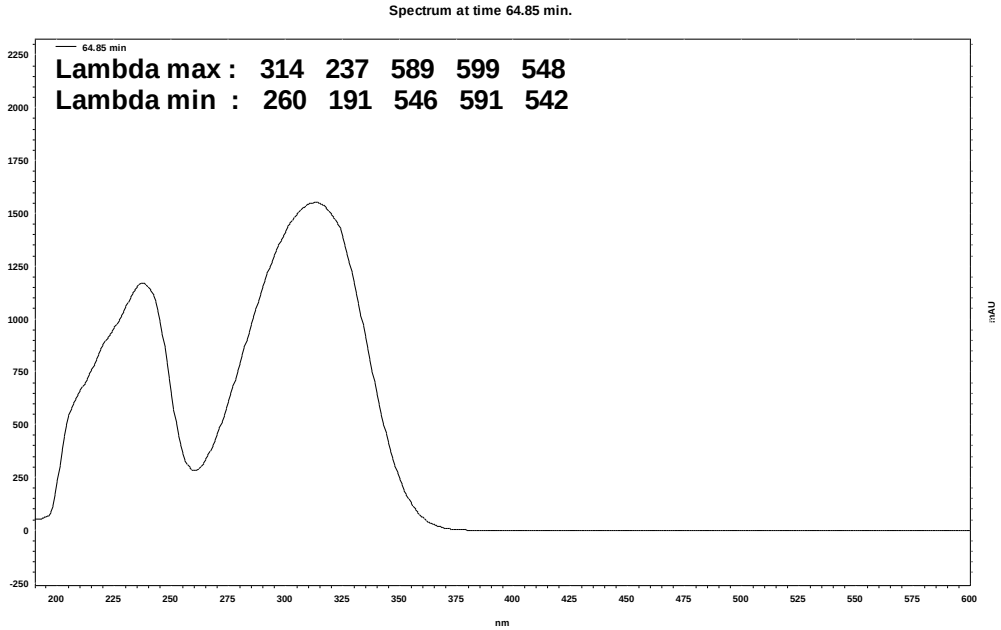


Figura 15. Espectro de UV do composto presente na fração final 2 e eluído em 64.85 min.

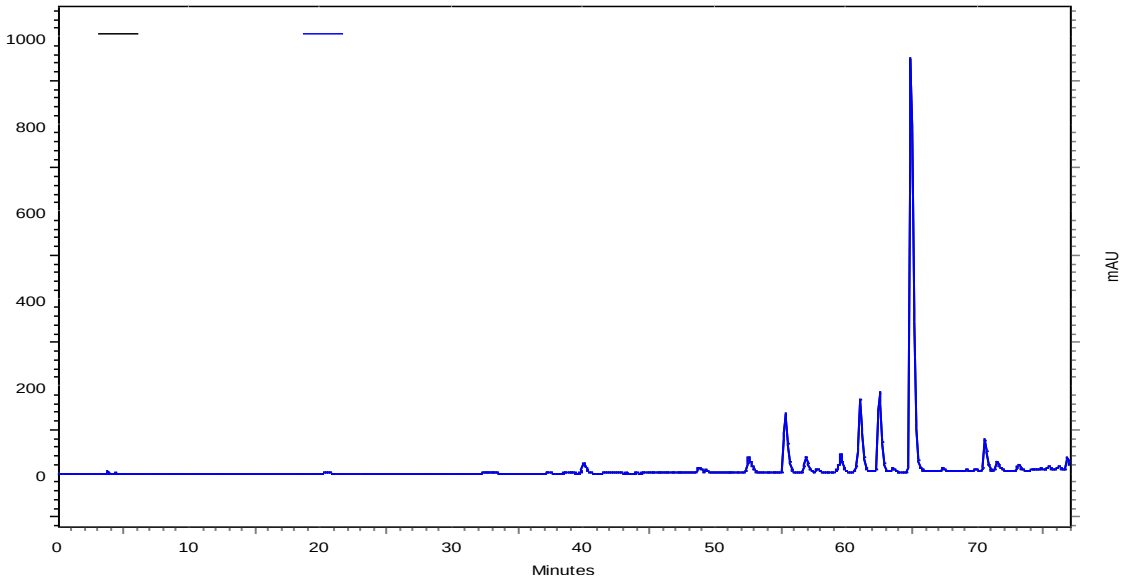


Figura 16. Cromatograma da fração final 3 obtida através de análise de CLAE de fase reversa

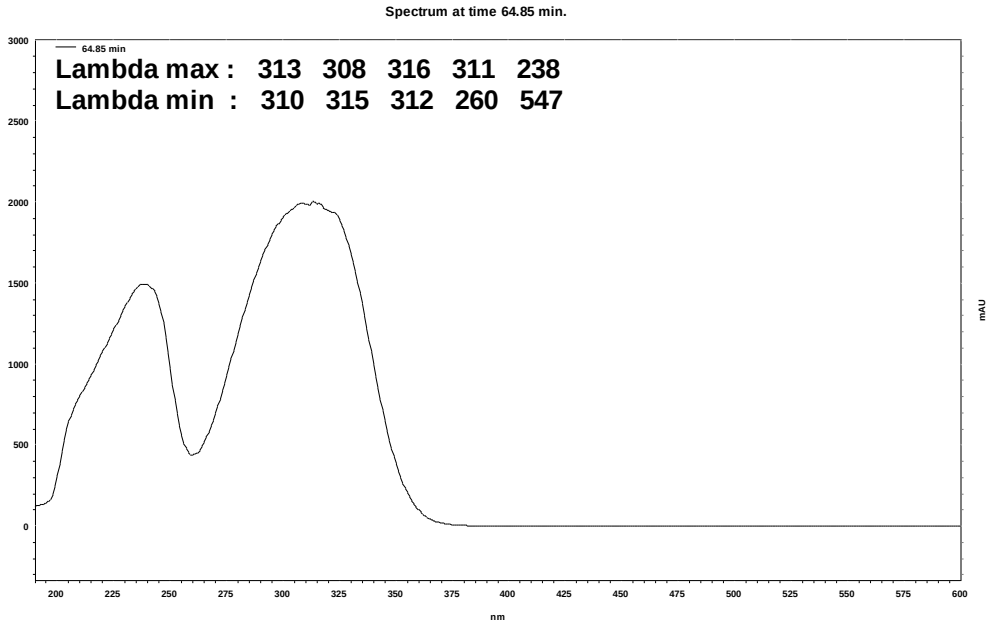


Figura 17. Espectro de UV do composto presente na fração final 3 e eluído em 64.85 min.

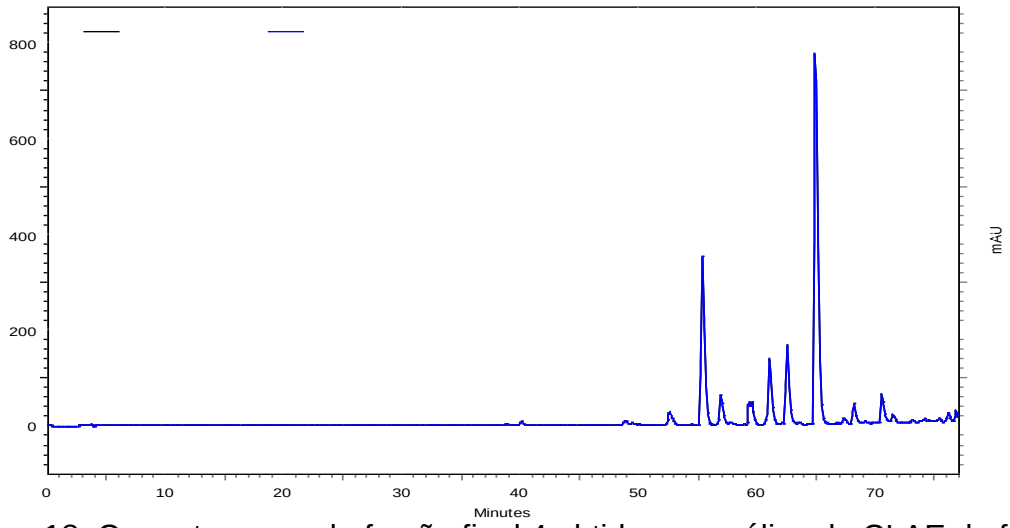


Figura 18. Cromatograma da fração final 4 obtida por análise de CLAE de fase reversa a 275 nm

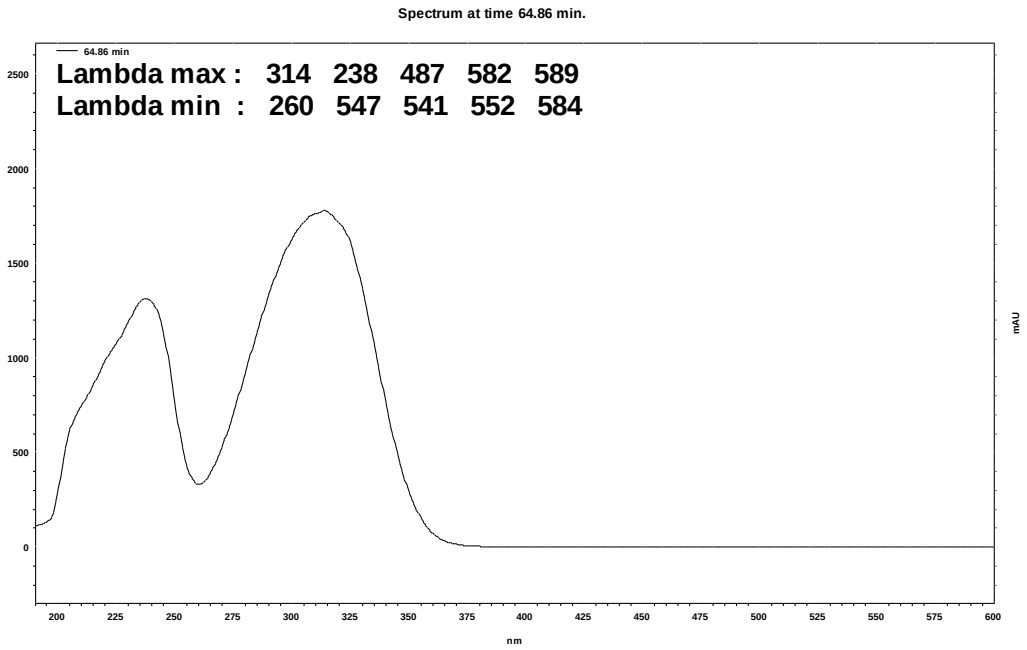


Figura 19. Espectro de UV do composto presente na fração final 4 eluído após 64.86 min.

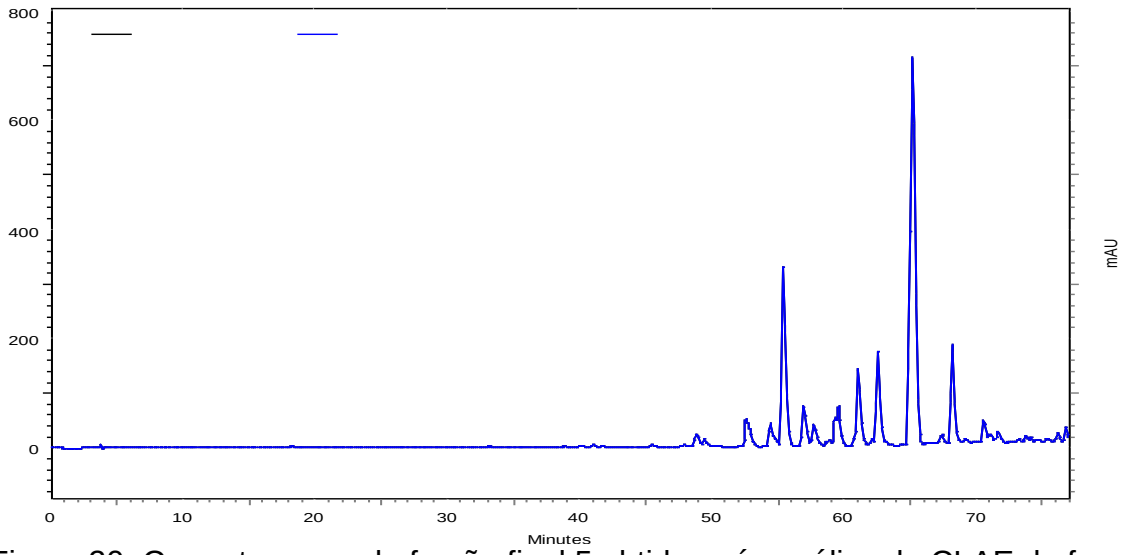


Figura 20. Cromatograma da fração final 5 obtido após análise de CLAE de fase reversa a 275 nm

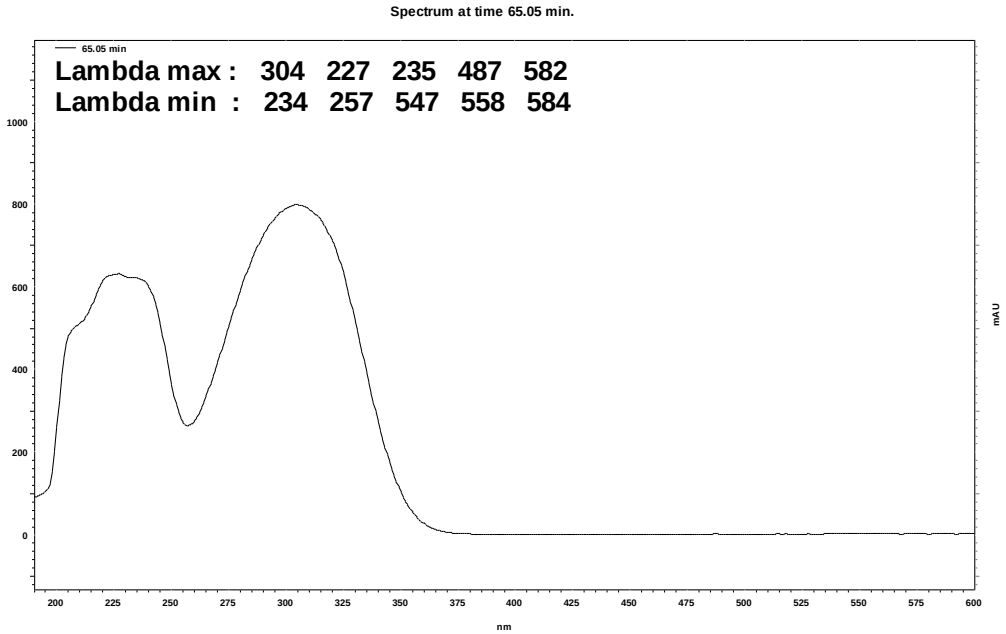


Figura 21. Espectro de UV do composto presente na fração final 5 eluído após 65.05 min.

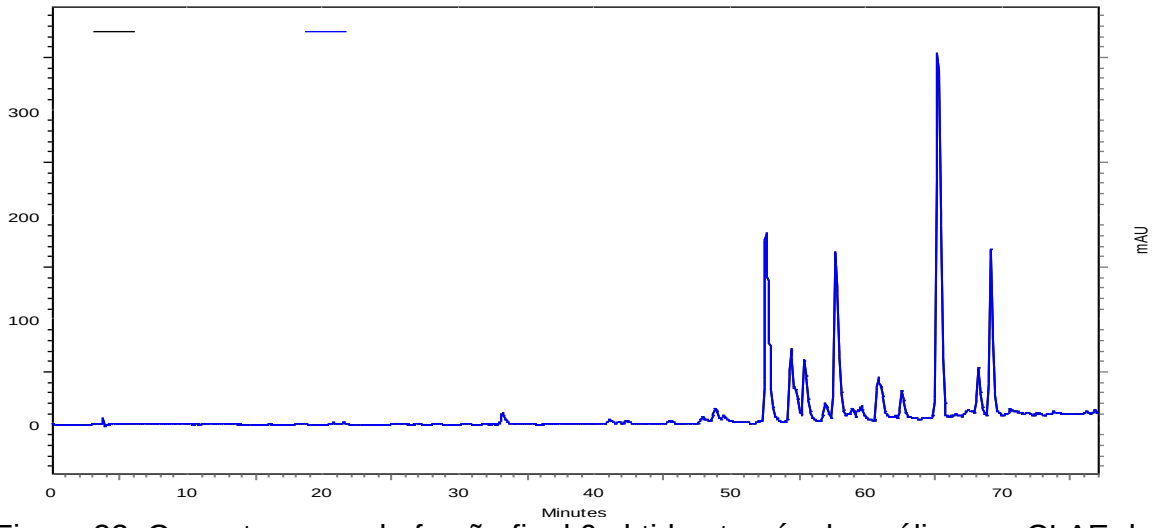


Figura 22. Cromatograma da fração final 6 obtida através de análise por CLAE de fase reversa a 275 nm

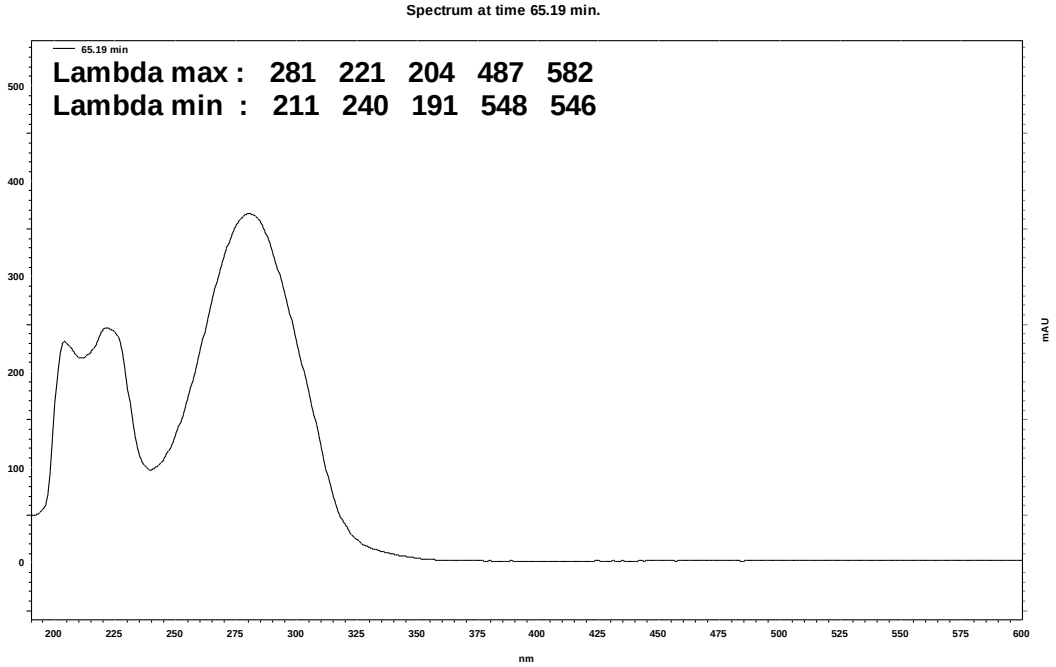


Figura 23. Espectro de UV do composto presente na fração final 6 eluído após 65.19 min.

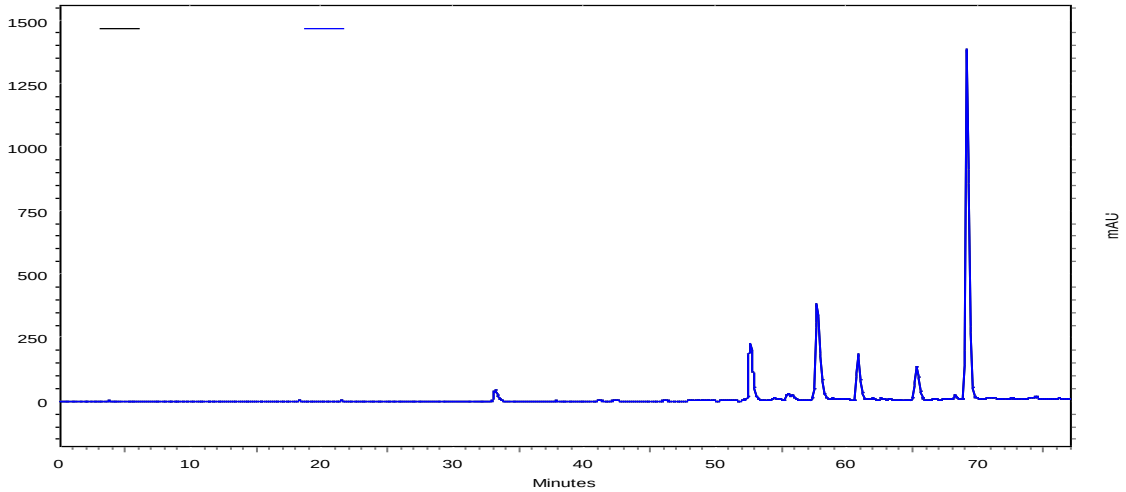


Figura 24. Cromatograma da fração final 7 obtido através de análise por CLAE de fase reversa

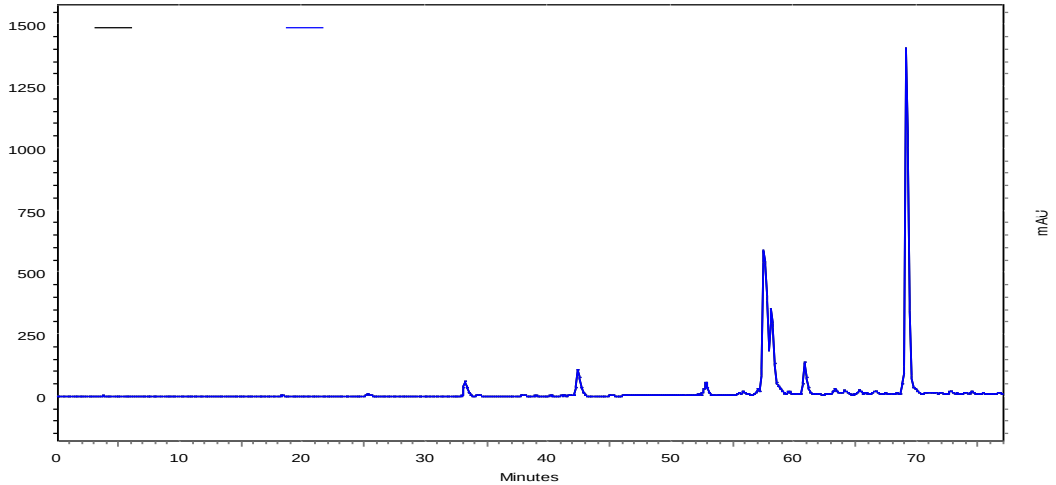


Figura 25. Cromatograma da fração final 8 obtida através de análise por CLAE de fase reversa a 275 nm

Então, conforme observado nos cromatogramas, frações ricas em artepelin C (frações 2 e 3) foram selecionadas para isolamento do artepelin C por CLAE semi-preparativa. Considerando-se que tais frações contêm majoritariamente artepelin C e que estas contém uma considerável massa (9,65 g), isolou-se 1,6 g. de artepelin C destas através de CLAE semipreparativo.

Para confirmar a identidade do composto isolado, além de se comparar com o tempo de retenção e espectro de UV por CLAE-DAD do padrão autêntico, foi utilizada também Ressonância Magnética Nuclear de ^{1}H (figura 25 e tabela 14). Os dados obtidos foram comparados aos publicados por Hattori et al (2011) e confirmou-se que o composto isolado era de fato o artepelin C: os simpletos em

δ1.78 e δ1.79 com integral igual a 6 cada correspondem aos hidrogênios metílicos das prenilas, que estão ligados aos carbonos 4'e 4''; 5' e 5'', respectivamente. Já o dupleto em δ3.35 (J= 7,2 Hz- integral =4) é atribuído aos hidrogênios metilênicos ligados aos carbonos 1' e 1''. O tripleto aparente em δ5.31 (J= 7,2 Hz) com integral igual a 2 condiz com os hidrogênios vinílicos ligados aos carbonos 2' e 2''. Em relação aos hidrogênios ligados aos carbonos 2 e 6 do anel aromático, estes refletem no simpleto em δ7.20 (integral=2). Por fim, devido aos hidrogênios vinílicos ligados aos carbonos 7 e 8, há os sinais em δ7.70 e δ6.29, respectivamente. Estes hidrogênios estão em trans entre si, como mostra a constante de acoplamento entre eles (J=15,9).

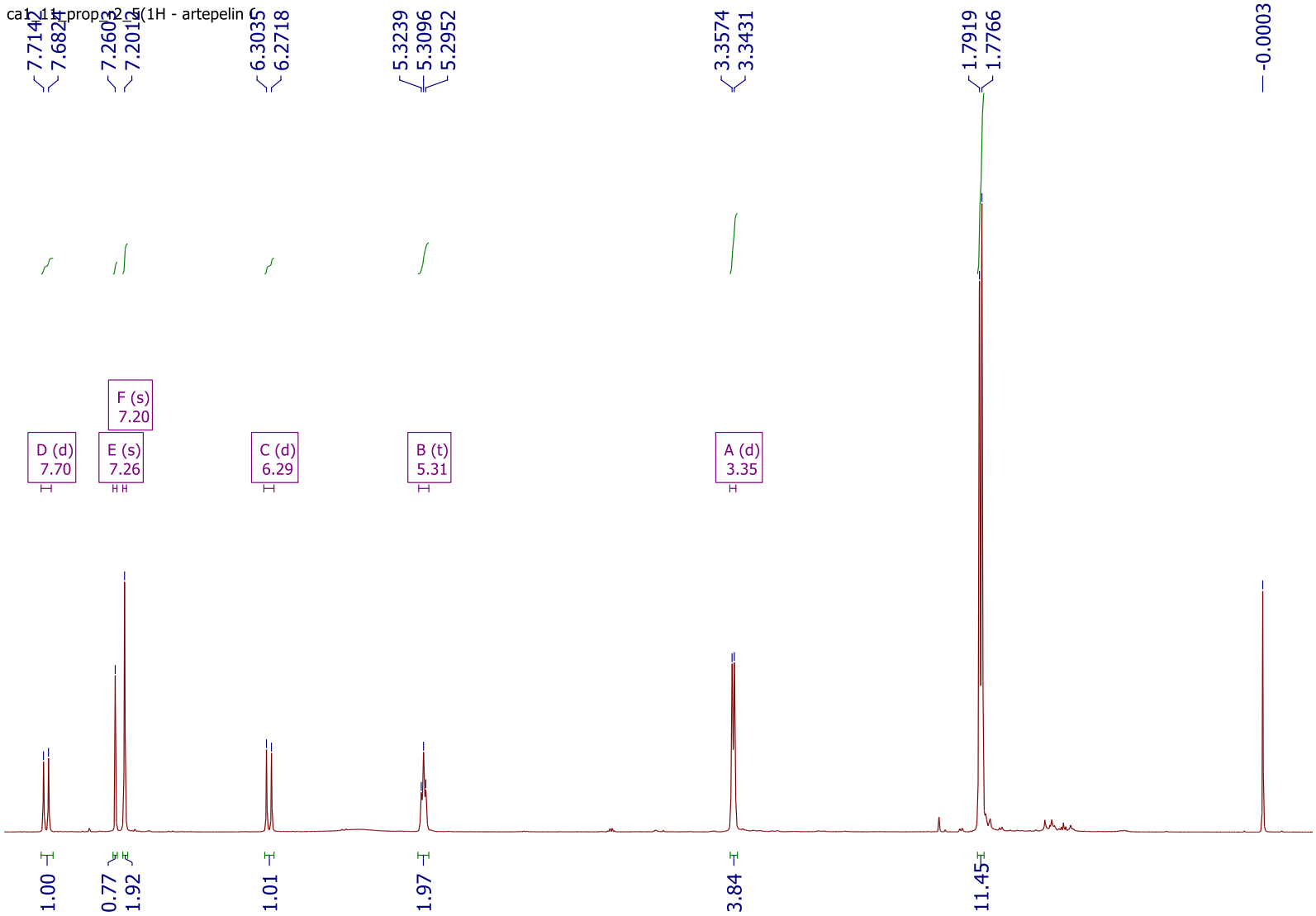


Figura 26. Espectro de ^{1}H do artepelin C isolado de própolis verde

4.2 Obtenção, isolamento e identificação dos produtos de degradação

4.2.1 Produtos de degradação do artepelin C

4.2.1.1 Degradação do artepelin C por exposição ao sol

Primeiramente, para se determinar qual o tempo de exposição do artepelin C ao sol para que se obtivesse uma quantidade significativa de produto(s) de degradação, o artepelin C, como descrito em material e métodos, foi solubilizado em acetato de etila e exposto ao sol por 20 dias; e a cada cinco dias uma alíquota era retirada e analisada por CLAE.

Conforme observado nos cromatogramas (figuras 27 a 30), após cinco dias de exposição ao sol formaram-se alguns produtos de degradação do artepelin C em maior concentração (artepelin C possui tempo de retenção de 64.8 min no método utilizado). Após este período, os produtos de degradação, assim como o artepelin C, continuaram se degradado e após 20 dias, o artepelin C não era mais detectado na amostra e diversos produtos de degradação minoritários foram observados.

Portanto, selecionou-se o tempo de cinco dias de exposição ao sol para se obterem quantidades significativas dos derivados de degradação do artepelin C a serem isolados.

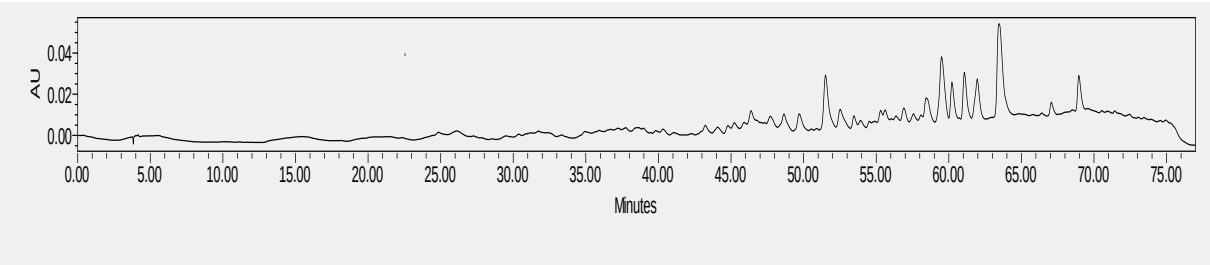


Figura 27. Cromatograma da amostra de artepelin C após cinco dias de exposição ao sol

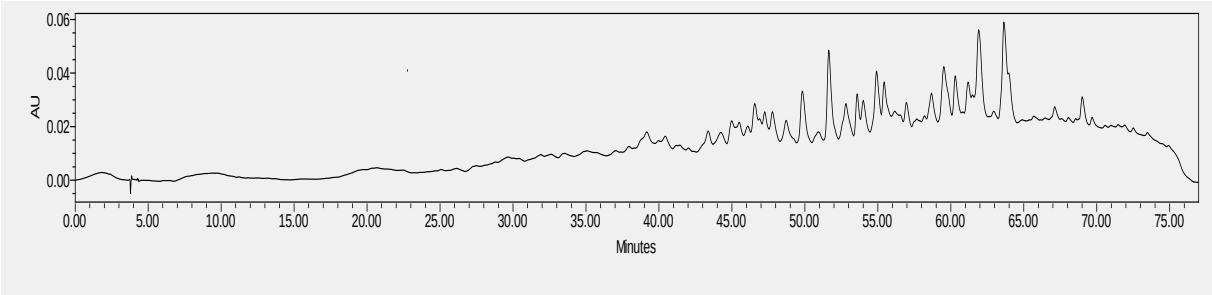


Figura 28. Cromatograma da amostra de artepelin C após 10 dias de exposição ao sol

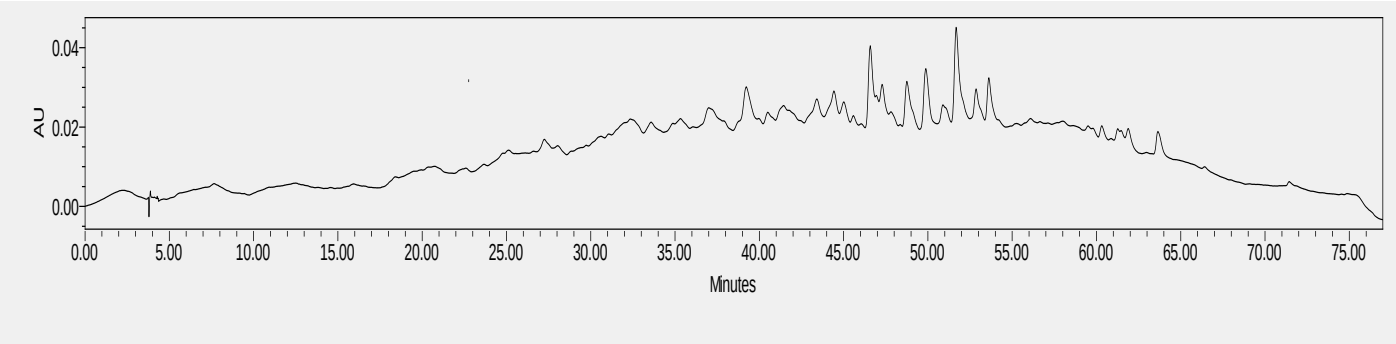


Figura 29. Cromatograma da amostra de artepelin C após 15 dias de exposição ao sol

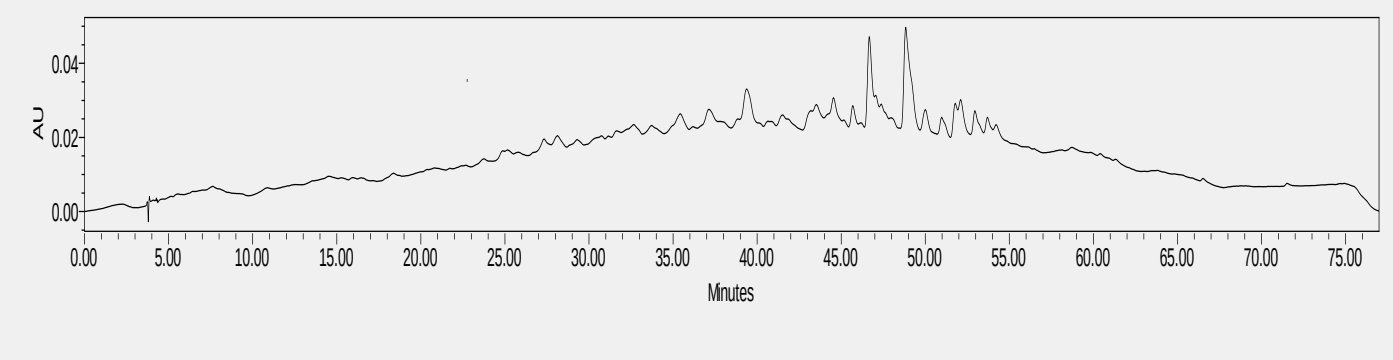


Figura 30. Cromatograma da amostra de artepelin C após 20 dias de exposição ao sol

A próxima etapa foi o isolamento destes compostos: tendo em vista que os produtos possuem polaridade muito semelhante à de seus compostos de origem e que, ao se empregar metanol como solvente orgânico da fase móvel, não se obteveram resultados satisfatórios na separação de diversos compostos presentes na amostra, desenvolveu-se um método em CLAE de fase reversa em escala analítica utilizando-se como fase móvel acetonitrila, água e modificadores de fase móvel (ácido fórmico, isopropanol e metanol).

Assim que um método com resolução suficiente para isolamento dos produtos de degradação majoritários foi obtido (conforme pode ser observado no cromatograma presente na figura 31), optou-se por isolá-los com o auxílio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência semipreparativa. Para isto, o método analítico teve sua vazão aumentada para 4,6 mL/min, conforme o “Scale up” do manual da coluna semipreparativa utilizada neste caso (Kromasil® C18- 250 mm × 10 mm- 5 µm).

De cada 100 mg de artepelin C, após cinco dias de exposição, foi possível a obtenção de quatro diferentes compostos (tabela 7). Devido a obtenção de pouca massa e baixa pureza dos compostos 1 a 3, somente o composto 4 foi enviado para ser analisado por RMN unidimensional e bidimensional (^{1}H, ^{13}C, COSY, HSQC e HMBC) e por Espectrometria de massas de Alta Resolução (injeção direta).

Tabela 13. Compostos isolados após cinco dias de exposição do artepelin C ao sol

Composto	**Tempo de retenção (minutos)**	**Massa (mg)**
1	29	1
2	30	0,4
3	31	2,6
4	37	7,3

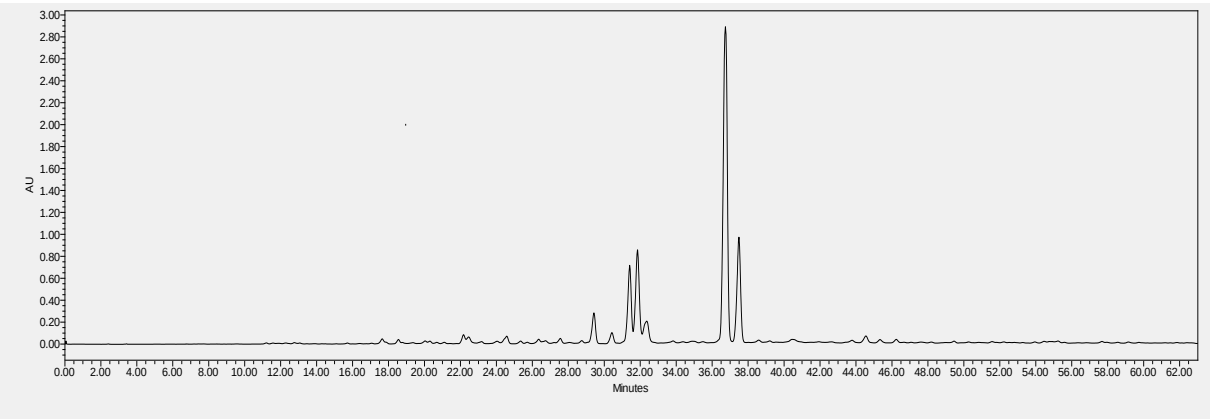


Figura 31. Cromatograma da análise por CLAE da amostra de artepelin C após exposição ao sol por 5 dias

Ao se analisar o resultado destes experimentos, foi possível concluir que a única modificação significativa que ocorreu no artepelin C para dar origem a este composto foi a sua isomerização, obtendo-se o diasteroisômero *cis*: a constante de acoplamento entre os hidrogênios ligados aos carbonos 7 e 8 é igual a 12.8, sendo que no artepelin C esta constante era igual a 15.9, ou seja, houve uma mudança no ângulo diedro entre estes hidrogênios (espectros de ^{1}H e ^{13}C- figuras 31 e 32). Na tabela 14 constam os sinais, seus respectivos carbonos e hidrogênios ligados a eles, assim como a atribuição destes sinais.

Para se confirmar a estrutura química deste composto, compararam-se também os espectros de massas em ambos modos positivo e negativo: conforme observado nas figuras 33 a 36, os espectros de tais amostras são muito semelhantes. Os espectros das figuras 33 (artepelin C) e 35 (ART4) – modo negativo- mostram que há um sinal de razão massa/carga da massa do artepelin C menos a massa de um hidrogênio (m/z 299,16) e o mesmo acontece nos espectros de massas no modo positivo (figuras 34 e 36), onde há um sinal com razão massa/carga da massa do artepelin C menos a massa de um hidrogênio (m/z 301,18). A estrutura química do ART4 se encontra na figura 35.

Tabela 14. Dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C do artepelin C e ART4

Posição do átomo	**δ ^{1}H (J em Hz) Artepelin C *cis***	**δ ^{1}H (J em Hz) Artepelin C *trans***	**δ^{13}C Artepelin C *cis***	**δ^{13}C Artepelin C *trans***
1	-	-	126,7	126,5
2	7,4 s	7,2 s	135,0	135,2
3	-	-	130,8	128,5
4	-	-	154,3	155,5
5	-	-	130,8	128,5
6	7,4 s	7,2 s	135,0	135,2
7	6,9 d (12,8)	7,69 (15,6)	146,2	147,5
8	5,8 d (12,8)	6,29 (15,6)	115,4	114,1
9	-	-	170,7	172,1
1’	3,33 d (7,15)	3,35 d (7,2)	29,5	29,6
2’	5,31 t(7,2)	5,31 t (7,2)	121,6	121,4
3’	-	-	127,6	127,8
4’	1,76 s	1,78 s	17,7	18,0
5’	1,76 s	1,79 s	25,6	25,9
1’’	3,33 d (7,2)	3,35 d (7,2)	29,5	29,6
2’’	5,31 t(7,2)	5,31 t (7,2)	121,6	121,4
3’’	-	-	127,6	127,8
4’’	1,76 s	1,78 s	17,7	18.0
5’’	1,76 s	1,79 s	25,6	25.9

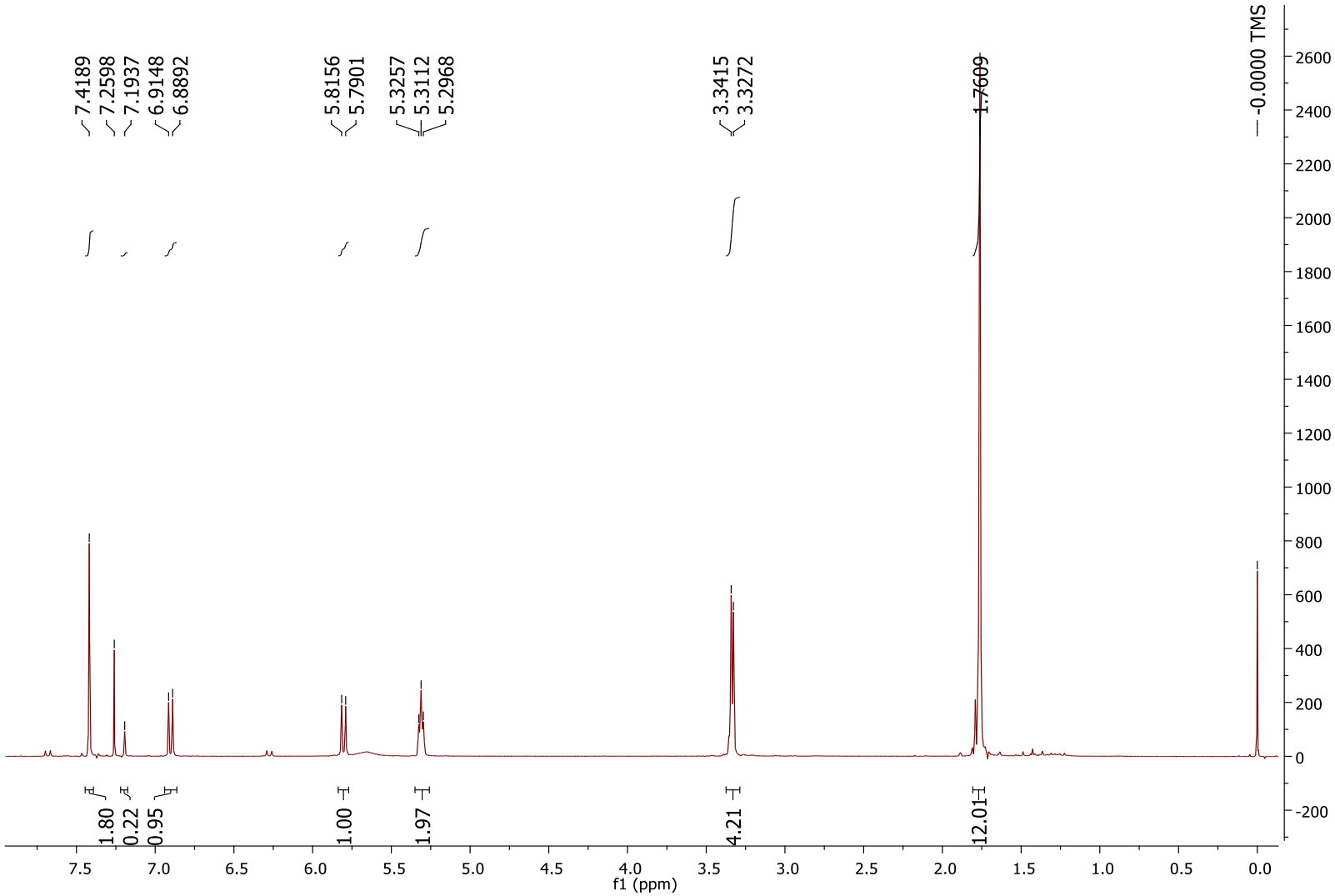


Figura 32. Espectro de ^{1}H do ART4 em $CDCl_3$ – 500 mHZ

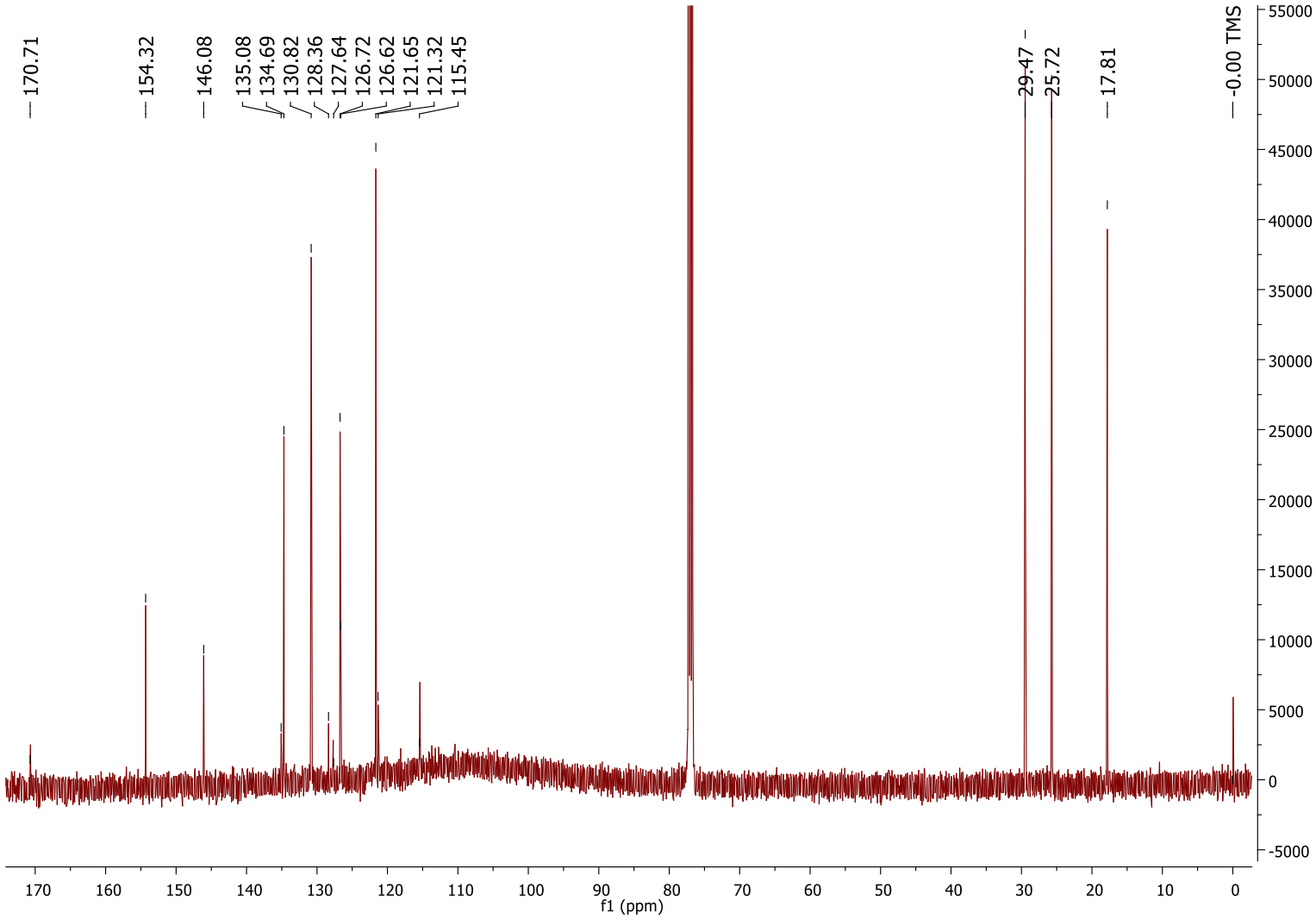


Figura 33. Espectro de ^{13}C do ART4 em $CDCl_3$-125 mHz

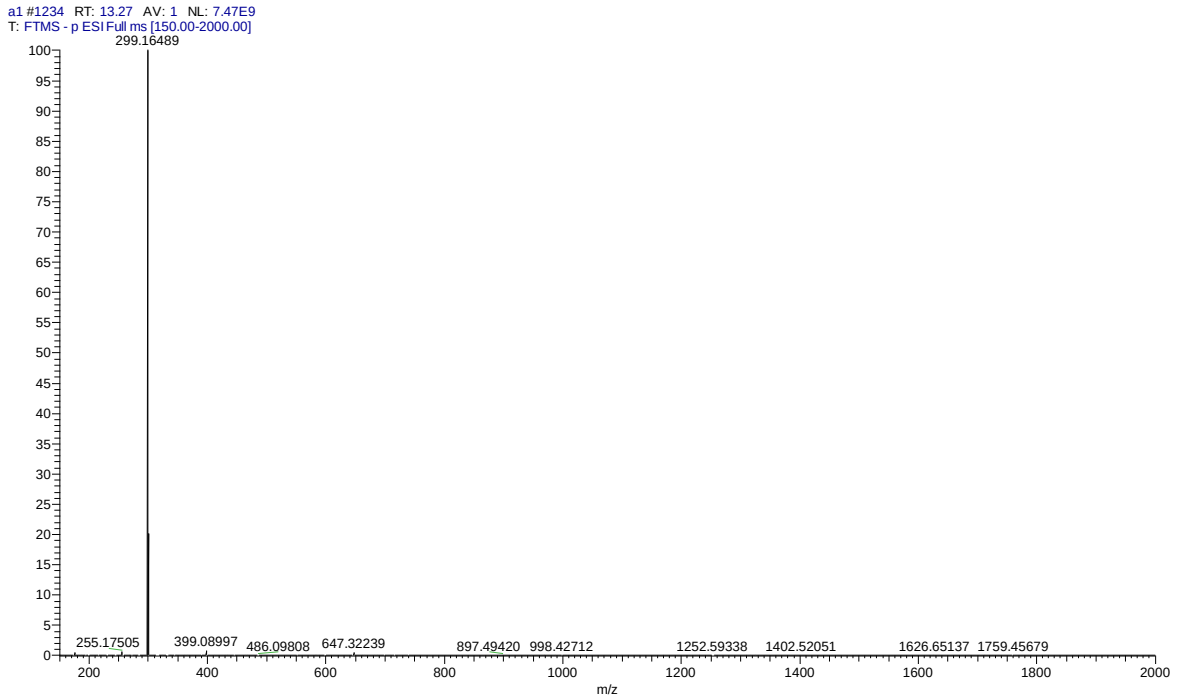


Figura 34. Espectro de massas do artepelin C no modo de análise negativo

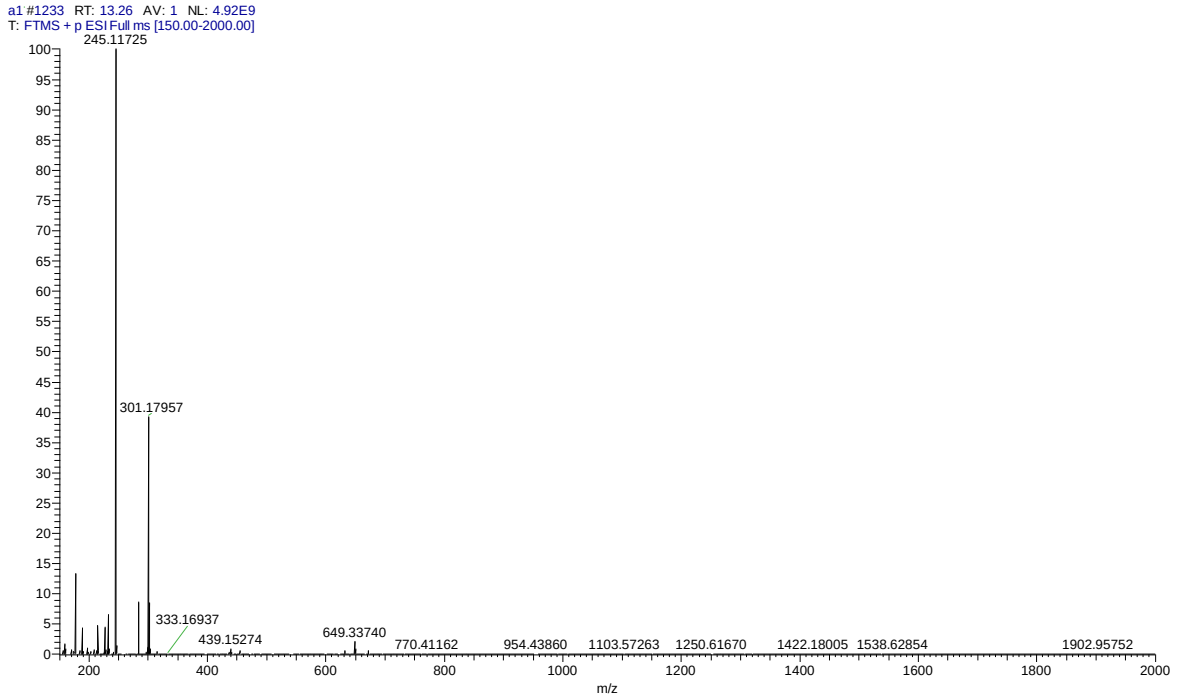


Figura 35. Espectro de massas do artepelin C no modo de análise positivo

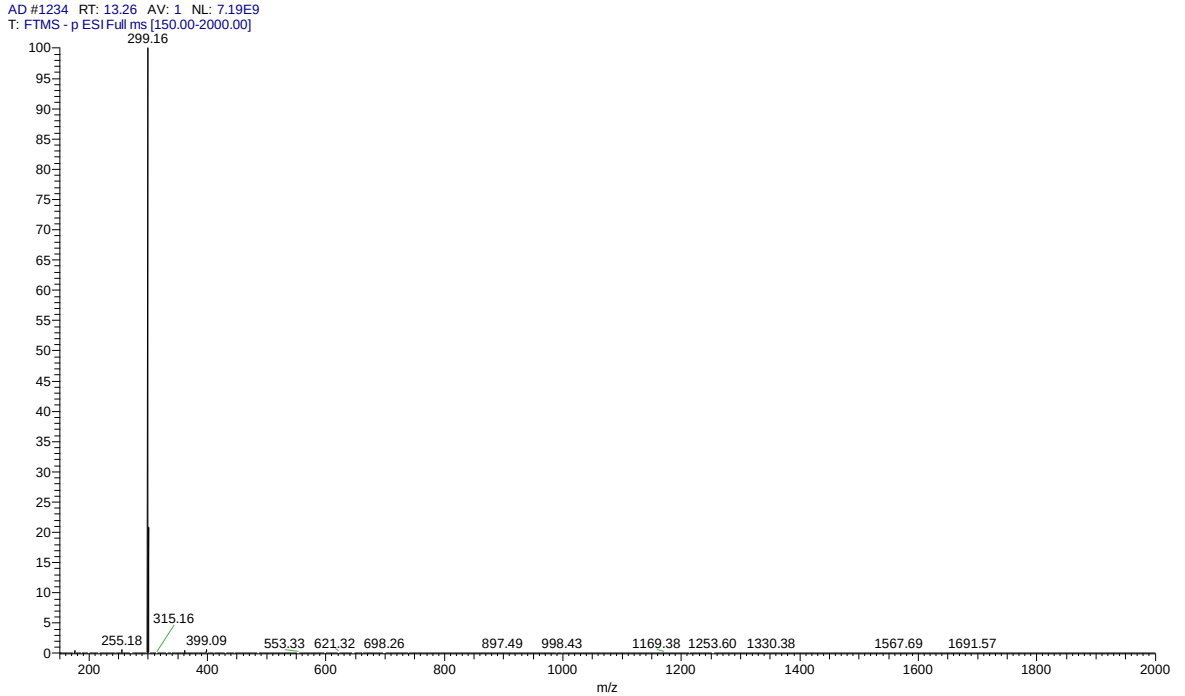


Figura 36. Espectro de massas do ART4 no modo de análise negativo

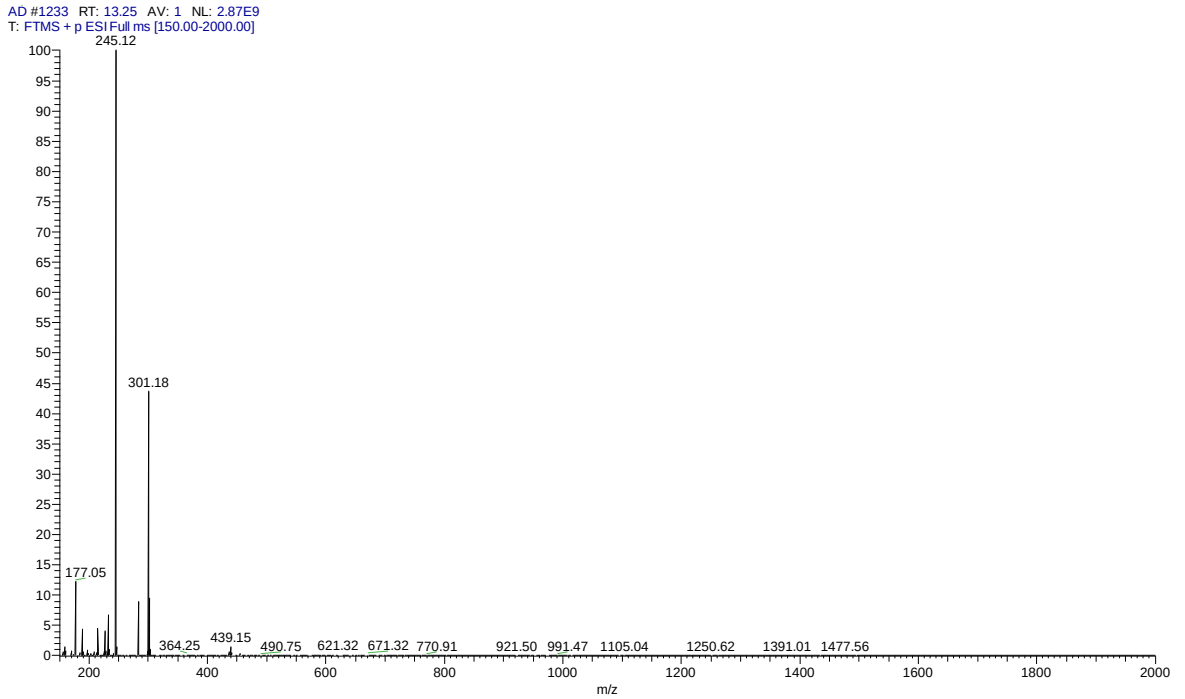


Figura 37. Espectro de massas do ART4 no modo de análise positivo

4.2.1.2 Degradação do artepelin C por exposição ao calor

Após exposição do artepelin C ao calor (50 ºC) em estufa de circulação de ar por cinco dias e isolamento dos produtos de degradação majoritários, foram obtidos entre 3 e 4% dos compostos ART 1, 2 e 3. Todos eles foram analisados por Ressonância Magnética Nuclear de ^{1}H, ^{13}C, HSQC e HMBC (tabela 15); e espectroscopia de massas de alta resolução. Os dados obtidos foram comparados aos descritos na literatura (Tazawa et al., 1998).

Estes compostos foram identificados como o ácido (*E*)-3-[2,3-diidro-2-(1-metiletil)-7-prenil-5-benzofuranil] 2-propenoico (ART1), ácido (*E*)-3-(2,2-dimetil-3,4-diidro-3-hidroxi-8-prenil-2H-1-benzopiran-6-il) 2-propenoico (ART2) e ácido 3-[2-dimetil-8-(3-metil-2-butenil) benzopiran]-6-propenoico (ART3) (Figura 35). Os rendimentos destes compostos foram 3,2; 3,9 e 3;9, respectivamente.

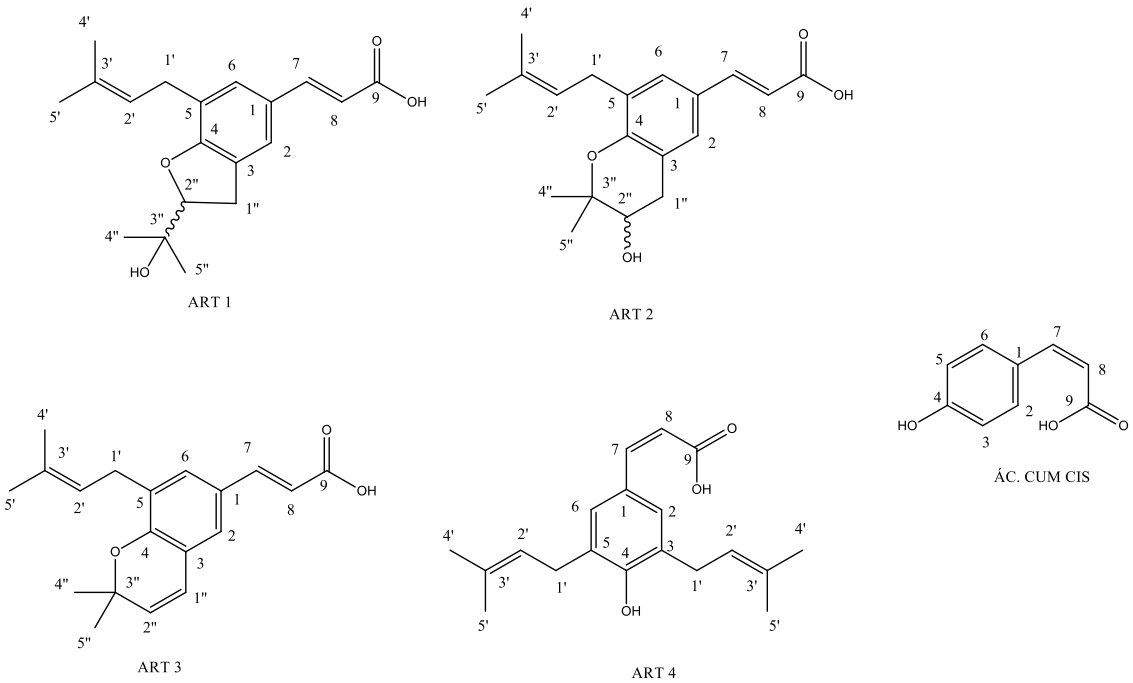


Figura 38. Estruturas químicas do ART1, ART2, ART3, ART4 e AC-1

Tabela 15. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C do ART1, ART2 e ART3

Posição do átomo	ART1 δ 13C	δ ^{1}H (^{3}J em Hz)	Posição do átomo	ART2 δ ^{13}C	δ ^{1}H (^{3}J em Hz)	Posição do átomo	ART3 δ ^{13}C	δ ^{1}H(^{3}J em Hz)
9	171,78	-	**9**	171,82	-	**9**	171,95	-
4	160,20	-	**4**	153,27	-	**4**	153,27	-
7	147,41	7,70 d (15,85)	**7**	147,10	7,68 d(16)	**7**	147,15	7,69 d (15,9)
3'	133,35	-	**3'**	132,82	-	**3'**	132,69	-
2	129,68	7,14 (s)	**5**	130,74	-	**2''**	131,06	5,66 d (9,8)
3	127,83	-	**2**	128,60	7,12 s	**5**	129,91	-
1	127,36	-	**6**	127,82	7,19 s	**2**	129,81	7,05 d (1,7)
5	123,65	-	**1**	126,42	-	**1**	126,34	-
6	122,47	7,24 (s)	**2'**	122,00	5,27 t(7,4)	**6**	124,39	7,19 d (1,7)
2'	121,49	5,29 t (7,0)	**3**	119,01	-	**1''**	122,04	-
8	113,73	6,27 d(15,85)	**8**	114,21	6,29 d(16)	**3**	122,01	6,32 d (9,8)
2''	89,91	4,69 t(8,9)	**3''**	77,57	-	**2'**	121,04	5,28 t (7,35)
3''	71,94	-	**2''**	69,63	3,84 t (5,31)	**8**	114,03	6,29 d (15,9)
1''	30,51	3,19 d(8,9)	**1''**	31,48	3,09 dd (16,95 ; 5,5) 2,80 dd (16,45 ; 4,5)	**3''**	77,2	-
1'	28,23	3,32 (m)	**1'**	28,43	3,29 t (7,4)	**4'' e 5''**	28,23	1,44 s
5''	25,90	1,34 (s)	**4'**	25,85	1,75 s	**1'**	28,07	3,27 d (7,38)
4'	25,78	1,75 (s)	**4''**	25,15	1,33 s	**4'**	25,76	1,75 s
4''	24,11	1,21 (s)	**5''**	22,23	1,37 s	**5'**	17,84	1,73 s
5'	17,86	1,73 (s)	**5'**	17,87	1,72 s			

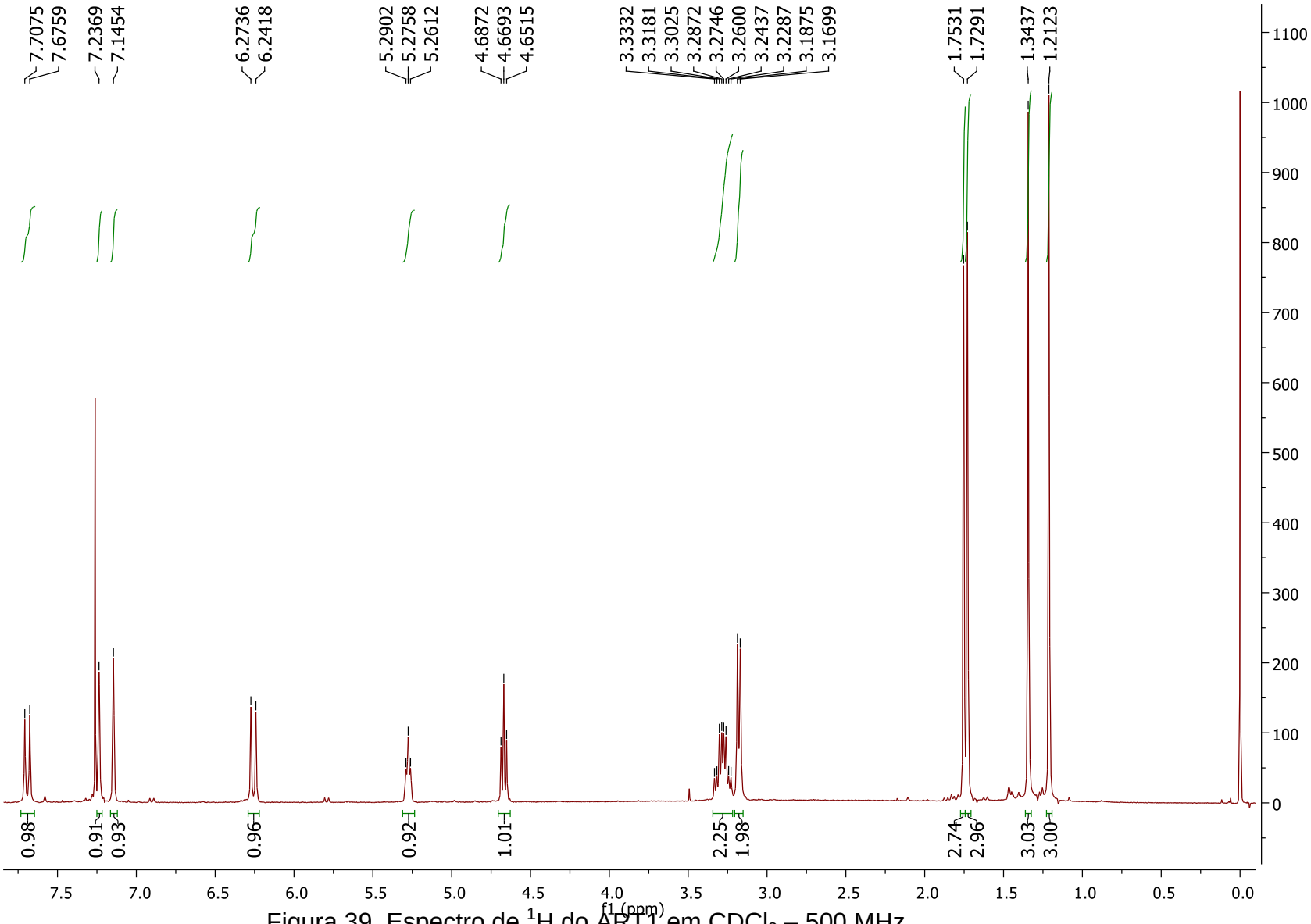


Figura 39. Espectro de ^{1}H do ART1 em $CDCl_3$ – 500 MHz

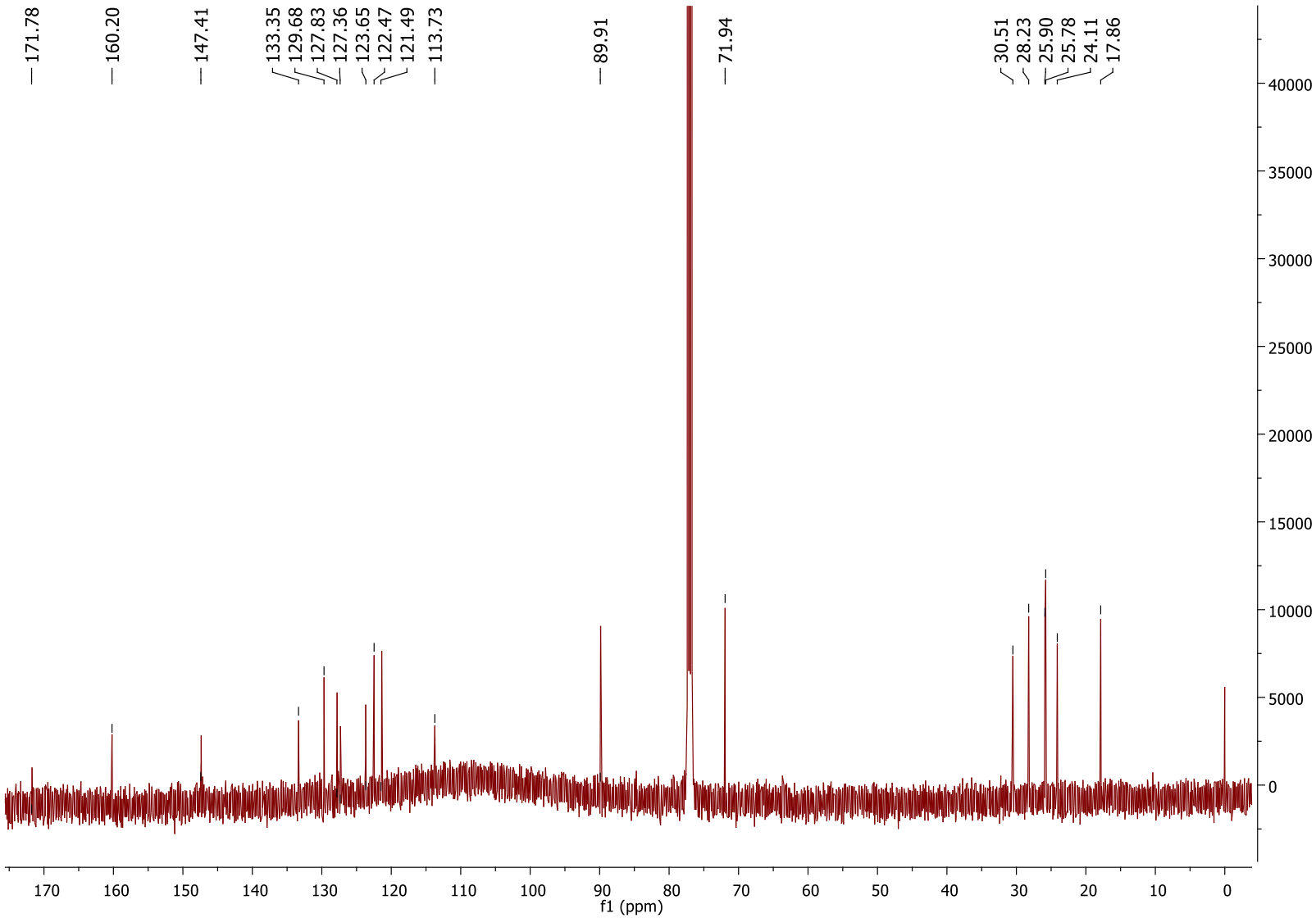


Figura 40. Espectro de ^{13}C do ART1 em $CDCl_3$ – 125 MHz

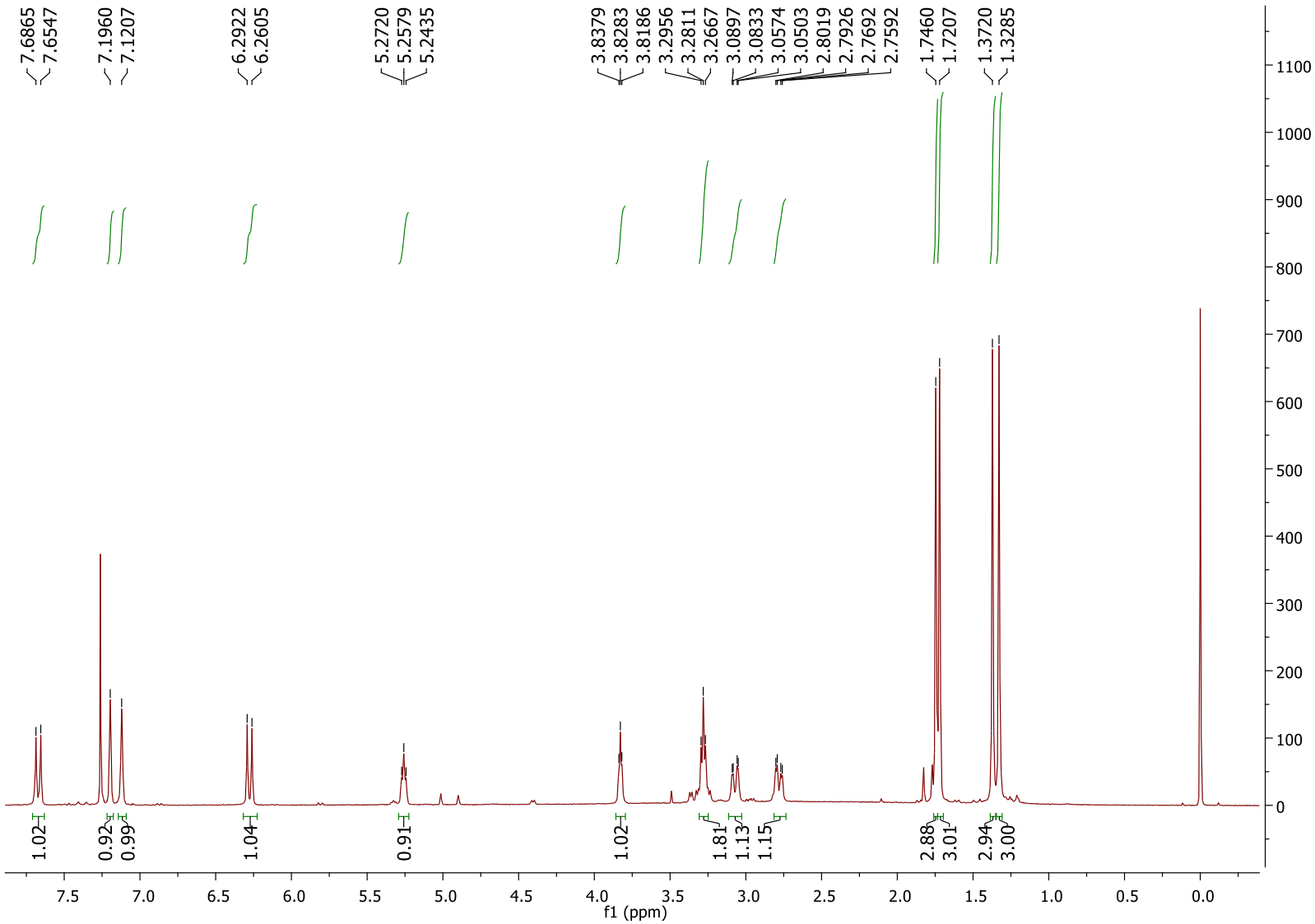


Figura 41. Espectro de ^{1}H do ART2 em $CDCl_3$ – 500 MHz

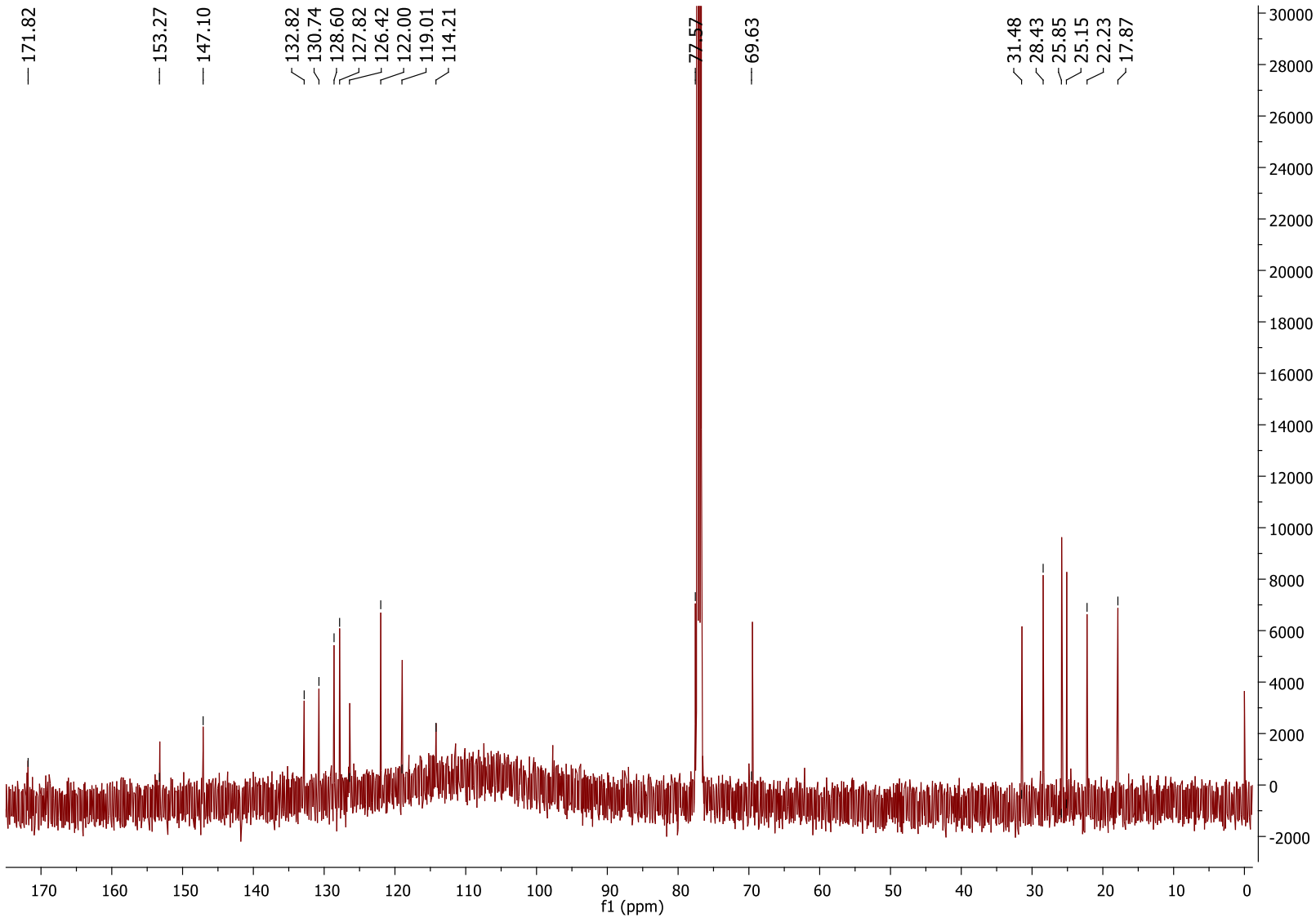


Figura 42. Espectro de ^{13}C do ART2 em $CDCl_3$ – 125 MHz

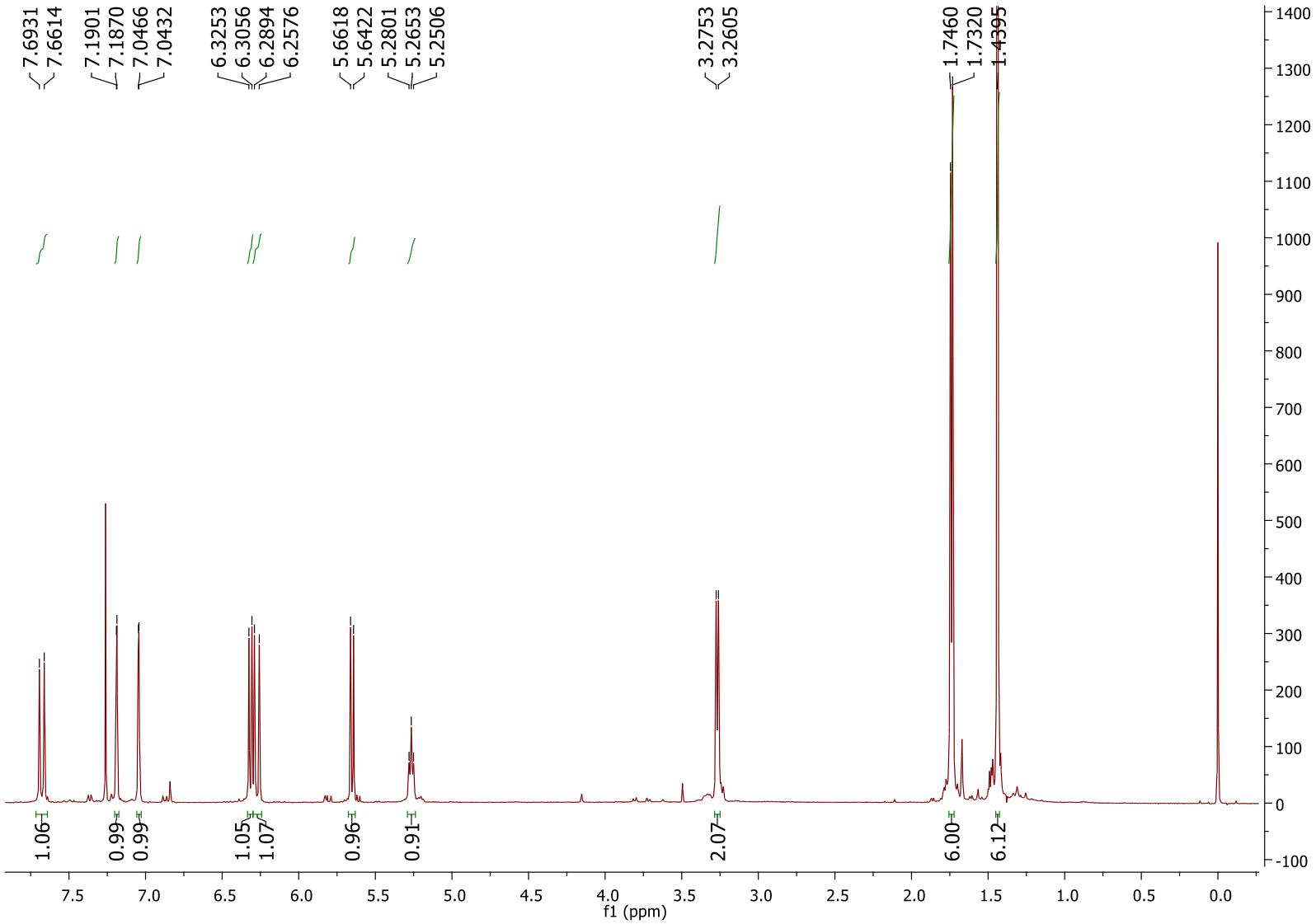


Figura 43. Espectro de ^{1}H do ART3 em $CDCl_3$ – 500 MHz

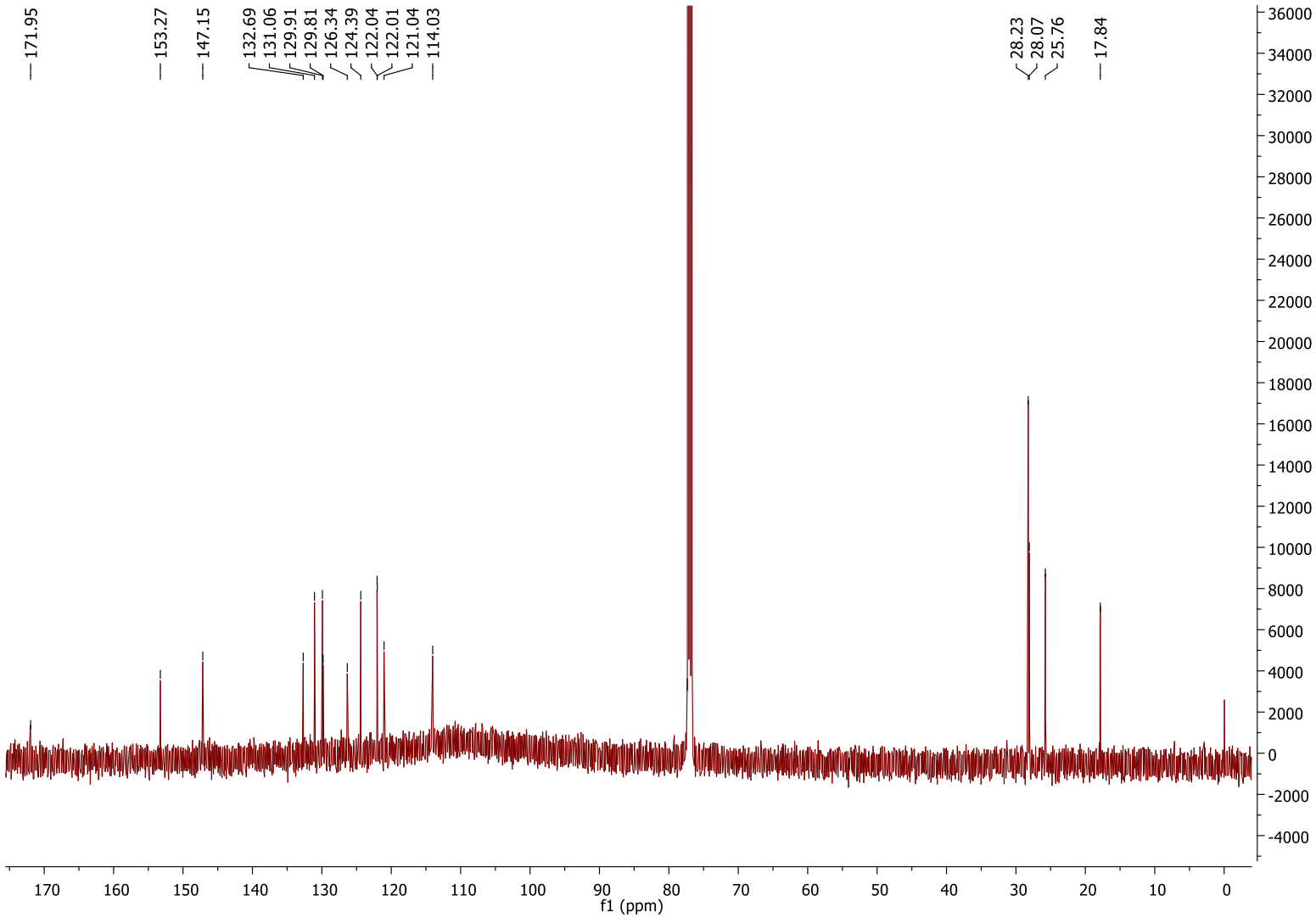


Figura 44. Espectro de ^{13}C do ART3 em $CDCl_3$ – 125 MHz

Tendo em vista a confirmação das estruturas químicas destes compostos, além de se considerarem os dados de RMN, analisaram-se também os espectros de massas do ART1 e ART2 em ambos modos positivo e negativo. Tais análises foram feitas devido ao ART1 e ART2 serem isômeros. Os espectros das figuras 42 a 44 mostram que as massas dos compostos de degradação corroboram as estruturas químicas propostas e os dados de RMN.

Em relação ao ART1, há um sinal de razão massa/carga 315,16 no modo negativo, o que corresponde à massa deste composto (316,17) menos a massa de um hidrogênio. No modo positivo, há a formação de um aduto com sódio. O mesmo acontece com o ART2.

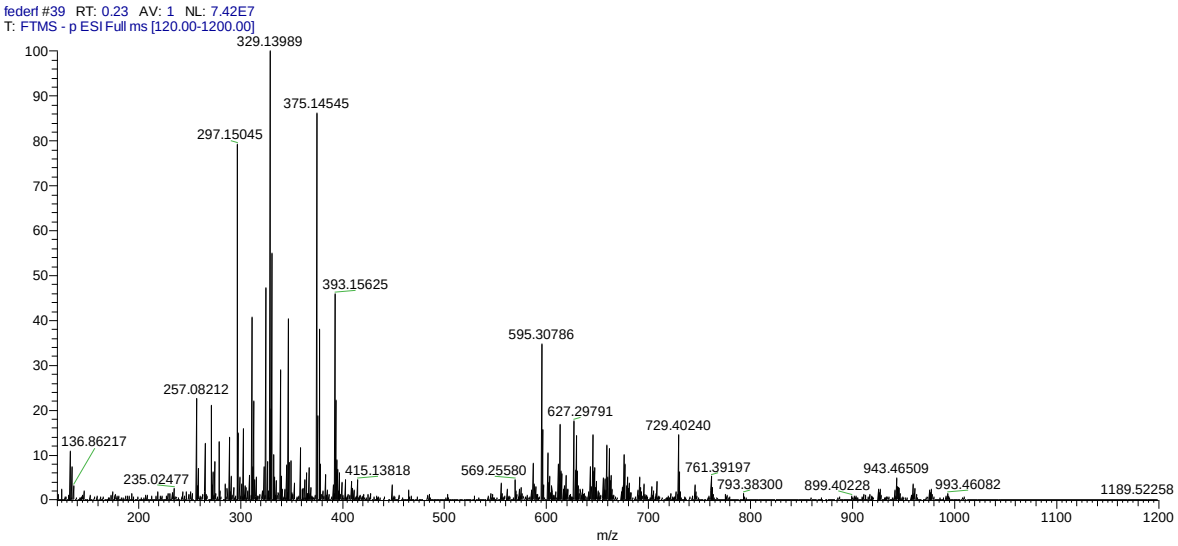


Figura 45. Espectro de massas do ART1 no modo negativo de análise

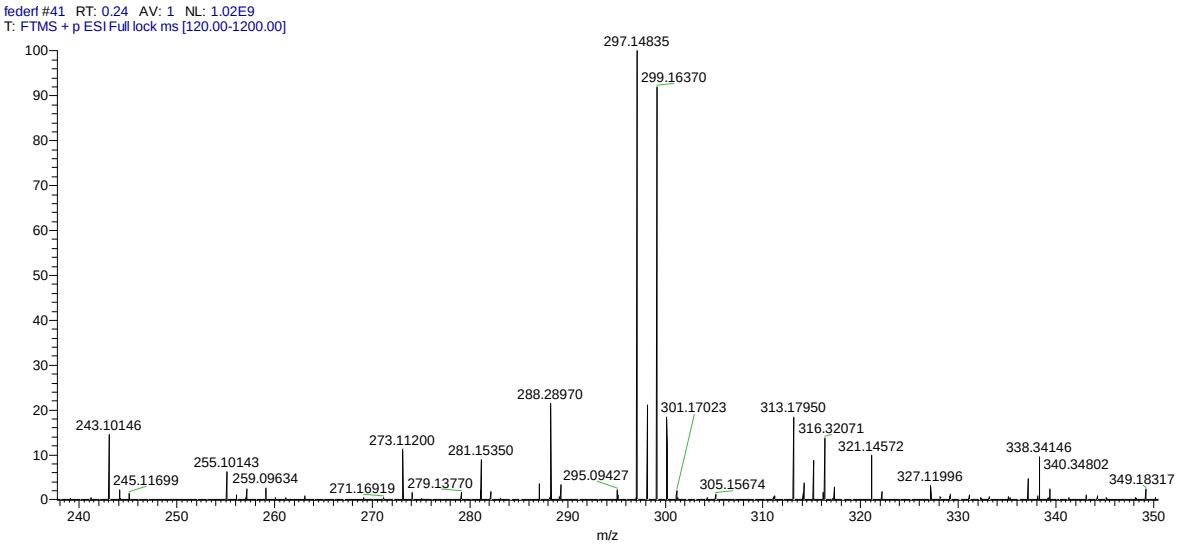


Figura 46. Espectro de massas do ART1 no modo positivo de análise

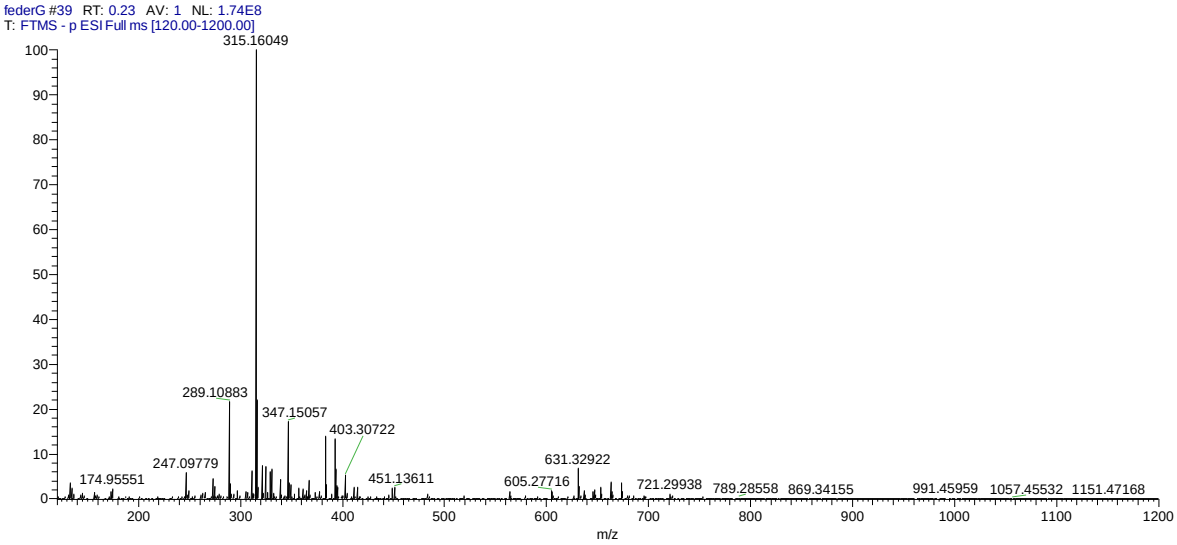


Figura 47. Espectro de massas do ART2 no modo negativo de análise

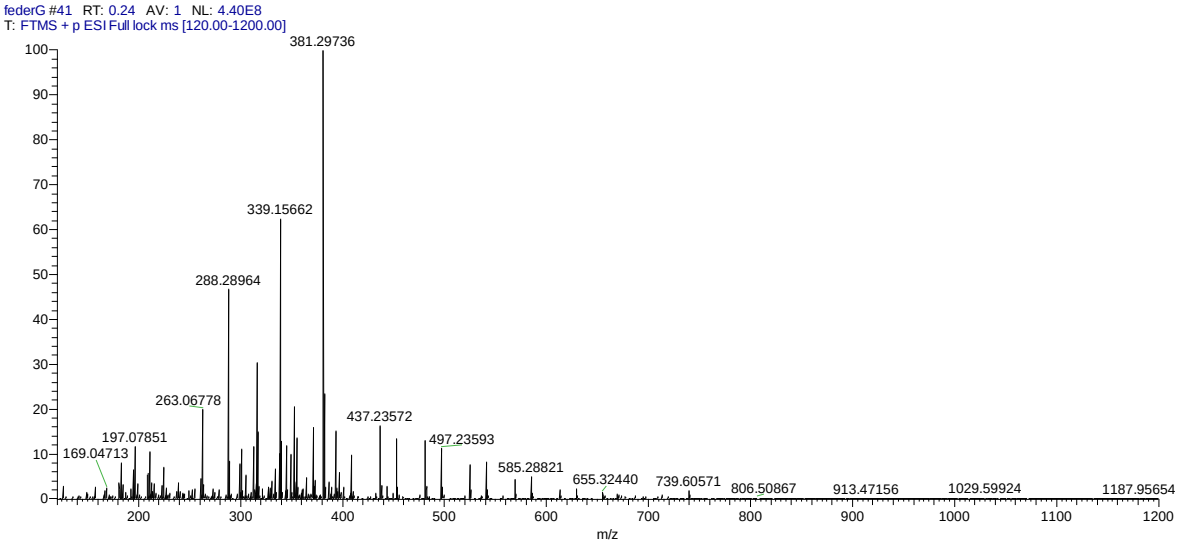


Figura 48. Espectro do massas do ART2 no modo positivo de análise

A formação destes compostos ocorreu provavelmente devido à presença de carbonos insaturados, os quais podem sofrer auto-oxidação quando expostos ao ar, geralmente por mecanismo radicalar através da formação de hidroperóxidos. A reação tem início com a remoção de um hidrogênio alílico, dando origem ao respectivo radical e suas formas em ressonância. Estas são capazes de reagir com o estado triplete do oxigênio, gerando radicais peroxil. Então, após a remoção do átomo de hidrogênio, são formados hidroperóxidos, que podem dar origem a compostos secundários oxidados (Skold et al., 2004)

Considerando-se estas informações, propôs-se o mecanismo de degradação presente na figura 46, no qual ocorre a formação de derivados furânico e pirânico do artepelin C. Um hidroperóxido terciário dá origem a um epóxido, que sofre então o ataque de um grupo hidroxílico em um dos carbonos formadores do epóxido, gerando os produtos de degradação ART1 e ART2. A partir da desidratação do ART2, o composto ART3 pode ser formado. Tais reações são, aparentemente, dependentes da temperatura.

ART1 e ART2 possuem um carbono assimétrico cada e são, provavelmente, a mistura de seus enantiômeros, pois estes foram obtidos a partir de um processo de degradação forçada, que, na maioria das vezes, não fornece compostos quirais enantiomericamente puros. Porém, a partir da medida da rotação óptica destes compostos, observou-se que pode haver um excesso enantiomérico do enantiômero dextrogiro: $[\alpha]_D^{25}$: +3.9 (c 0.5, $CHCl_3$) para ART 1 e ($[\alpha]_D$: +18.67 (c .0, $CHCl_3$) para ART 2).

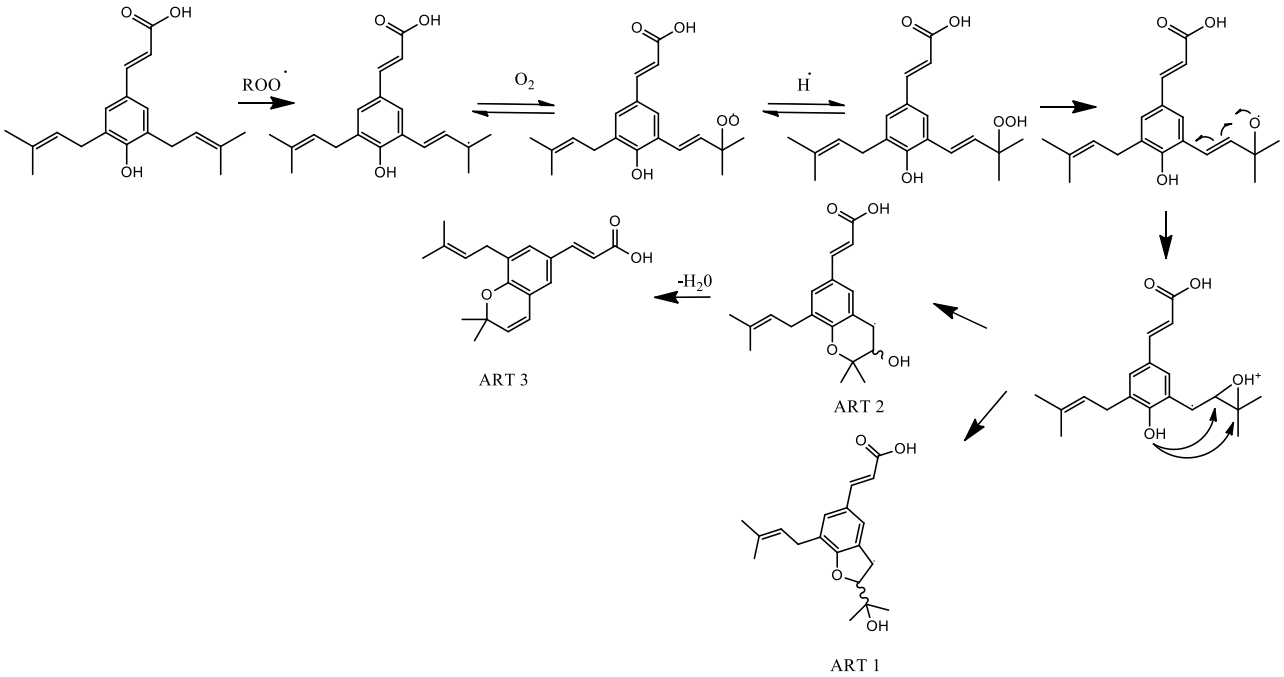


Figura 49. Proposta de mecanismo para a formação dos produtos de degradação do artepelin C por exposição deste composto ao calor

4.2.2 Produto de degradação do ácido *p*-cumárico

Em relação ao principal produto de degradação do ácido *p*-cumárico, a partir de 200 mg do composto inicial, foi obtida uma massa de 51,2 mg de seu produto de degradação majoritário. Este composto foi submetido a análises por Ressonância Magnética Nuclear de ^{1}H, ^{13}C, HSQC e HMBC com o intuito de determinar sua estrutura química. Assim como ocorreu com o artepelin C após exposto ao sol, a única modificação significativa que ocorreu no ácido *p*-cumárico provocada pela luz solar foi a isomerização entre o *trans*-ácido *p*-cumárico em *cis*-ácido *p*-cumárico. Comparação com o espectro de ^{1}H descrito na literatura por Yi et al. (2010), verificou-se que os sinais correspondentes aos hidrogênios ligados aos carbonos aromáticos 2 e 6 estavam presentes (δ 7,5- J=8,7), assim como os hidrogênios ligados aos carbonos 5 e 3 (δ 6,7 – J= 8,7). Já os hidrogênios vinílicos ligados aos carbonos 7 e 8 sofreram isomerização de *trans* para *cis*: o sinal em δ 6,8 (J= 12,8) corresponde ao primeiro destes, enquanto o sinal δ 5,75 (J=12,8) ao segundo, o que mostra que estes hidrogênios sofreram uma ligeira blindagem ao ser alterado o ângulo diedro entre eles e, também devido à mudança deste, os hidrogênios que estão em *trans* entre si no ácido *p*-cumárico, estão em *cis* em seu produto de degradação. Os deslocamentos químicos dos carbonos nestes compostos não apresentam modificações significativas, assim como entre o *trans*-artepelin C e o *cis*-artepelin C. Os dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C podem ser observados na tabela 16; os espectros nas figuras 47 e 48 e a estrutura química do AC-1 na figura 35.

Tabela 16. Dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C do ácido *p*-cumárico (Yi et al. 2010) e do AC-1

Posição do átomo	**δ ^{1}H (J em Hz) Ácido *p*-cumárico *cis***	**δ ^{1}H (J em Hz) Ácido *p*-cumárico *trans***	**δ^{13}C Ácido *p*-cumárico *cis***	**δ^{13}C Ácido *p*-cumárico *trans***
1	-	-	126,2	127,3
2	7,58 (8,7)	7,42 (8,6)	132,1	131,1
3	6,71 (8,7)	6,77 (8,6)	116,1	116,9
4	-	-	158,2	161,1
5	6,71 (8,7)	6,77 (8,6)	116,1	116,9
6	7,58 (8,7)	7,42 (8,6)	132,1	131,1
7	6,79 (12,8)	7,56 (15,8)	142,2	146,6
8	5,75 (12,8)	6,25 (15,8)	114,5	115,8
9	-	-	169,0	171,2

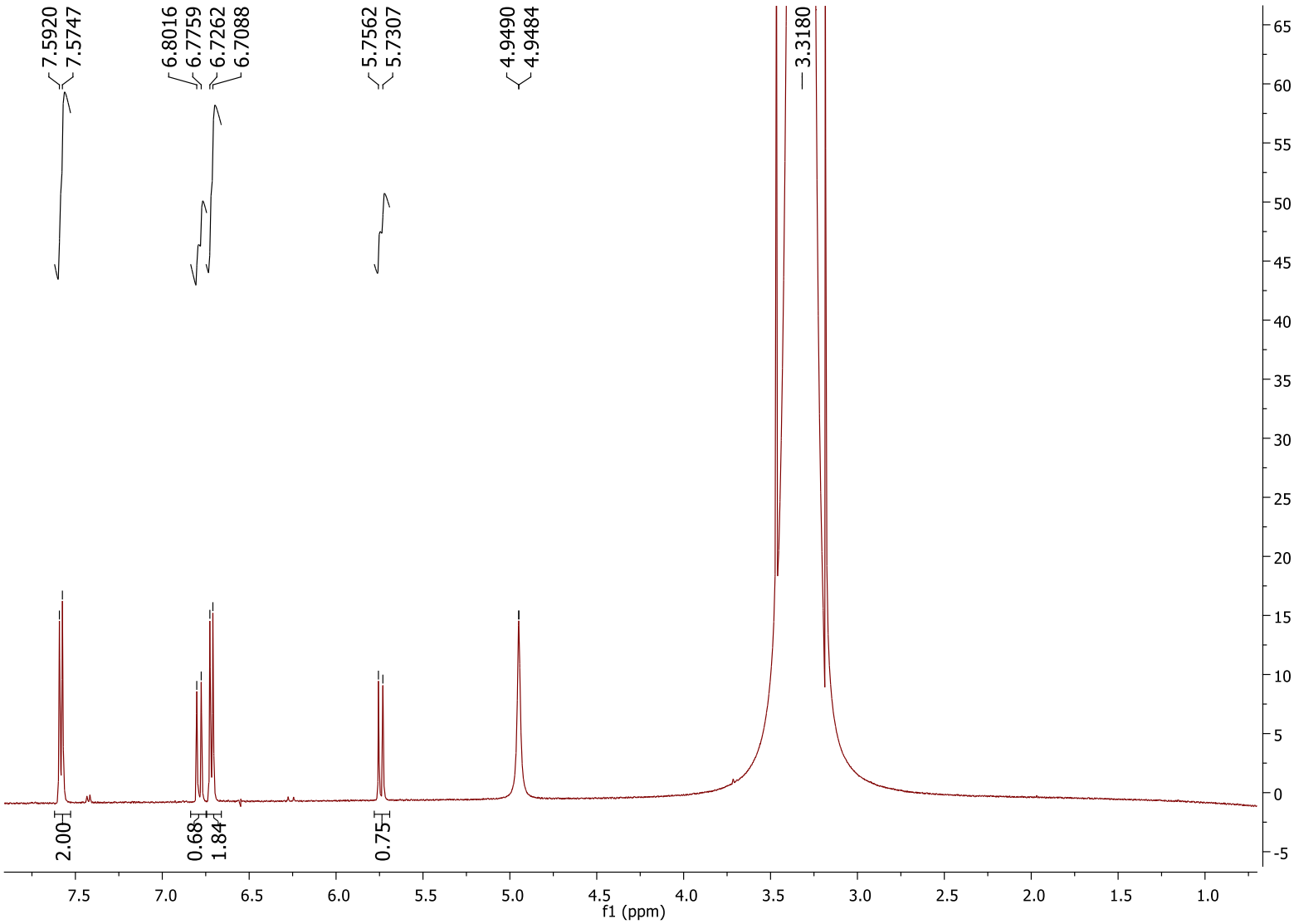


Figura 50. Espectro de ^{1}H do AC-1 em CD_3OD – 500 MHz

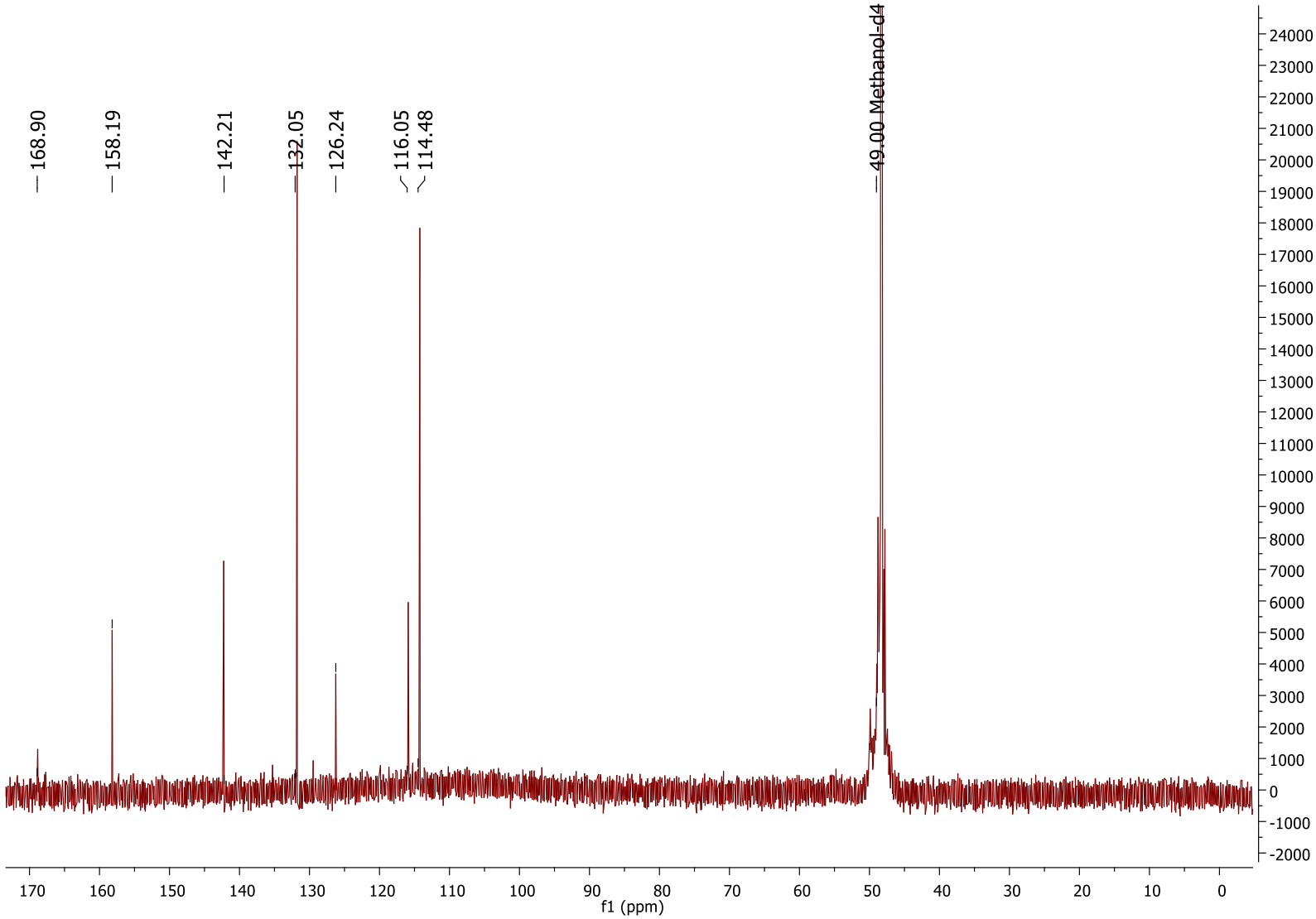


Figura 51. Espectro de ^{13}C do AC-1 em CD_3OD – 125 MHz

A exposição do ácido *p*-cumárico ao sol, assim como ocorreu com o artepelin C, levou à formação de seu isômero *Z* como produto de degradação majoritário. O rendimento da conversão de ácido p-cumárico a AC-1 foi consideravelmente alto (25,6%) em comparação à do artepelin C a ART4 (7,3%). Uma das razões é que o artepelin C se degrada em diversos outros compostos, enquanto o ácido *p*-cumárico gera somente um derivado.

De acordo com Metternich et al (2015) a (-)-riboflavina teve uma de suas ligações duplas isomerizadas de E para Z quando o primeiro destes foi exposto à luz UV, que emite ondas eletromagnéticas em comprimento de onda de 402 nm. Então, os autores propuseram que um mecanismo de reação plausível seria através da formação de radicais como intermediários.

Portanto, considerando-se que a luz do sol possui um espectro composto por 43% de ondas eletromagnéticas em comprimento de onda na região do visível (400-700 nm) e 4% na região Ultra-violeta (320-400 nm) (Zhou et al., 2011), propôs-se o mecanismo de reação da isomerização *E-Z* do ácido *p*-cumárico e do artepelin C (figura 49).

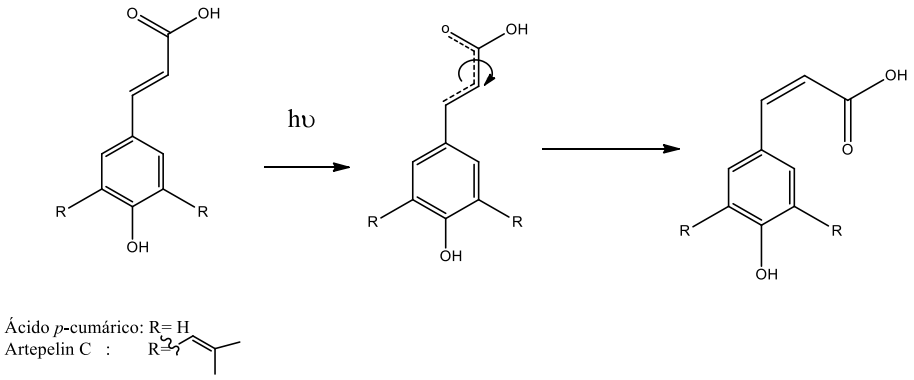


Figura 52. Proposta de mecanismo de reação de conversão *E-Z* do ácido *p*-cumárico e artepelin C por exposição solar

4.3 Desenvolvimento e validação de método analítico em CLAE-FR para quantificação do artepelin C, ácido *p*-cumárico e seus produtos de degradação majoritários em extrato de própolis

Para a quantificação do artepelin C, ácido *p*-cumárico e dos seus produtos de degradação majoritários, um método em CLAE de fase reversa foi desenvolvido e validado. O principal objetivo de se obter um método analítico confiável era utilizá-lo

para quantificação dos padrões e seus principais produtos de degradação nos experimentos de estabilidade.

Para se assegurar a confiabilidade deste método, foram avaliados os seguintes parâmetros de validação: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, robustez e recuperação do método de extração. Para todos os experimentos de validação, consideraram-se os manuais de validação da ANVISA(2017) e do ICH (2005).

4.3.1 Seletividade

Após desenvolvimento e otimização das condições cromatográficas obtiveram-se os tempos de retenção, espectros de UV e resoluções cromatográficas (tabela 17). Os cromatogramas que mostram as análises dos padrões puros e no extrato metanólico de própolis em 300 nm se encontram nas figuras 50 e 51, respectivamente. A resolução cromatográfica foi calculada considerando-se a banda subsequente à deste, exceto em relação ao último composto no cromatograma.

Avaliando-se então estes parâmetros, pode ser observado que o método possui seletividade para os padrões analisados, tanto no extrato de própolis, quanto para os compostos isolados, pois a resolução cromatográfica entre todas as bandas de interesse apresenta Rs> 1,25, o que é suficiente para análises quantitativas (Collins et al., 2006). Consequentemente, análises qualitativas também podem ser feitas de forma eficiente: o espectro de UV de cada banda cromatográfica associado ao tempo de retenção relativo dos padrões indica a identidade destes compostos no extrato de própolis.

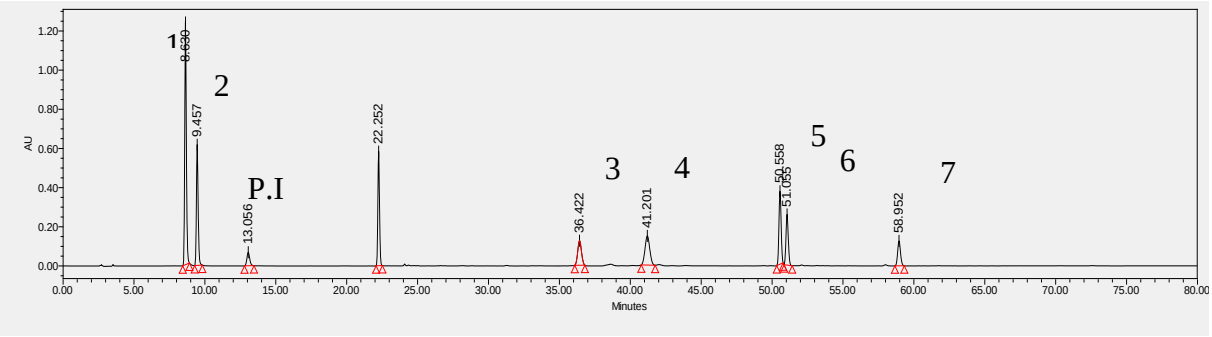


Figura 53. Padrões dos compostos alvo analisados pelo método cromatográfico desenvolvido: 1: ácido *p*-cumárico; 2: AC-1; P.I.: veratraldeído; 3: ART-1; 4: ART-2; 5: artepelin C; 6: ART-4 e 8: ART-3.

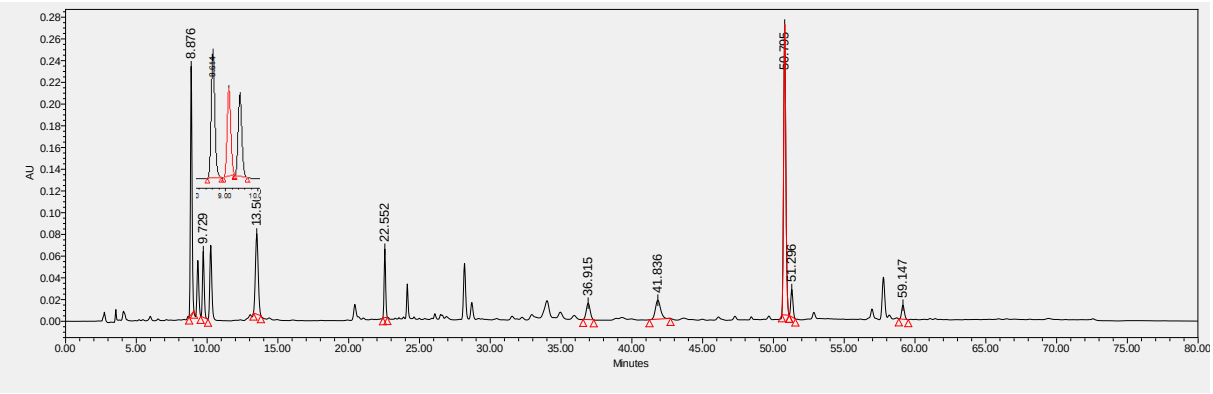


Figura 54. Extrato metanólico de própolis enriquecido com os padrões dos compostos-alvo

4.3.2 Linearidade

Para se avaliar a linearidade do método na faixa de trabalho determinada, soluções dos padrões a cinco diferentes concentrações foram analisadas pelo método em CLAE-FR e uma curva analítica de cada padrão foi construída (figuras 52 a 58) e analisada estatisticamente pelo método dos mínimos quadrados, obtendo-se os valores dos coeficientes de correlação (R) e de determinação (R^2), e também a equação para cálculo da concentração de cada composto.

Os valores de R de todas as curvas analíticas estão acima de 0,999 (tabela 17), o que indica que há linearidade, conforme estabelecido pela ANVISA (2017) e pelo ICH (2005).

Para se estabelecerem os limites de detecção e quantificação, diferentes soluções dos padrões foram preparadas em concentrações abaixo do menor ponto da curva analítica e analisadas pelo método em CLAE-FR. O limite de detecção foi considerado como a menor concentração que é possível distinguir o pico cromatográfico do analito da linha de base. Já o limite de quantificação, a menor concentração na qual o método consegue quantificar a amostra com precisão e exatidão, considerando-se o limite de 5%. Os limites de detecção e quantificação também foram comparados aos valores estimados obtidos. Como se pode observar na tabela 18, os limites de detecção obtidos experimentalmente são muito próximos aos valores estimados e o mesmo ocorre com os limites de quantificação obtidos experimentalmente. Portanto, o método é capaz de quantificar amostras com precisão e exatidão mesmo em concentrações baixas.

Além disso, foram realizadas análises dos resíduos, confirmando-se a homoscedasticidade dos dados (tabelas 19 e 20), uma vez que não há tendência dos valores de resíduos. Também, as curvas analíticas não possuem falta de ajuste “lack of it” ($p>0,05$) (tabela 21) e seus coeficientes angulares são estatisticamente diferentes de zero ($p<0,05$).

Tabela 17. Parâmetros cromatográficos, espectros de UV dos padrões e dados das curvas analíticas

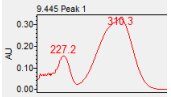
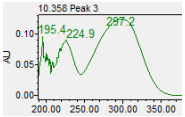
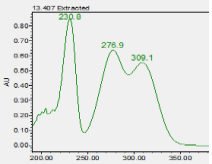
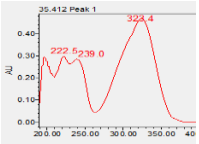
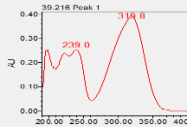
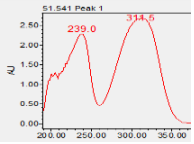
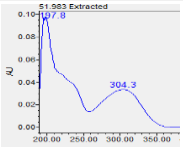
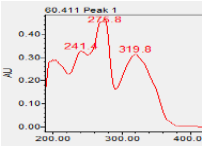
Composto	Tempo de retenção (min.)	Tempo de retenção relativo (trr)	Resolução	Espectro de UV	Comp. de onda de absorção máxima	Equação	R^2	R
Ácido *p*-cumárico	8,6	0,66	1,40		310,3; 227,2	y=0,0193 +0,1073x	0,9999	0,9999
AC-1	9,4	0,72	1,52		297,2; 224,9	y=0,0138 +0,0494x	0,9998	0,9999
PI (Veratraldeído)	13,1	1	-		230,8; 276,9; 309,1	-	-	-
ART1	36,4	2,79	1,55		323,4; 239,0; 222,5	y=0,0023 +0,0242x	0,9989	0,9994
ART2	41,2	3,15	1,52		319,8; 239,0; 222,5	y=-0,0026+0,0412x	0,9994	0,9997
Artepelin C	50,6	3,86	1,42		311,5; 239,0; 222,5	y= 0,0116+0,0383x	0,9997	0,9998
ART-4	51,1	3,90	3,98		304,3	y=0,0037 +0,0287x	0,9998	0,9999
ART3	58,9	4,51	2,86		275,8; 241,4; 319,8	y=0,0002 +0,0177x	0,9997	0,9998

Tabela 18. Limites de detecção e quantificação das curvas analíticas dos padrões e seus produtos de degradação majoritários

	Ácido *p*-cumárico		AC-1		ART1		ART2		Artepelin C		ART4		ART3	
	Est	**Exp**	**Est**	**Exp**	**Est**	**Exp**	**Est**	**Exp**	**Est**	**Exp**	**Est**	**Exp**	**Est**	**Exp**
Limite de detecção (μg/mL)	0,35	0,34	0,35	0,38	1,32	0,35	0,80	0,31	0,96	0,38	0,68	0,36	1,21	0,36
Limite de quantificação (μg/mL)	1,06	1,2	1,11	0,6	4,01	01,2	2,42	1,2	2,90	0,6	2,06	1,2	3,68	0,6

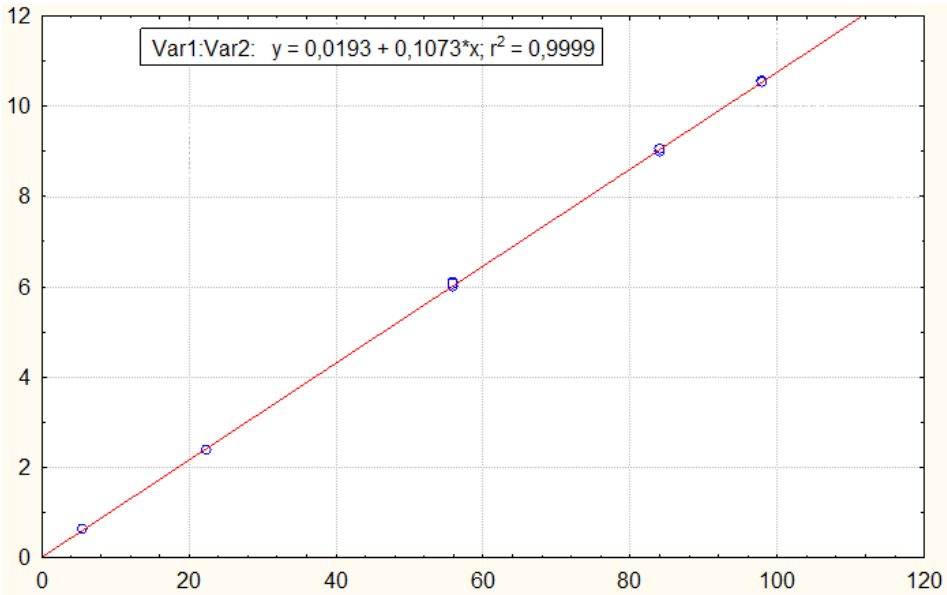


Figura 55. Curva analítica do ácido *p*-cumárico

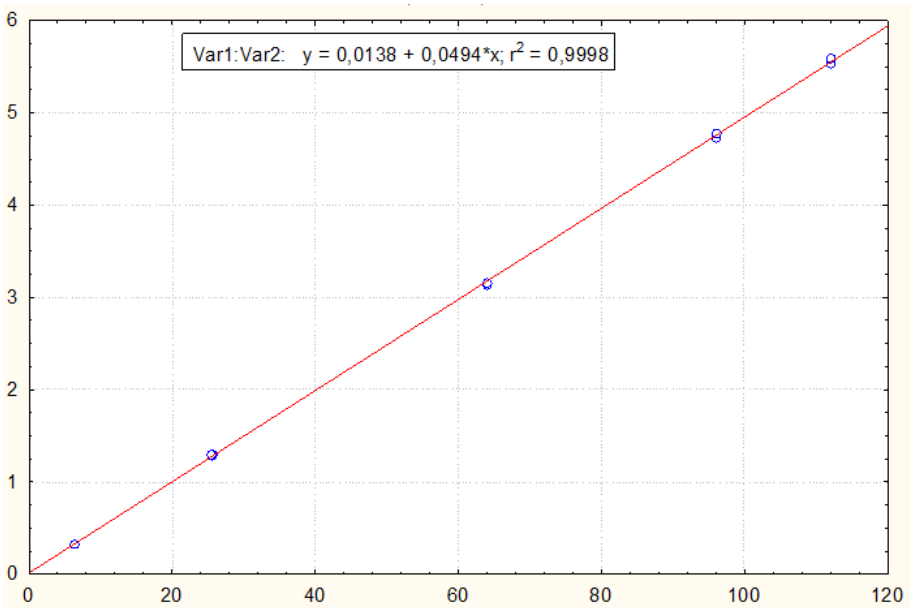


Figura 56. Curva analítica do AC-1

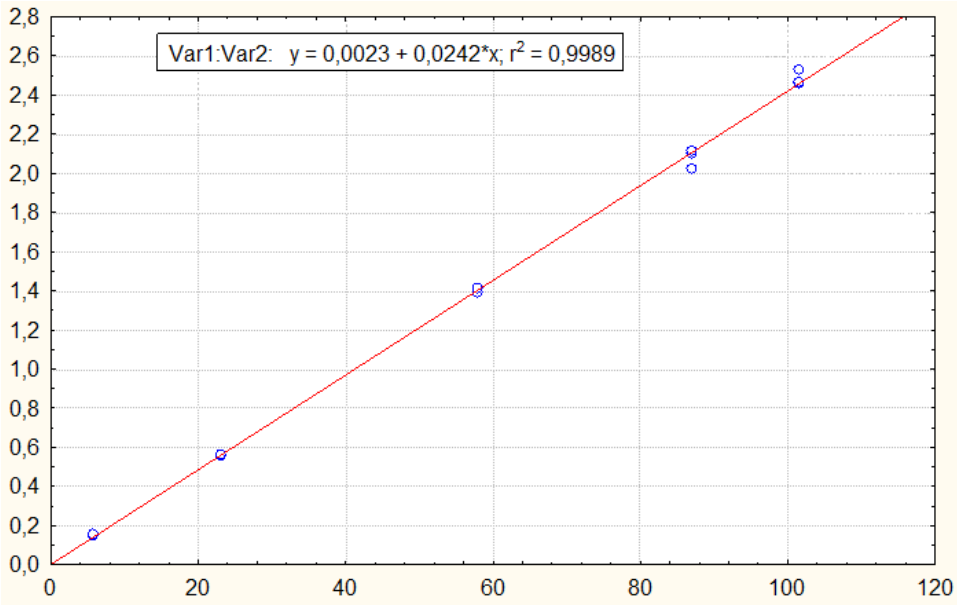


Figura 57. Curva analítica do ART1

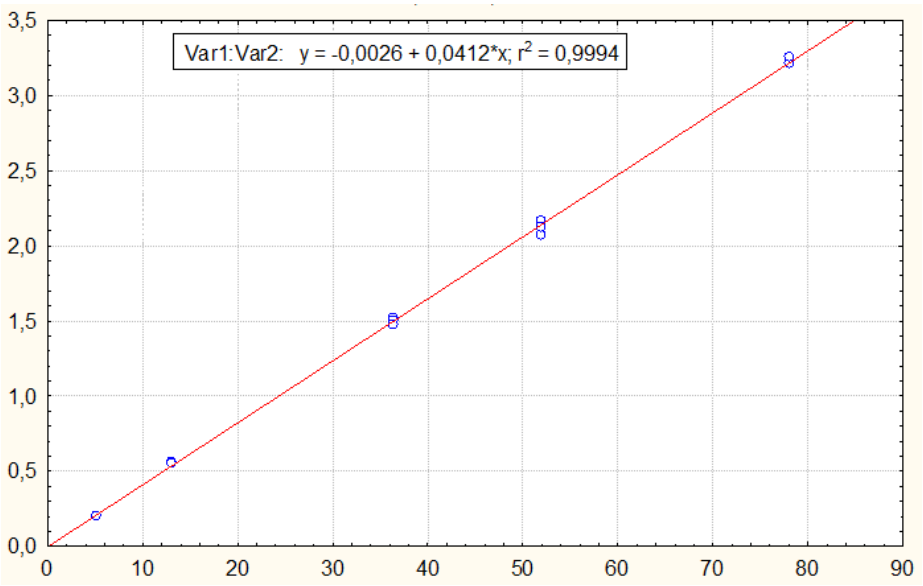


Figura 58. Curva analítica do ART2

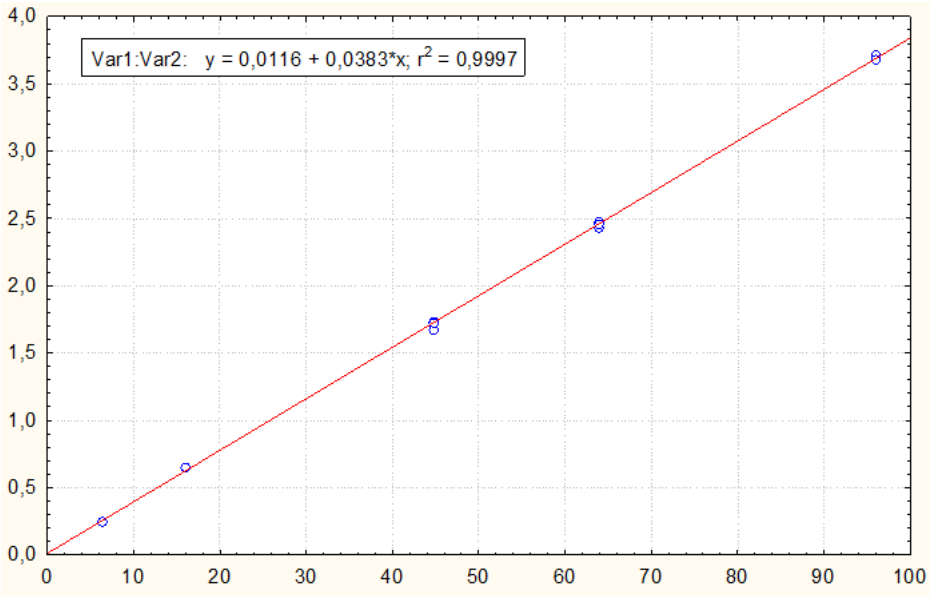


Figura 59. Curva analítica do artepelin C

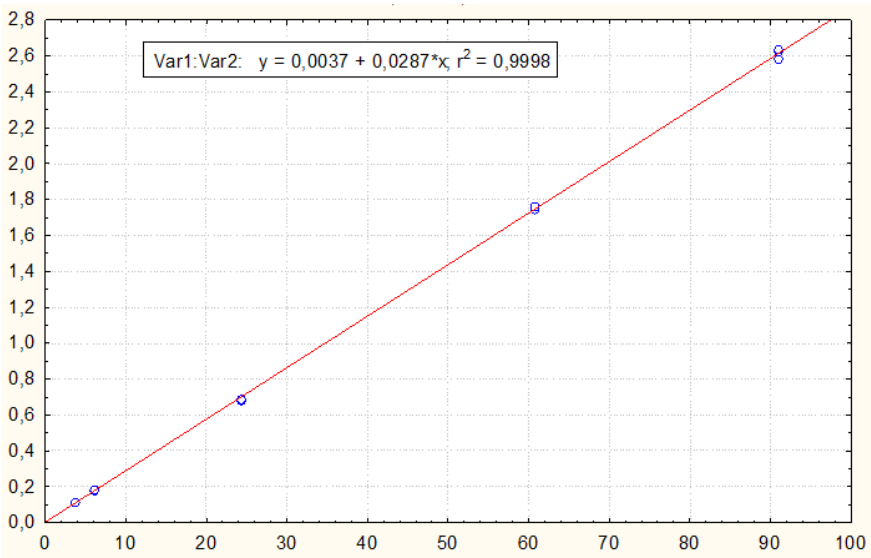


Figura 60. Curva analítica do ART4

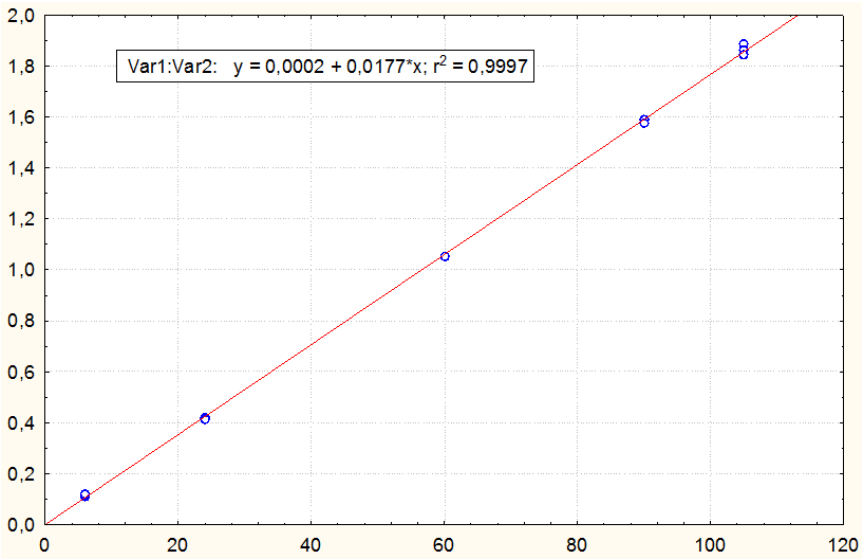


Figura 61. Curva analítica do ART3

Tabela 19. Resíduos das curvas analíticas do artepelin C, ART4, ácido *p*-cumárico e AC-1

Ponto da curva	Artepelin C			ART4			Ácido *p*-cumárico			AC-1		
	Valor observado	Valor Predito	Resíduos	Valor observado	Valor Predito	Resíduos	Valor observado	Valor Predito	Resíduos	Valor observado	Valor Predito	Resíduos
1.1	0,248791	0,256690	-0,007899	0,110337	0,108193	0,002144	0,63443	0,62036	0,014067	0,327544	0,329964	-0,002420
1.2	0,243075	0,256690	-0,013616	0,111374	0,108193	0,003181	0,63461	0,62036	0,014244	0,330050	0,329964	0,000087
1.3	0,247647	0,256690	-0,009043	0,111750	0,108193	0,003557	0,64034	0,62036	0,019979	0,328908	0,329964	-0,001056
2.1	0,649328	0,624271	0,025056	0,181971	0,177862	0,004109	2,39699	2,42355	-0,026564	1,288727	1,278523	0,010204
2.2	0,650193	0,624271	0,025922	0,180779	0,177862	0,002917	2,38996	2,42355	-0,033593	1,297639	1,278523	0,019117
2.3	0,650630	0,624271	0,026359	0,185488	0,177862	0,007626	2,39108	2,42355	-0,032469	1,303136	1,273582	0,029554
3.1	1,730841	1,727014	0,003827	0,688215	0,700378	-0,012163	5,99469	6,02993	-0,035235	3,150806	3,175640	-0,024834
3.2	1,672334	1,727014	-0,054680	0,682078	0,700378	-0,018300	6,10032	6,02993	0,070398	3,129936	3,175640	-0,045704
3.3	1,726258	1,727014	-0,000757	0,685654	0,700378	-0,014723	6,06118	6,02993	0,031250	3,155764	3,175640	-0,019876
4.1	2,432894	2,462176	-0,029282	1,745125	1,745410	-0,000285	9,03798	9,03524	0,002744	4,738768	4,756571	-0,017804
4.2	2,475406	2,462176	0,013230	1,760122	1,745410	0,014712	8,99159	9,03524	-0,043653	4,725779	4,756571	-0,030793
4.3	2,453023	2,462176	-0,009153	1,763790	1,745410	0,018380	9,05837	9,03524	0,023135	4,780671	4,756571	0,024100
5.1	3,694809	3,687446	0,007363	2,622186	2,616270	0,005916	10,56002	10,53790	0,022128	5,572993	5,547037	0,025956
5.2	3,715184	3,687446	0,027738	2,634742	2,616270	0,018472	10,53675	10,53790	-0,001145	5,534461	5,547037	-0,012577
5.3	3,682379	3,687446	-0,005067	2,580727	2,616270	-0,035543	10,51261	10,53790	-0,025286	5,593084	5,547037	0,046047

Os pontos da curva de 1 a 5 se referem às concentrações, sendo estas da mais baixa (1) a mais alta (5). Os números após os pontos da curva se referem às replicatas, sendo estas de 1 a 3.

Tabela 20. Resíduos das curvas analíticas do ART1, ART2 e ART3

Ponto da curva	ART1			ART2			ART3		
	Valor observado	Valor Predito	Resíduos	Valor observado	Valor Predito	Resíduos	Valor observado	Valor Predito	Resíduos
1.1	0,145439	0,142550	0,002889	0,200244	0,211856	-0,011612	0,111036	0,106222	0,004814
1.2	0,153862	0,142550	0,011312	0,203476	0,211856	-0,008380	0,115082	0,106222	0,008860
1.3	0,154903	0,142550	0,012352	0,204196	0,211856	-0,007659	0,119879	0,106222	0,013656
2.1	0,564383	0,563230	0,001153	0,558440	0,533549	0,024892	0,417973	0,424272	-0,006299
2.2	0,557131	0,563230	-0,006099	0,553231	0,533549	0,019683	0,421058	0,424272	-0,003214
2.3	0,564028	0,563230	0,000798	0,552284	0,533549	0,018736	0,414590	0,424272	-0,009682
3.1	1,387014	1,404589	-0,017575	1,516208	1,498628	0,017580	1,053598	1,060372	-0,006774
3.2	1,393368	1,404589	-0,011221	1,496910	1,498628	-0,001718	1,052754	1,060372	-0,007618
3.3	1,409276	1,404589	0,004687	1,473989	1,498628	-0,024639	1,053806	1,060372	-0,006565
4.1	2,023956	2,105722	-0,081766	2,074747	2,142015	-0,067268	1,591858	1,590455	0,001403
4.2	2,101517	2,105722	-0,004205	2,164339	2,142015	0,022324	1,589585	1,590455	-0,000869
4.3	2,111173	2,105722	0,005450	2,120149	2,142015	-0,021866	1,576064	1,590455	-0,014391
5.1	2,455305	2,456288	-0,000984	3,212724	3,214325	-0,001602	1,886802	1,855496	0,031306
5.2	2,529045	2,456288	0,072757	3,213573	3,214325	-0,000752	1,861860	1,855496	0,006364
5.3	2,466741	2,456288	0,010453	3,256606	3,214325	0,042281	1,844505	1,855496	-0,010991

Os pontos da curva de 1 a 5 se referem às concentrações, sendo estas da mais baixa (1) a mais alta (5). Os números após os pontos da curva se referem às replicatas, sendo estas de 1 a 3.

Tabela 21. Valores de p das análises de falta de ajuste “lack of fit” das curvas analíticas

Falta de ajuste “lack of fit"	Ácido *p*-cumárico	AC-1	ART1	ART2	Artepelin C	ART4	ART3
Valor de p	0,19	0,07	0,18	0,18	0,06	0,16	0,12

4.3.3 Precisão e Exatidão

A exatidão do método (tabela 22), em todas as análises, se encontrou acima de 97,9%, exceto para o artepelin C no nível baixo, o qual demonstrou exatidão igual a 94,51%. Esses dados mostram que, conforme os manuais da ANVISA (2017) e do ICH (2005) o método é capaz de fornecer resultados exatos, ou seja, os valores de concentração calculados são satisfatoriamente próximos dos valores reais.

Em relação à precisão (tabela 22), tanto os dados da precisão intra dias quanto da precisão inter dias demonstram que o desvio padrão relativo das respostas foram menores que 5% para todos os padrões, ou seja, houve pouca variação entre os resultados, o que indica que o método possui boa repetibilidade. Portanto, de acordo com a ANVISA (2017) e com o ICH (2005) o método é preciso e exato.

Tabela 22. Dados de precisão e exatidão do método

Nível	Ácido *p*-cumárico	AC-1	Artepelin C	ART1	ART2	ART3	ART4
			Exatidão				
Alto	100,49	98,86	100,16	98,64	99,40	99,30	100,77
Médio	98,55	101,87	99,00	100,47	98,35	98,68	97,99
Baixo	101,40	99,40	94,51	108,85	98,80	109,55	102,22
			Precisão (Intra dias) DR%				
Alto	0,88	0,43	0,87	0,82	2,11	0,05	0,45
Médio	0,16	0,56	1,90	0,73	1,41	0,77	0,52
Baixo	0,53	0,38	1,23	3,43	1,04	3,84	0,34
			Precisão (Inter dias) DR%				
Alto	0,71	0,32	1,11	1,72	1,64	0,17	0,45
Médio	0,13	0,87	1,52	0,61	2,60	0,74	0,38
Baixo	0,45	0,58	1,53	2,50	0,83	2,73	1,62

A precisão e exatidão das cinco soluções preparadas em concentrações abaixo do menor ponto da curva analítica também foram determinadas, uma vez que através destes parâmetros se determinou o limite de quantificação dos padrões. O ácido *p*-cumárico nas concentrações de 0,36 e 0,6 não possui exatidão acima de 95%, portanto seu limite de quantificação é 1,2 μg/mL. O mesmo ocorre com o ART1, ART2 e ART4, sendo também 1,2 μg/mL o limite de quantificação destes compostos. Já o AC-1, artepelin C e ART3 não possuem exatidão acima de 95% a 0,36 μg/mL, sendo então 0,6 μg/mL o limite de quantificação de tais compostos.

Todos os padrões em todas as concentrações avaliadas (de 0,36 a 6,0 μg/mL) possuem precisão inter e intra dias, pois o Desvio Padrão Relativo em porcentagem das análises foram todos abaixo de 5%.

Tabela 23. Precisão e exatidão dos padrões nas concentrações de 0,36 a 6,0 μg/mL

Concentração (mg/mL)	**Ácido *p*-cumárico**	**AC-1**	**Artepelin C**	**ART1**	**ART2**	**ART3**	**ART4**
			Exatidão				
0,36	82,30	89,61	85,70	100,09	82,977	86,05	80,97
0,6	91,18	97,17	94,56	78,96	87,99	95,88	91,41
1,2	109,91	107,55	108,85	107,31	108,28	110,58	111,87
3,6	101,14	99,26	99,26	101,84	103,72	98,19	100,68
6,0	99,37	99,96	99,24	99,12	98,76	100,12	99,72
			Precisão (Intra dias) DR%				
0,36	0,93	2,06	1,28	1,99	1,27	0,38	0,99
0,6	0,66	0,29	0,40	1,90	0,92	2,63	1,70
1,2	0,94	0,45	2,13	0,94	0,14	0,86	1,13
3,6	0,35	0,94	0,93	0,53	1,29	0,40	0,68
6,0	0,53	0,38	1,23	3,43	1,04	3,84	0,34
			Precisão (Inter dias) DR%				
0,36	0,67	1,85	1,10	1,54	1,93	0,37	1,24
0,6	0,47	0,51	1,12	1,70	1,16	2,38	1,40
1,2	0,77	0,38	1,59	1,07	0,52	1,07	0,92
3,6	0,46	0,77	1,21	0,49	1,02	0,38	0,54
6,0	0,45	0,58	1,53	2,45	0,83	2,73	1,62

4.3.4 Recuperação

O método de extração utilizado se mostrou adequado, uma vez que através deste foi possível extrair mais de 86% do AC-1 e mais de 90% dos outros padrões nos níveis alto, médio e baixo (tabela 24). Os ensaios de recuperação permitem avaliar quanto de cada padrão o método de extração é capaz de recuperar da matriz, que neste caso é a própolis verde bruta. Através destes resultados é possível se determinar também a exatidão do método de extração. Considerando-se que a porcentagem de extração foi satisfatória e que o desvio padrão relativo em porcentagem foi abaixo de 5%, conforme a ANVISA (2017), o método de extração se mostrou adequado.

Tabela 24. Recuperação do método de extração

Padrão	Nível	Recuperação do Método de Extração (%)	DP (%)
Ácido *p*-cumárico	**Alto**	99,31	1,38
	Médio	97,69	2,36
	Baixo	100,13	0,85
AC-1	**Alto**	91,09	0,53
	Médio	92,06	0,93
	Baixo	86,36	1,14
ART1	**Alto**	100,63	1,47
	Médio	100,75	0,86
	Baixo	102,86	0,38
ART2	**Alto**	97,55	0,94
	Médio	94,94	0,31
	Baixo	91,60	0,85
Artepelin C	**Alto**	97,94	0,83
	Médio	98,03	0,77
	Baixo	96,96	0,69
ART4	**Alto**	99,75	1,38
	Médio	98,63	0,25
	Baixo	96,95	0,94
ART3	**Alto**	101,01	0,48
	Médio	114,03	1,17
	Baixo	105,39	0,07

4.3.5 Robustez

Em relação à robustez do método, esta também foi avaliada em três níveis: alto, médio e baixo, considerando-se o comprimento de onda do detector, a temperatura do forno, o volume de injeção e a vazão da fase móvel.

Na maioria dos experimentos levando-se em conta a concentração (área do padrão/área do padrão interno), o coeficiente de variação não foi significativamente alto, se encontrando entre -6,4 e 9,98%, sendo a temperatura do forno o fator que mais provocou alterações (desvios entre -17,6 e 9,98%). Tal fator provocou alterações de 17,6% na concentração do ART 2 no nível alto (tabela 25). Estas variações estão entre os níveis aceitáveis (variações de até 20%) (Moreira et al., 2013; Souza et al., 2013) e o método em questão pode ser considerado robusto. Entretanto, para que não ocorram erros de quantificação, principalmente do ART2, a temperatura do forno deve ser ajustada adequadamente. No que diz respeito aos outros fatores, estes suscitaram variações abaixo ou por volta de 10%.

Os tempos de retenção relativos não sofreram variações significativas de seus valores nominais (todas estão abaixo de 5%) (tabela 25).

Tabela 25. Robustez do método cromatográfico

	Nível Baixo			Nível Médio			Nível alto		
	Concentração		Trr	Concentração		Trr	Concentração		Trr
	Ácido *p*-cumárico								
	Resposta	CV%	CV%	Resposta	CV%	CV%	Resposta	CV%	CV%
λ	-0,04	-6,75	0,10	-0,26	-6,04	0,04	-0,53	-5,00	0,07
Temp	0,00	0,42	-0,95	-0,06	-1,46	-1,08	-0,41	-3,87	-0,98
Vinj	-0,02	-3,14	0,01	-0,06	-1,51	0,07	-0,45	-4,21	0,09
Vazão	0,05	8,56	0,65	0,32	7,34	0,67	0,21	1,95	0,70
	AC-1								
λ	-0,02	-6,51	0,09	-0,17	-7,54	0,05	-0,02	-0,38	0,03
Temp	0,00	1,17	-0,95	-0,05	-2,24	-1,03	-0,55	-10,83	-0,95
Vinj	-0,01	-1,75	0,02	-0,03	-1,36	0,09	-0,23	-4,50	0,11
Vazão	0,02	4,95	0,67	0,12	4,94	0,67	0,22	4,43	0,77
	ART 1								
λ	-0,01	-5,4	0,12	0,00	0,34	0,12	-0,03	-1,38	0,22
Temp	-0,01	-9,70	3,81	-0,09	-9,38	4,02	-0,17	-7,67	3,99
Vinj	-0,01	-7,30	3,19	-0,03	-3,35	-0,55	-0,10	-4,65	-0,47
Vazão	0,01	7,48	-0,86	-0,04	-3,89	3,07	0,14	6,26	3,31
	ART 2								
λ	0,00	1,20	0,10	0,02	1,22	0,06	-0,09	-2,78	0,23
Temp	-0,02	-11,11	2,93	-0,09	-6,42	3,14	-0,58	-17,59	3,06
Vinj	-0,01	-2,82	-0,12	-0,04	-2,93	-0,47	-0,19	-5,84	-0,42
Vazão	-0,01	-4,67	2,77	-0,02	-1,09	2,65	0,28	8,56	2,87
	ARTEPELIN C								
λ	-0,01	-2,76	0,11	-0,04	-2,19	0,18	-0,34	-8,82	0,12
Temp	0,01	5,12	5,31	-0,01	-0,80	5,45	-0,38	-9,98	5,55
Vinj	-0,00	-1,04	-0,24	-0,01	-0,72	-0,58	-0,24	-6,20	-0,41
Vazão	0,02	9,47	5,97	0,09	5,16	5,84	0,12	3,19	6,18
	ART 4								
λ	-0,01	-5,17	0,11	-0,01	-0,51	0,16	-0,19	-7,21	0,09
Temp	-0,01	-6,84	5,10	-0,10	-8,69	5,23	-0,27	-10,04	5,35
Vinj	0,00	-1,32	-0,22	-0,07	-6,11	-0,57	-0,15	-5,58	-0,38
Vazão	0,00	-0,26	5,93	-0,05	-4,78	5,80	0,08	2,96	6,14
	ART 3								
λ	0,01	5,50	0,09	0,01	1,05	0,15	-0,01	-0,99	0,04
Temp	0,00	-1,92	4,87	0,01	1,01	5,02	-0,15	-9,71	5,14
Vinj	0,00	-2,77	-0,19	0,03	4,13	-0,52	0,00	-0,19	-0,33
Vazão	0,00	-1,16	5,91	0,04	6,81	5,78	0,09	6,18	6,13

4.4 Estabilidade do artepelin C e do ácido *p*-cumárico

4.4.1 Determinação dos principais fatores responsáveis pela degradação do artepelin C e do ácido *p*-cumárico

Após o desenvolvimento e validação do método analítico, foram feitos os experimentos de estabilidade do artepelin C e do ácido p-cumárico. Estes foram

executados em quatro tempos diferentes, sendo estes em 7, 24, 21 e 30 dias para se determinarem quais os principais fatores que afetam significativamente a concentração destes compostos com o passar do tempo.

Para tais experimentos utilizou-se o “Full Factorial Design” (planejamento fatorial completo) para se definirem as condições experimentais de cada experimento. Para processamento dos resultados, empregou-se o modelo de interação entre dois fatores, já que os valores de R, que indicam o ajuste dos dados ao modelo matemático, foram maiores do que 0,95 em todos os experimentos. Nos experimentos sem a presença do oxigênio do ar, as amostras foram armazenadas em nitrogênio.

Considerando significativos valores de p abaixo de 0,05 (obtidos por análise de variâncias por ANOVA), a presença de luz, altas temperaturas (40 ºC), oxigênio do ar e a combinação destes fatores não afetaram a concentração de ácido *p*-cumárico. Porém, após 30 dias de exposição deste composto à luz + alta temperatura, aproximadamente 15% de seu conteúdo sofreram degradação (tabela 26, figuras 60 e 62).

Em relação ao artepelin C, ambos a combinação de luz e temperatura e estes fatores separadamente influenciaram de forma significativa a concentração deste composto. Após sete dias de exposição à luz, 22,5% de seu conteúdo sofreram degradação e, após 14,21 e 30 dias, 52,9; 54,9 e 88,5% de seu conteúdo foram perdidos, respectivamente (tabela 26). Da mesma forma, a presença de luz à temperatura de 40 ºC provocou degradação de 94,0; 98,9; 98,6 e 98,1% após 7,14,21 e 30 dias, respectivamente (tabela 26, figura 59 e figura 61), o que mostra que em um curto período de tempo, quase todo o artepelin C sofreu degradação nestas condições. A alta temperatura por si só foi capaz de provocar a degradação do artepelin C, porém em menor proporção. Após 14, 21 e 30 dias de exposição, 19,97; 20,0 e 37,12% foram degradados, respectivamente. A presença ou ausência de oxigênio não afetou de forma significativa a concentração dos compostos estudados. Então, a desejabilidade, conforme observado na figura 59, está em função da luz e da temperatura, sendo que na menor temperatura experimentalmente testada, combinada com ausência de luz houve menor degradação do composto alvo.

Ao se observarem os resultados obtidos, verificou-se que a luz foi o fator que mais influenciou na estabilidade do artepelin C e, quando combinado com altas

temperaturas, causa degradação em grandes proporções do artepelin C e afeta também a concentração do ácido *p*-cumárico. O que provavelmente acontece nesse caso, é que a energia fornecida pela luz e pelo calor é capaz de catalisar reações de degradação, principalmente reações oxidativas nos grupamentos prenila, que estão presentes no artepelin C. A estrutura química e a estabilidade térmica do composto estão diretamente relacionadas e, quanto mais substituintes presentes no anel aromático, menor a estabilidade do composto fenólico (Liazid et al., 2007; Turek and Stintzing, 2013).

Azeredo et al (2009) avaliaram a estabilidade da betalaína e descreveram que a estabilidade de tal composto é inversamente proporcional à sua estabilidade à intensidade de luz entre 2200 a 4400 lux devido à luz UV ou visível ser capaz de levar os elétrons π das ligações duplas à um estado de maior energia π^*, consequentemente aumentando a reatividade e/ou diminuindo a energia de ativação necessária para que as reações de degradação ocorram. Tais reações geralmente são de isomerização, decarboxilação, desidrogenação ou clivagem. Os produtos de degradação podem ainda apresentar mais ligações duplas do que os compostos de origem.

O artepelin C, como possui substituintes no anel aromático, as prenilas, é mais suscetível à degradação e, assim como a betalaína, possui ligações duplas nos substituintes, o que torna tal composto pouco estável quando exposto ao calor e à luz. Portanto, para se preservar o conteúdo deste composto, sugerem-se condições de armazenamento que protejam a amostra da luz e em temperaturas baixas.

Os produtos de degradação AC-1, ART1, ART2, ART3 e ART4 foram detectados em alguns experimentos em baixas concentrações (abaixo de 1,24 μg/mL). Tais compostos também não parecem ser estáveis nas condições experimentais de luz e temperatura, pois continuam sendo formados e degradados conforme o tempo de exposição.

Tabela 26. Valores de p das análises de ANOVA dos experimentos do "Full Factorial Design" considerando a presença ou ausência de luz, alta temperatura e oxigênio do ar na concentração do artepelin C e do ácido *p*-cumárico

Fator	Composto	7 dias			14 dias			21 dias			30 dias		
		Valor de p	R	Concentration (µg/mL)	Valor de p	R	Concentration (µg/mL)	Valor de p	R	Concentration (µg/mL)	Valor de p	R	Concentration (µg/mL)
Valor Nominal (sem presença de 1, 2 or 3)	Artepelin C			50,55 ± 6,31			52,53 ± 6,28			42,69 ± 0,01			53,37 ± 1,45
	Ácido *p*-cumárico			42,82 ± 1,58			43,20 ± 0,77			43,37 ± 1,48			41,35 ± 2,48
(1)Luz	Artepelin C	0,0055	0,999	39,17 ± 6,77	0,0066	0,999	24,75 ± 8,54	0,0091	0,999	19,25 ± 0,02	0,0079	0,999	7,20 ± 0,92
	Ácido *p*-cumárico	0,1370	0,989	41,94 ± 3,48	0,3652	0,972	43,88 ± 0,16	0,4028	0,953	41,92 ± 0,16	0,1572	0,983	41,90 ± 0,54
(2)Temperatura	Artepelin C	0,0094	0,999	50,36 ± 2,25	0,0122	0,999	42,04 ± 3,66	0,0159	0,999	34,15 ± 1,01	0,0248	0,999	33,56 ± 2,17
	Ácido *p*-cumárico	0,1949	0,989	42,49 ± 0,42	0,2308	0,972	42,70 ± 2,11	0,4583	0,953	42,08 ± 0,85	0,2706	0,983	42,99 ± 0,51
(3)Oxigênio	Artepelin C	0,8004	0,999	51,22 ± 30,26	0,0839	0,999	53,56 ± 2,30	0,1641	0,999	43,85 ± 2,96	0,4096	0,999	53,69 ± 0,76
	Ácido *p*-cumárico	0,4505	0,989	42,94 ± 1,20	0,6607	0,972	42,52 ± 1,53	0,4119	0,953	41,03 ± 0,96	0,6044	0,983	42,77 ± 1,02
1 + 2 + 3	Artepelin C			2,70 ± 1,73			5,44 ± 7,63			1,73 ± 2,84			1,00 ± 0,02
	Ácido *p*-cumárico			35,24 ± 2,38			39,95 ± 0,79			45,02 ± 3,46			34,93 ± 5,49
1 by 2	Artepelin C	0,0094	0,999	3,02 ± 1,82	0,0332	0,999	0,74 ± 1,04	0,0455	0,999	0,75 ± 1,06	0,0497	0,999	1,00 ± 0,19
	Ácido *p*-cumárico	0,2103	0,989	38,68 ± 1,58	0,2682	0,972	35,29 ± 2,66	0,4397	0,953	38,72 ± 1,04	0,2354	0,983	35,73 ± 3,41
1 by 3	Artepelin C	0,1858	0,999	37,57 ± 7,52	0,0998	0,999	29,35 ± 6,93	0,1361	0,999	24,71 ± 0,01	0,5018	0,999	7,53 ± 7,06
	Ácido *p*-cumárico	0,3722	0,989	41,28 ± 0,35	0,4582	0,972	43,55 ± 0,17	0,6173	0,953	41,52 ± 0,74	0,5377	0,983	39,20 ± 3,11
2 by 3	Artepelin C	0,3876	0,999	51,26 ± 1,19	0,5516	0,999	41,83 ± 4,88	0,1297	0,999	32,36 ± 8,60	0,6281	0,999	35,53 ± 4,98
	Ácido *p*-cumárico	0,5639	0,989	42,89 ± 0,96	0,5030	0,972	42,00 ± 1,10	0,3282	0,953	57,31 ± 0,87	0,9158	0,983	41,94± 1,06

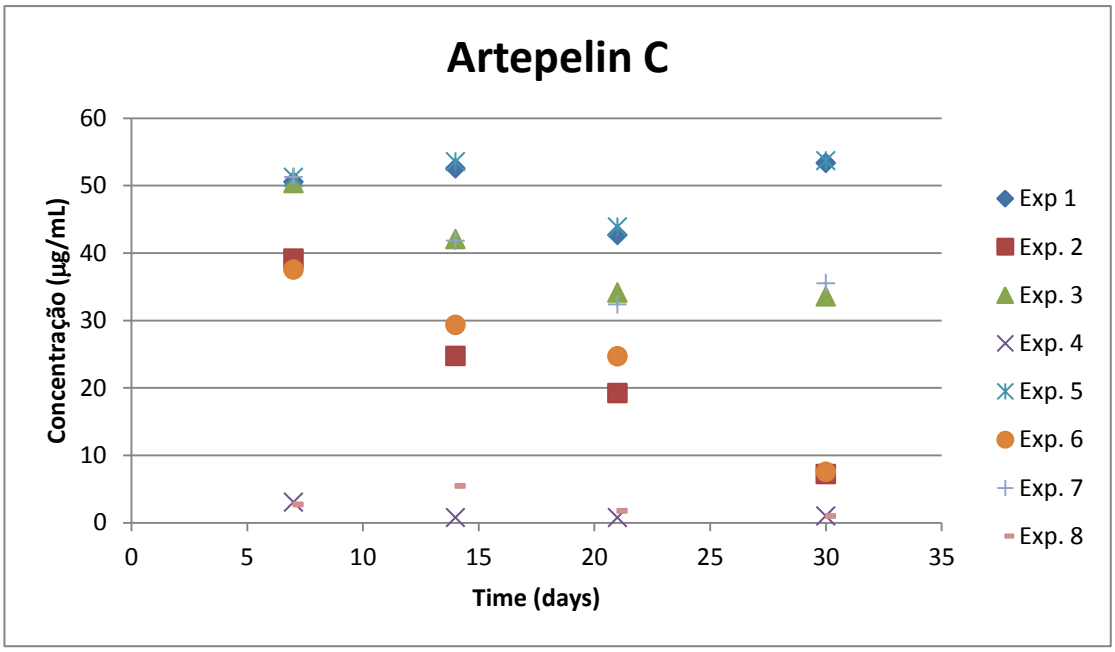


Figura 62. Concentrações do artepelin C nos experimentos de estabilidade após 7,14,21 e 30 dias

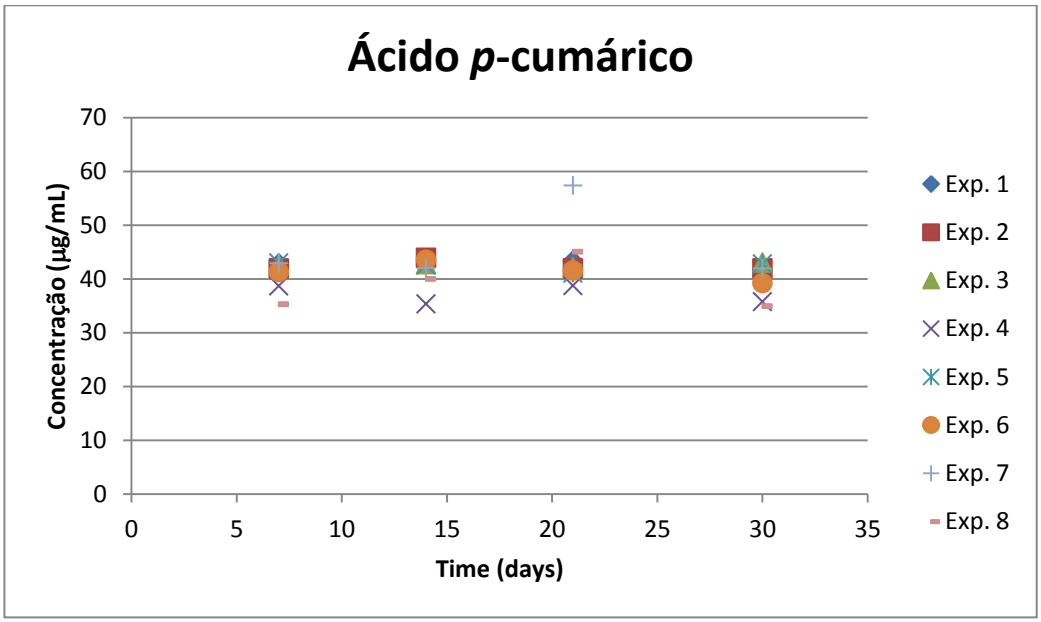


Figura 63. Concentrações do ácido *p*-cumárico nos experimentos de estabilidade após 7,14,21 e 30 dias

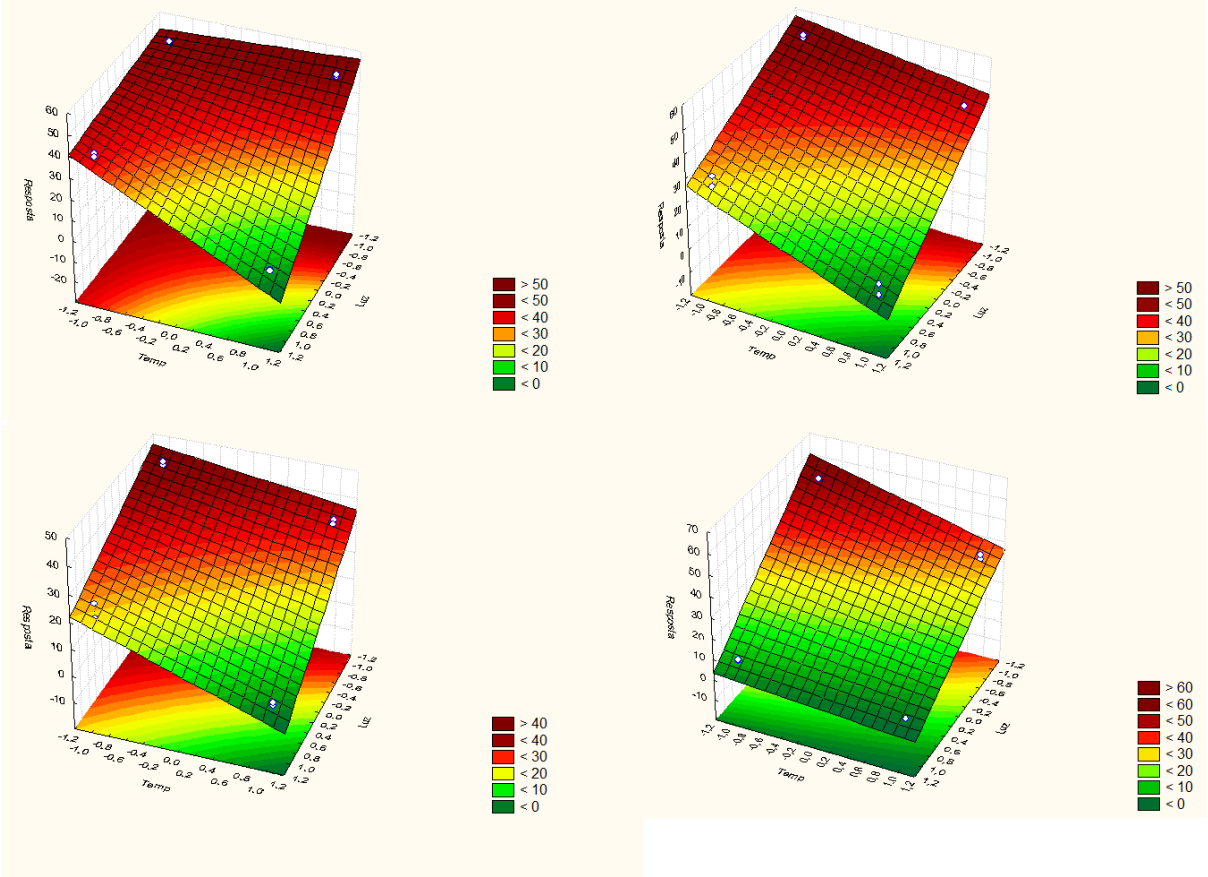


Figura 64. Gráficos de superfície de resposta obtidos dos experimentos de estabilidade do artepelin C após 7,14,21 e 30 dias, respectivamente. -1 corresponde à ausência da variável e +1 presença, exceto para a temperatura, onde -1 corresponde à -18ºC e +1 à 40 ºC. A concentração está expressa em μg/mL.

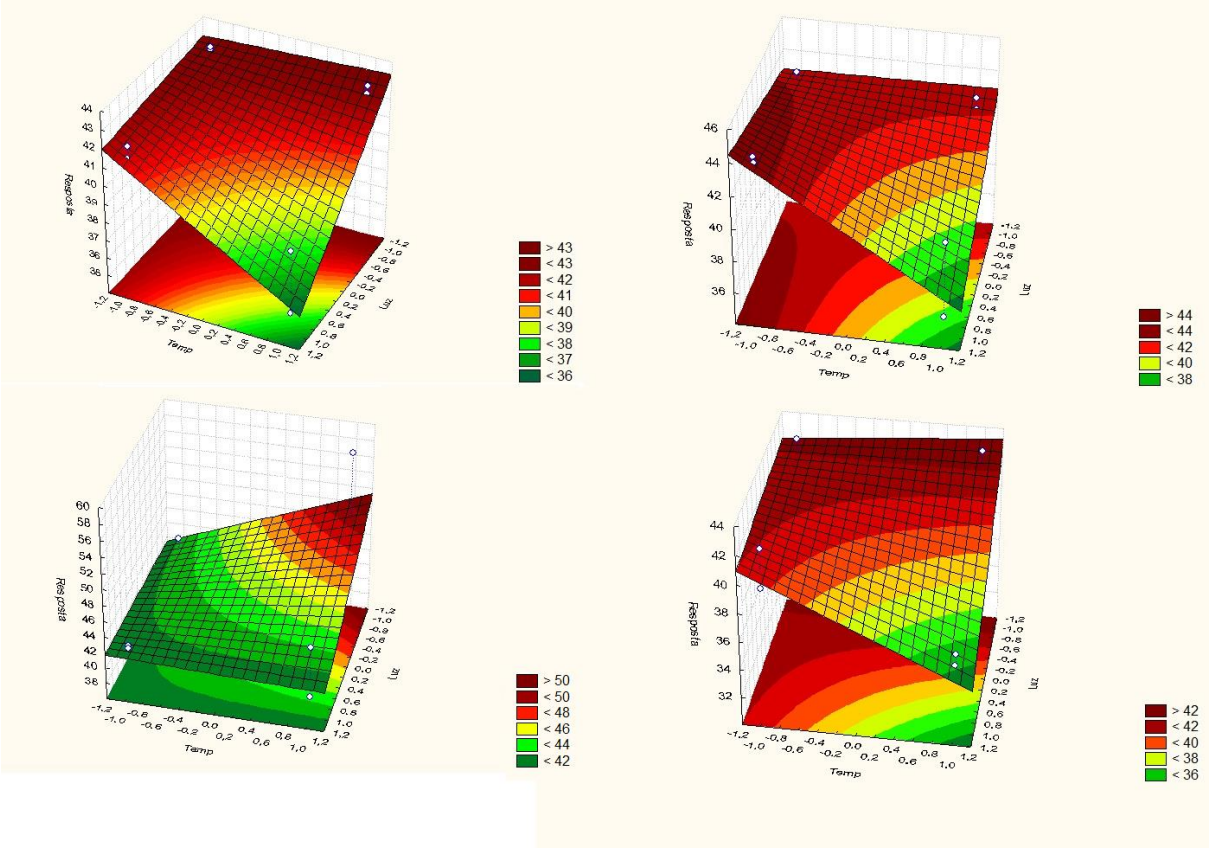


Figura 65. Gráficos de superfície de resposta obtidos dos experimentos de estabilidade do ácido *p*-cumárico após 7,14, 21 e 30 dias, respectivamente. -1 corresponde à ausência da variável e +1 a presença, exceto para a temperatura, onde -1 corresponde à -18ºC e +1 à 40ºC. A concentração está expressa em μg/mL.

4.4.2 Otimização das condições de transporte e armazenamento do artepelin C e do ácido *p*-cumárico

Levando-se em consideração os resultados obtidos, o “Design Experimental” central rotacionado foi utilizado para se estabelecerem as melhores condições de armazenamento e transporte para o artepelin C e para o ácido *p*-cumárico, isolados e na própolis verde bruta. Para tanto, avaliaram-se a influência de dois fatores, sendo estes a temperatura (X_1) e o tempo (X_2). Em todos os experimentos, as amostras foram protegidas da luz, pois os resultados anteriores mostraram que a luz é o principal fator responsável pela degradação destes compostos, principalmente do artepelin C.

Optou-se por se empregar um “Design Experimental” ao invés de se utilizar experimentos que variam um fator por vez, porque uma das principais vantagens é a possibilidade de se estudarem os efeitos da combinação dos fatores avaliados, além da influência de cada um deles, separadamente, o que leva a resultados mais próximos aos reais (Albuquerque et al., 2017). Para o processamento dos dados, o modelo quadrático foi selecionado, uma vez que os valores de R^2 estão consideravelmente próximos de 1 para todas as análises (tabela 27), o que indica que a variável dependente, que neste caso é a concentração dos padrões, é bem explicada por tal modelo matemático. Além disso, os valores das análises de “lack of fit” estão todos acima de 0,05, mostrando que o modelo é adequado para processamento dos resultados e possui boa previsibilidade considerando o puro erro. Destes dados, obteve-se também a equação polinomial empírica de cada análise. Tais equações fornecem a resposta preditiva, onde y corresponde à concentração em μg/mL (variável dependente); X_1 à temperatura em ºC e X_2 ao tempo em dias (variáveis independentes).

Considerando-se a concentração de artepelin C isolado, a temperatura foi estatisticamente significante ($p<0,05$) em ambos termos quadrático e linear. Também houve interação entre a temperatura e o tempo ($p<0,05$) (tabela 27). Da mesma forma, a temperatura (termo linear) e a combinação da temperatura e do tempo afetaram a concentração de artepelin na própolis verde bruta.

Por outro lado, a temperatura não teve um papel significante ($p>0,05$) na concentração do ácido *p*-cumárico isolado nem deste composto na própolis verde bruta, o que mostra que tal padrão é estável em temperaturas de armazenamento e transporte até em torno de 40 a 50 ºC pelo período de até 30 dias.

Tabela 27. Dados estatísticos das análises de ANOVA de “lack of fit” e de regressão do modelo quadrático para a variável resposta concentração. Variáveis: X_1: temperatura (ºC) e X_2: tempo (dias)

Resposta	Lack-of-fit (valor de p)	Principais efeitos nos termos Linear (L) e quadrático (Q) (p<0.05)	R^2	R	Equação preditiva da resposta
Artepillin C	0,222890	X_1 (L/Q), X_2(L), X_1/X_2	0,98601	0,99298	$y=68,89554+0,40847*X_1-0,01471*X_1^2-0,18603*X_2+0,00262*X_2^2-0,03062*X_1*X_2$
Artepillin C na própolis verde bruta	0,123302	X_1(L), X_1/X_2	0,89532	0,94621	$y=48,82206+0,24541*X_1-0,00404*X_1^2+0,07012*X_2-0,00098*X_2^2-0,01336*X_1*X_2$
Ácido *p*-cumárico	0,155413	X_2(L)	0,92337	0,96092	$y=60,19528+0,03078*X_1-0,00070*X_1^2-0,36096*X_2+0,00555*X_2^2-0,00128*X_1*X_2$
Ácido *p*-cumárico na própolis verde bruta	0,495247	-	0,85478	0,92454	$y=5,77492-0,00987*X_1-0,00012*X_1^2-0,01607*X_2+0,00035*X_2^2-0,00008*X_1*X_2$

Ao se analisarem os gráficos 3D dos efeitos de X_1 e X_2 na concentração do artepelin C, assim como a interação entre eles (figura 63), é possível observar que, conforme a temperatura e o tempo aumentam, a concentração diminui mesmo em temperatura ambiente (20 ºC), na qual houve degradação significativa deste padrão. Após 30 dias a 50 ºC, todo o conteúdo de artepelin C sofreu degradação.

Utilizando-se a função de desejabilidade (figura 64), com o objetivo de se prevenir a degradação deste composto, estabeleceu-se a melhor temperatura de armazenamento para o artepelin C: -2,5ºC.

No entanto, o ácido *p*-cumárico, mesmo após 30 dias de armazenamento à temperaturas entre 40 e 50 ºC não sofreu degradação significativa. Porém, após 30 dias a 50 ºC, aproximadamente 13% deste composto sofreu degradação (figura 65). A desejabilidade (figura 66) mostra que a 32,5 ºC, a concentração de ácido *p*-cumárico ainda é mantida constante, quando a amostra está protegida da luz.

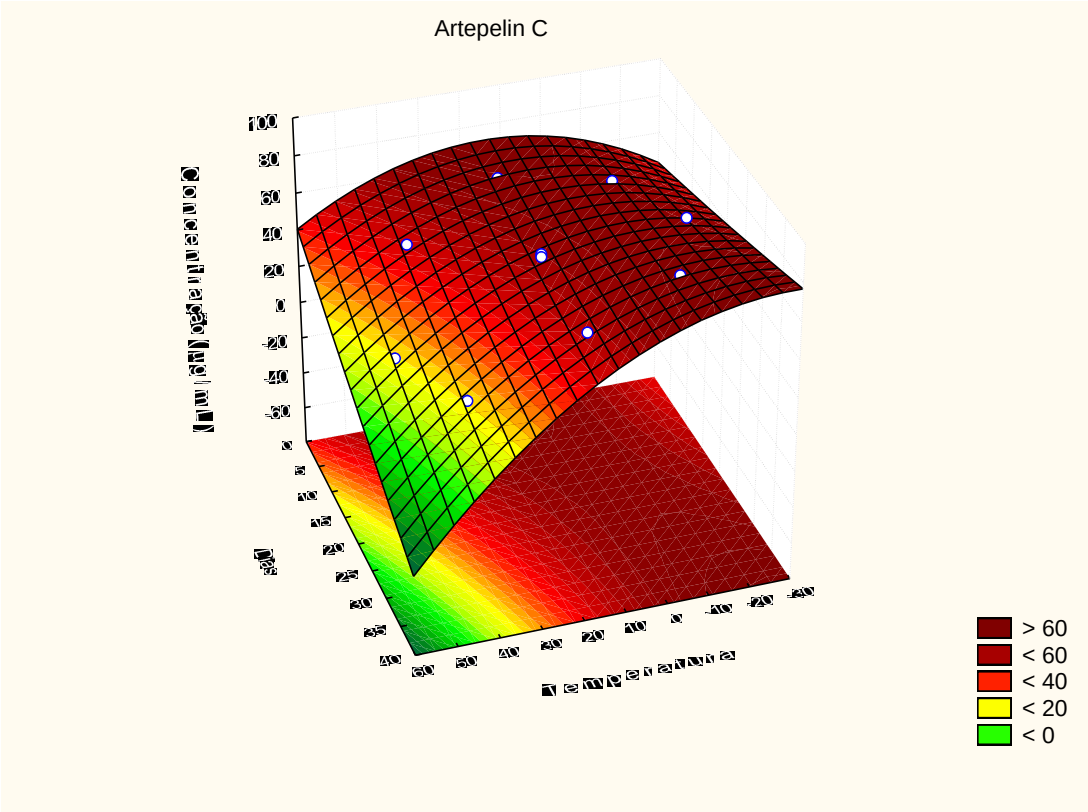


Figura 66. Gráfico de superfície de resposta da concentração de artepelin C isolado em função da temperatura (ºC) e do tempo (dias)

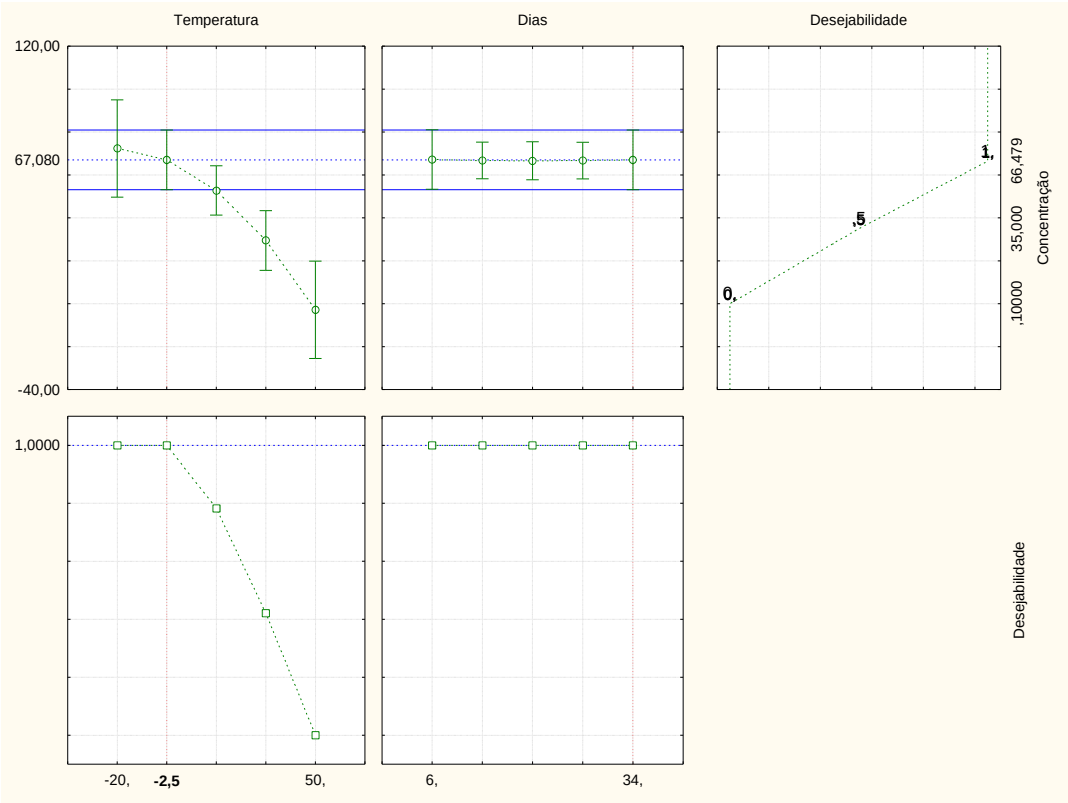


Figura 67. Gráficos de desejabilidade da concentração do artepelin C isolado em função da temperatura e do tempo

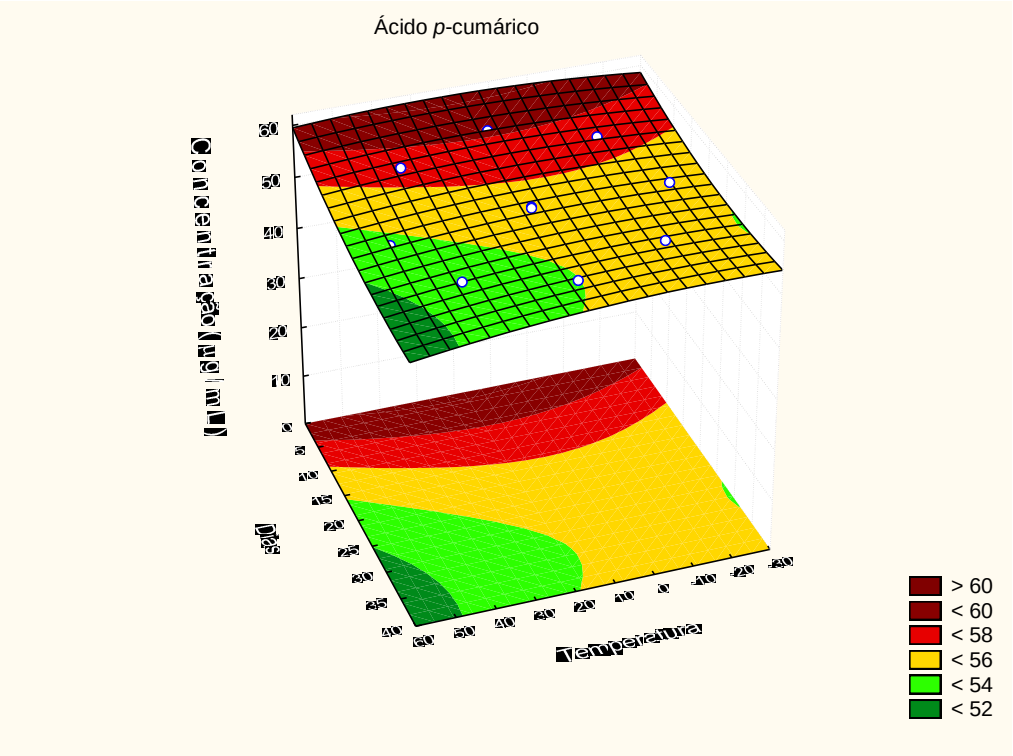


Figura 68. Gráfico de superfície de resposta da concentração do ácido *p*-cumárico isolado em função da temperatura (ºC) e do tempo (dias)

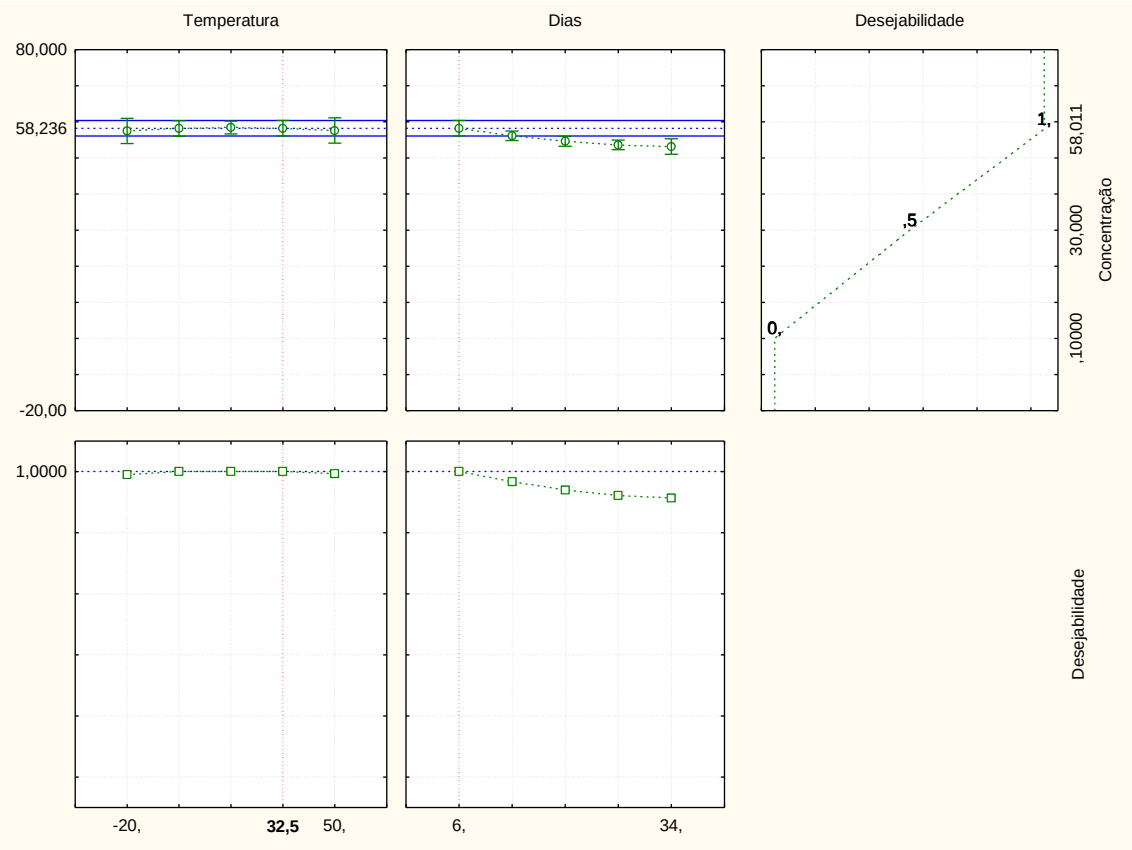


Figura 69. Gráficos de desejabilidade da concentração do ácido *p*-cumárico isolado em função da temperatura e do tempo

Na própolis verde bruta, o artepelin C degradou quando exposto à alta temperatura proporcionalmente ao tempo de exposição. Acima de 50 ºC após 30 dias de experimento, por volta de 50% na quantidade inicial de artepelin C foram degradadas (figura 67). A desejabilidade mostra que, assim como para o artepelin C isolado, a melhor temperatura de armazenamento para o artepelin C na própolis verde bruta, é -2,5 ºC também (figura 68).

Em relação ao ácido *p*-cumárico na própolis verde, apesar da desejabilidade apontar melhores temperaturas de armazenamento abaixo de 20 ºC (figura 70), os gráficos 3D revelam que a concentração deste composto até 50 ºC permanece entre 4,6 e 5,8 μg/mL, mesmo após 30 dias (figura 69). Portanto, o armazenamento do ácido *p*-cumárico à temperatura ambiente não leva a perda significativa deste composto.

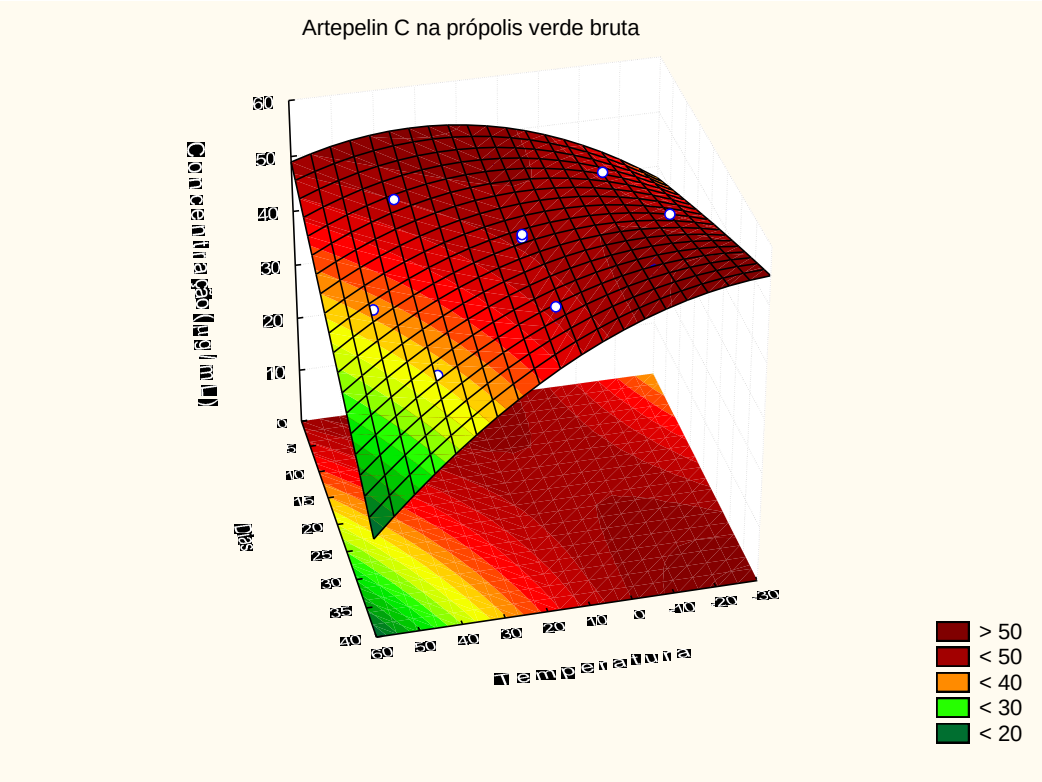


Figura 70. Gráfico de superfície de resposta da concentração de artepelin C na própolis verde em função da temperatura (ºC) e do tempo (dias)

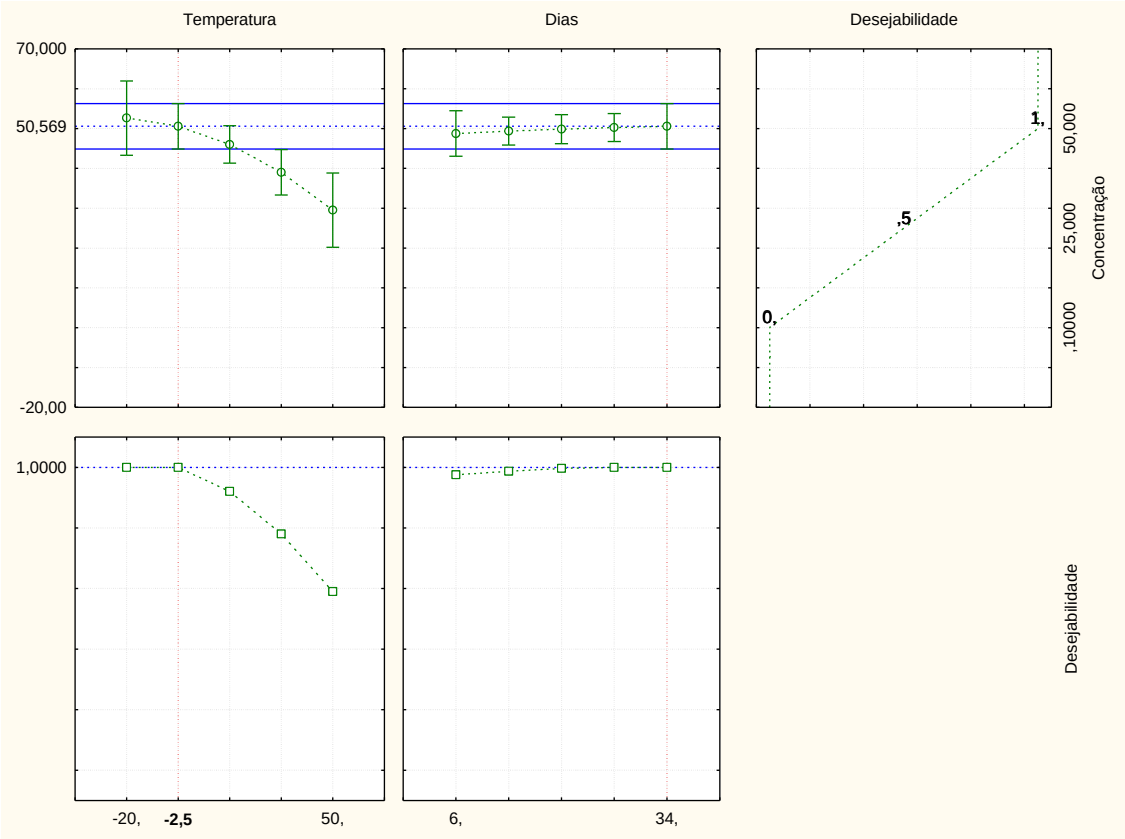


Figura 71. Gráficos de desejabilidade da concentração do artepelin C na própolis verde bruta em função da temperatura e do tempo

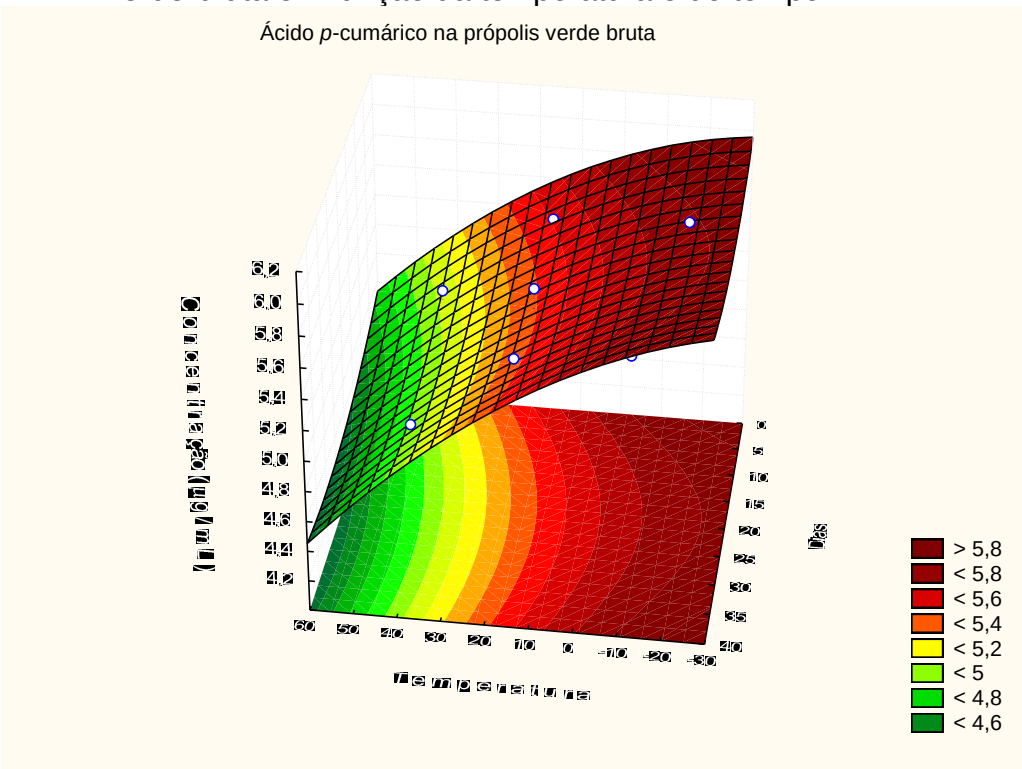


Figura 72. Gráfico de superfície de resposta da concentração de ácido *p*-cumárico na própolis verde em função da temperatura (ºC) e do tempo (dias)

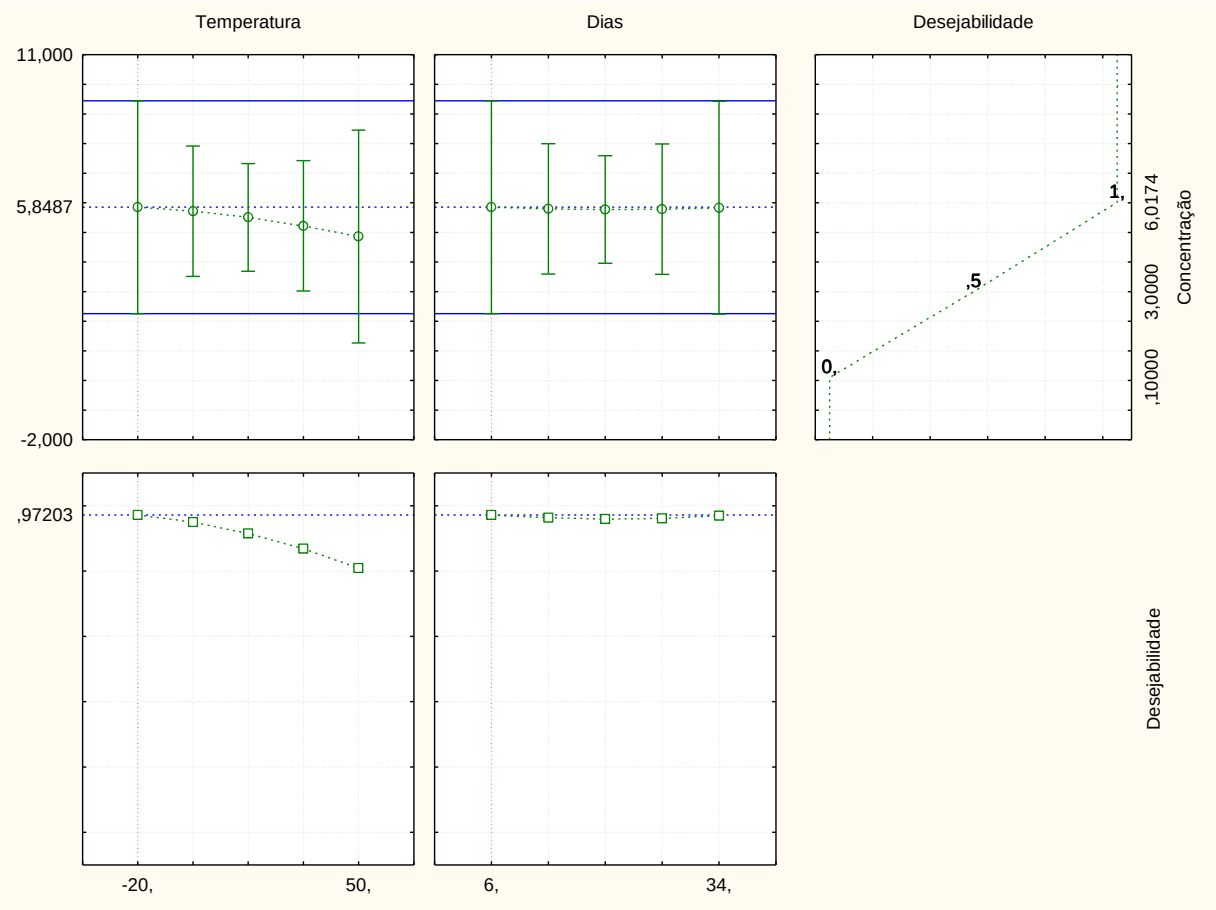


Figura 73. Gráficos de desejabilidade da concentração do ácido *p*-cumárico na própolis verde bruta em função da temperatura e do tempo

Da mesma forma que a melhor condição de armazenamento de frutas, sucos e preparações contendo ácido ascórbico, a qual é a baixas temperaturas (Valente et al., 2014), o que vale também para alimentos contendo vitamina C (Phillips et al., 2016). Da mesma forma vale para a própolis verde, que é um produto apícola rico em artepelin C e ácido *p*-cumárico. Então, as condições ideais de armazenamento da própolis verde bruta, considerando-se ambos artepelin C e ácido p-cumárico, são: amostras protegidas da luz e abaixo de -2,5 ºC. Tais condições também são ideais para o armazenamento do artepelin C e do ácido *p*-cumárico isolados, sendo que o ácido cumárico é estável também à temperatura ambiente.

Logo, as embalagens plásticas opacas usualmente utilizadas pelas indústrias para acondicionar o padrão de ácido *p*-cumárico são adequadas para prevenir a degradação de tal composto. Para se acondicionar o artepelin C e a própolis verde embalagens opacas ou frascos âmbar permitem a proteção da luz, sendo também apropriados para estas amostras.

4.4.3 Estabilidade prolongada

Após determinação das melhores condições de armazenamento e transporte do artepelin C e do ácido p-cumárico, isolados e na própolis verde bruta, com o objetivo de se validarem tais condições, armazenaram-se amostras dos compostos isolados e da própolis verde bruta em freezer a -10 ºC protegidas da luz pelo período de seis meses. Em seguida, avaliou-se a concentração destes padrões nas amostras.

Conforme pode ser verificado na figura 71 e na tabela 28, após seis meses de experimento, 98% da quantidade inicial dos compostos isolados não sofreu degradação. Na própolis verde, 100% da concentração inicial de ácido *p*-cumárico e 91% de artepelin C permaneceram constantes.

Estes resultados confirmam que as melhores condições de armazenamento e de transporte da própolis verde bruta, visando manter os teores de artepelin C e ácido *p*-cumárico, são ao abrigo da luz e em baixas temperaturas, como em freezeres e em embalagens que protejam as amostras da luz. Portanto, os produtores e empresas envolvidas com a produção e comercialização deste produto apícola e de artepelin C e ácido *p*-cumárico isolados devem manter os produtos em condições adequadas e realizarem controle de qualidade para assegurar que não houve degradação significativa destes produtos.

Tabela 28. Concentração do artepelin C e ácido *p*-cumárico nos experimentos de estabilidade prolongada

Composto	**Concentração (μg/mL)**					
	1 mês	**2 meses**	**3 meses**	**4 meses**	**5 meses**	**6 meses**
Artepelin C	46,77 ±0,43	47,01±1,70	46,81±4,18	45,84± 0,25	45,32± 2,57	46,00± 4,64
Ácido *p*-cumárico	43,30 ± 1,85	44,20± 0,67	43,45±3,70	42,15 ±1,50	39,10 ±1,71	42,50 ±2,78
Artepelin C na própolis verde	52,84 ±0,44	54,86 ±7,80	46,48±0,75	53,47 ±3,57	48,85 ±0,50	48,08 ±7,44
Ácido *p*-cumárico na própolis verde	5,84 ±0,61	5,38±0,59	4,69±0,71	5,42 ±0,70	4,90 ±0,19	5,86 ±0,67

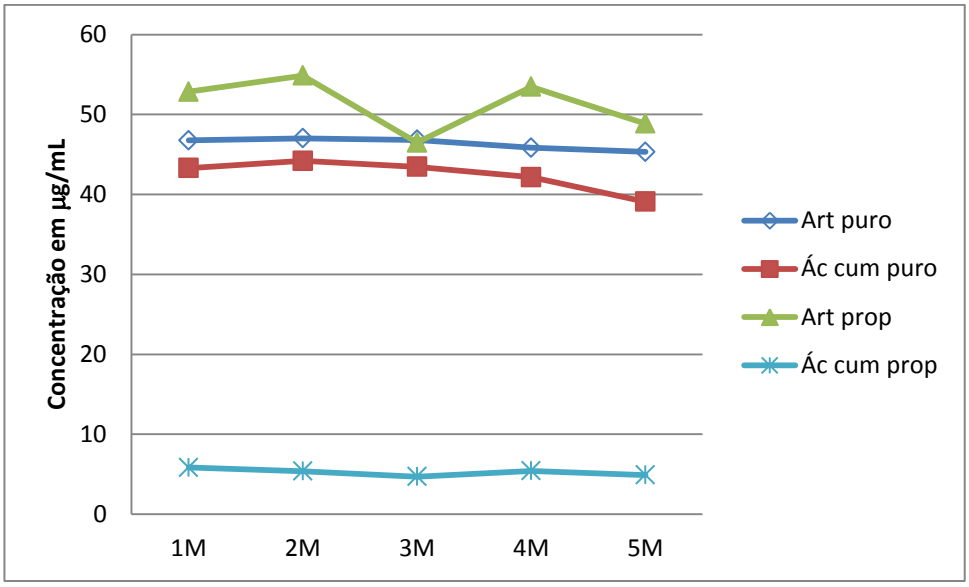


Figura 74. Gráfico das concentrações do artepelin C e do ácido *p*-cumárico nos experimentos de estabilidade prolongada

4.5 Ensaios Biológicos

4.5.1 Ensaios de citotoxidade e sobrevivência clonogênica

Publicações anteriores mostram que o artepelin C possui efeito antiproliferativo contra diversas linhagens de células cancerígenas, como gástricas, do cólon e de pulmão e promovem atividade anticâncer *in vivo* (Szliszka et al., 2012). Logo, o artepelin C e seus produtos de degradação foram testados contra as linhagens AGP-01 (câncer gástrico) e HeLa (câncer cervical).

Os resultados dos ensaios de citotoxidade (figura 72) mostram que a própolis verde a 100 µg/mL foi capaz de diminuir a viabilidade celular das células da linhagem AGP-1, que são células de câncer gástrico, em aproximadamente 50%. Nas concentrações de 10, 1 e 0,5 µg/mL, a viabilidade celular foi superior a 70%. O ácido *p*-cumárico e seu produto de degradação (AC-1) possuem efeito similar em tais células: a 100 µM, a incubação das amostras com as células resultou em viabilidade celular próxima de 50% e em concentrações mais baixas, acima de 78%. Da mesma forma, a 0,6 e 1 µM, o artepelin C e seus derivados também não foram significativamente citotóxicos para as células da linhagem AGP-01 (viabilidade celular acima de 60%).

Por outro lado, a 10 μM, o artepelin C, ART1 e ART4 foram capazes de diminuir a viabilidade destas células em 50%. A 100 μM, ambos artepelin C e seus produtos de degradação se mostraram citotóxicos, principalmente o ART4 (viabilidade celular por volta de 20%) e seu precursor, o artepelin C (viabilidade celular por volta de 30%).

Ao se verificar que o ART4 possui efeito promissor contra a linhagem AGP-01 (IC_{50} 9,09 μM) (tabela 29) e o artepelin C, seu precursor, possui IC_{50} igual a 15,39 μM, conclui-se que a modificação na configuração da ligação dupla leva ao aumento de citotoxidade contra esta linhagem celular. Ao se compararem os valores de IC_{50} do artepelin C com os dos produtos de degradação ART1, ART2 e ART3 (tabela 29), nota-se que ocorreu o oposto, pois a modificação nos grupos prenilas levou a diminuição do efeito citotóxico contra tal linhagem de células cancerígenas. Em relação ao ácido *p*-cumárico e ao AC-1 nenhum destes compostos apresentou efeito promissor.

Como constatado, pequenas modificações na estrutura do precursor pode levar ao aumento, diminuição ou perda da atividade biológica deste. Um exemplo disto foi a moderada citotoxidade apresentada por um composto fenólico nas linhagens de células tumorais AGP-01, HL-60 e SK-MEL 28, enquanto que um análogo apresentou alta atividade contra tais linhagens celulares (Teixeira et al., 2018). De forma similar, o artepelin C, quando sofreu uma pequena modificação na ligação dupla, teve sua atividade citotóxica melhorada, enquanto que modificações nas prenilas levaram a perda da atividade citotóxica contra a linhagem celular de câncer gástrico AGP-01.

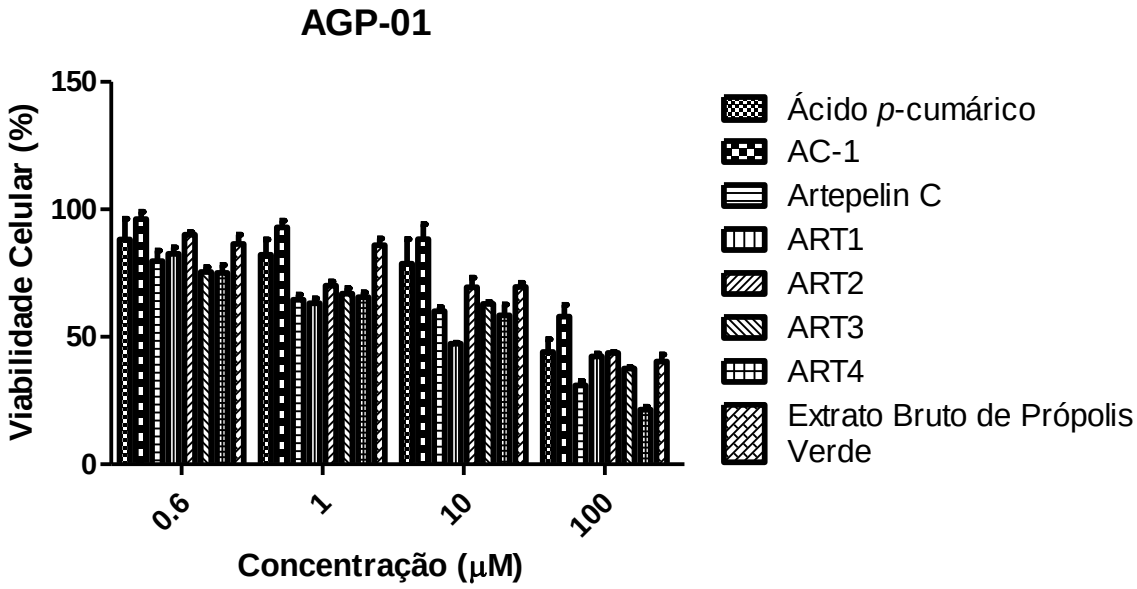


Figura 75. Média ± DP da % de viabilidade celular em relação ao controle negativo (doxorrubicina à 0,5 μM) após 24 h do tratamento com as amostras na linhagem celular AGP-01.

Tabela 29. Valores de IC_{50} do artepelin C, do ácido *p*-cumárico e de seus produtos de degradação contra células da linhagem AGP-01

Composto	IC_{50} (μM)
Artepelin C	15,39
ART-4	9,09
ART-1	18,68
ART-2	53,91
ART-3	24,57
Ácido *p*-cumárico	42,20
AC-1	>100

Então, devido ao ART4 ser um composto promissor contra a linhagem AGP-01 (IC_{50} 9,09 μM) (tabela 29), também se avaliou o efeito a longo prazo nestas células em comparação ao artepelin C e ao controle positivo (doxorrubicina à 0,5 μM) (figura 73). Incubação das células com ART4 a 20 μM apresentou efeito similar ao do controle positivo e a 10 e 5 μM apresentou efeito estatisticamente diferente do controle negativo ($p<0,05$). Por outro lado, embora o artepelin C permita a formação de mais colônias que o controle positivo, a 30 e 15 μM, a quantidade de colônias das células incubadas com o artepelin C com o controle negativo são estatisticamente diferentes ($p<0,05$).

Portanto, as células da linhagem AGP-01 foram sensíveis à exposição a longo prazo ao ART4 a 20 μM e ao controle positivo (doxorrubicina à 0,5 μM) de forma similar. Além disso, o ART4 a 10 e a 5 μM também foi capaz de diminuir a formação de colônias de células AGP-01 significativamente.

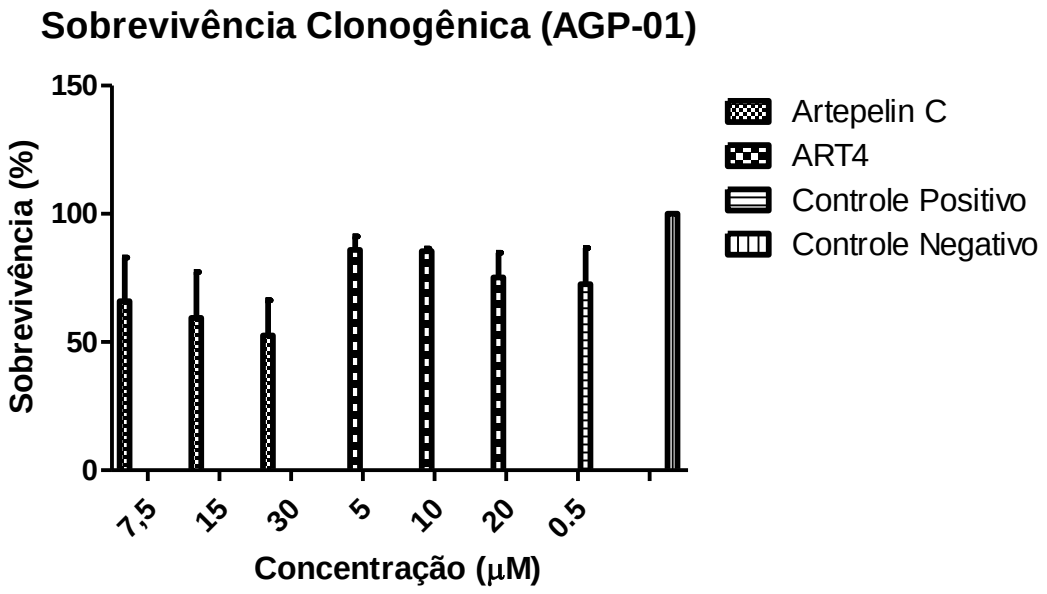


Figura 76. Fração de células sobreviventes ± DP (%) obtidas através dos ensaios de sobrevivência clonogênica. As células foram tratadas com diferentes concentrações de artepelin C, ART4 e doxorrubicina à 0,5 μM e incubadas por 10 dias.

Ao se observar que o câncer gástrico é um dos tipos de cânceres mais comuns no mundo atualmente e que por volta de 50% dos casos são recorrentes após remoção cirúrgica (além do resultado destas cirurgias não ser muito efetivo, pois o tempo de vida destes casos é estimado em aproximadamente 5 anos e apenas para 20% deles) (Pinto et al., 2015), a descoberta e desenvolvimento de novos candidatos a fármacos para seu tratamento possui importância inestimável. Então, considerando-se que muitos dos compostos fenólicos e polifenólicos encontrados usualmente em produtos naturais são reconhecidamente não tóxicos e são agentes que auxiliam na prevenção de câncer (Szliszka et al., 2012), tais compostos são, possivelmente, agentes promissores contra diferentes células

cancerígenas. Catchpole et al (2015) demonstraram que há relação entre a ação citotóxica contra células de câncer do cólon (linhagem celular DLD-1) de uma tintura de própolis da Nova Zelândia e seus compostos fenólicos majoritários picembrina, pinobaskina-3-O-acetato e derivados do ácido cafeico fenil éster: os ensaios identificaram potente atividade antiproliferativa associada a estes compostos, assim como com a crisina, galangina e outros compostos fenólicos presentes em menor concentração. Diversos destes compostos, como a pinocembrina, pinobanskina-3-O-acetato, tectocrisina, dimetilalilcafeato, 3-metil-3-butenil cafeato, benzilferulato e benzil isoferulato, também foram ativos contra outras linhagens de células tumorais gastrintestinais de carcinoma de cólon (linhagem HCT-116), câncer escamoso esofageal (linhagem KYSE-30) e carcinoma gástrico (linhagem NCI-N87).

Ensaios *in vivo* relevaram que o extrato etanólico de própolis verde a 0,5% e a 2,5% aumentaram a taxa de sobrevivênvia de ratos e a avaliação histopatológica de neoplasmas dos ratos após dois anos indicaram que não houve aumento significativo de tumores pré-neoplásicos ou lesões em nenhum órgão dos animais tratados com o extrato de própolis verde. Além disso, o extrato diminui a incidência de tumores pituitários, leucemia e tumores de tireoide (Kakehashi et al., 2016).

Dois compostos fenólicos isolados de própolis, cardanol e cardol possuem efeito antiproliferativo contra células tumorais de pulmão, hepatoblastoma de fígado, carcinoma gástrico e adenocarcinoma de cólon, com valores de IC_{50} entre 10,8 e 29,3 μg/mL para o cardanol e entre <3,13 e 5,97 μg/mL (6,82 a 13 μM) para o cardol (Teerasripreecha et al., 2012). O artepelin C, que também é isolado de própolis, mais especificamente da própolis verde, é ativo contra células de câncer de próstata, agindo como indutor de apoptose nestas células por fragmentação do DNA e aumento da clivagem da caspase-3 e poli ADP-ribose polimerase (Endo et al., 2018).

Além do mais, o artepelin C e o extrato de própolis verde bloqueiam a via de sinalização da quinase PKA1, uma enzima associada ao desenvolvimento de tumores neurofibromatosos, suprimindo o crescimento das células tumorais. Estes agentes bloqueiam tal via de sinalização de forma seletiva, sem afetar outras quinases, causando, portanto, menos efeitos colaterais e suprimindo quase que completamente o crescimento de tumores humanos xenoenxertados em ratos. Observando-se que mais de 70% dos cânceres humanos requerem a quinase PAK1 para seu desenvolvimento, pois esta enzima participa da dinâmica do citoesqueleto, regula a sobrevivência celular, mitose e transcrição das células tumorais (Dummler

et al., 2009), o extrato de própolis e o artepelin C podem ser considerados promissores agentes anticâncer (Messerli et al., 2009).

Fármacos ativos contra células de câncer gástrico, como a linhagem AGP-01, podem agir nos microtúbulos, por exemplo, que são alvos já bem conhecidos na terapia anticâncer. Eles são essenciais para a estrutura celular, pois estão presentes no citoesqueleto e tem um papel importante no transporte intracelular, na estrutura celular, na mitose e divisão celular. Também, componentes do citoesqueleto estão envolvidos em interações de adesão durante a formação de metástases. Muitos estudos mostram que cânceres altamente invasivos e com alta taxa de metástase estimulam a produção de metaloproteinases da matriz e a inibição ou redução da atividade destas, como o mebendazol nas células AGP-01, contribui de forma significativa com a ação antitumoral e antimetastáses (Pinto et al., 2015).

Então, considerando a atividade promissora do ART-4 contra células de câncer gástrico, a próxima etapa seria a elucidação de seu mecanismo de ação, que possivelmente seria a ação nos microtúbulos celulares, e/ou enzimas como as metaloproteinases ou quinases.

Além da linhagem de células de câncer gástrico, as amostras também foram testadas contra a linhagem celular HeLa, que é de câncer cervical e contra a linhagem CHO-k1, que é uma linhagem de células normais. As figuras 74 e 75 mostram a viabilidade celular da incubação das amostras com as linhagens CHO-k1 e HeLa, respectivamente. Ao se analisarem os dados de viabilidade celular constata-se que nenhum dos compostos foi citotóxico para as células nas concentrações testadas. Portanto, as amostras não são consideradas promissoras para futuros estudos contra a linhagem HeLa, de carcinoma humano epitelial cervical. Por outro lado, considerando-se que as células da linhagem CHO-k1 são não-tumorais (células de ovário de hamster chinês) e que as amostras não foram tóxicas para estas, há indícios de que as amostras também não sejam tóxicas contra outras linhagens de células normais.

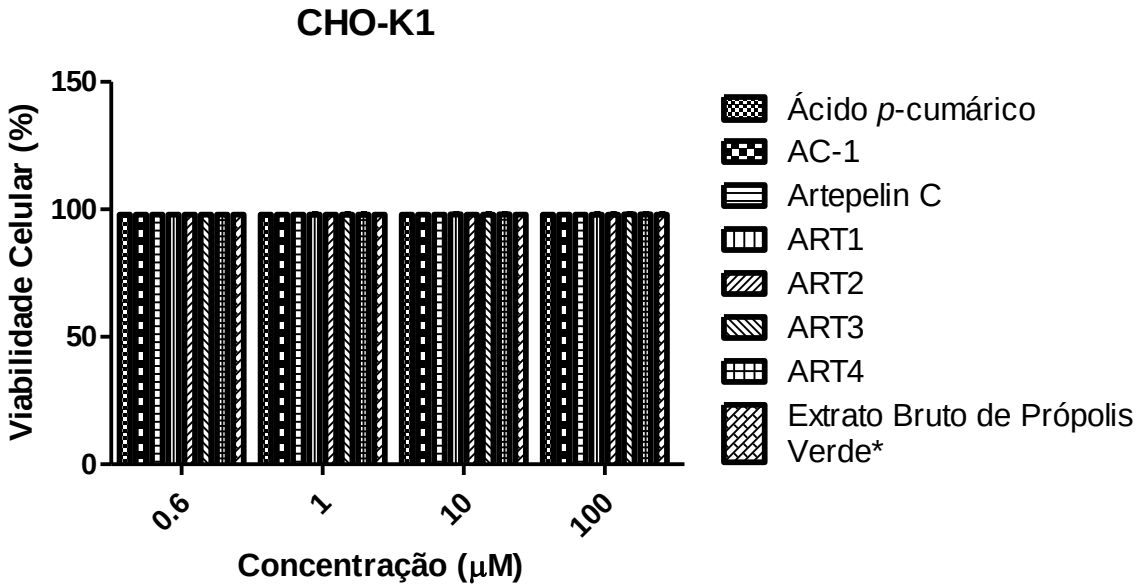


Figura 77. Média ± DP da % de viabilidade celular em relação ao controle negativo (doxorrubicina a 0,5 μM) após 24 h do tratamento com as amostras na linhagem celular CHO-k1

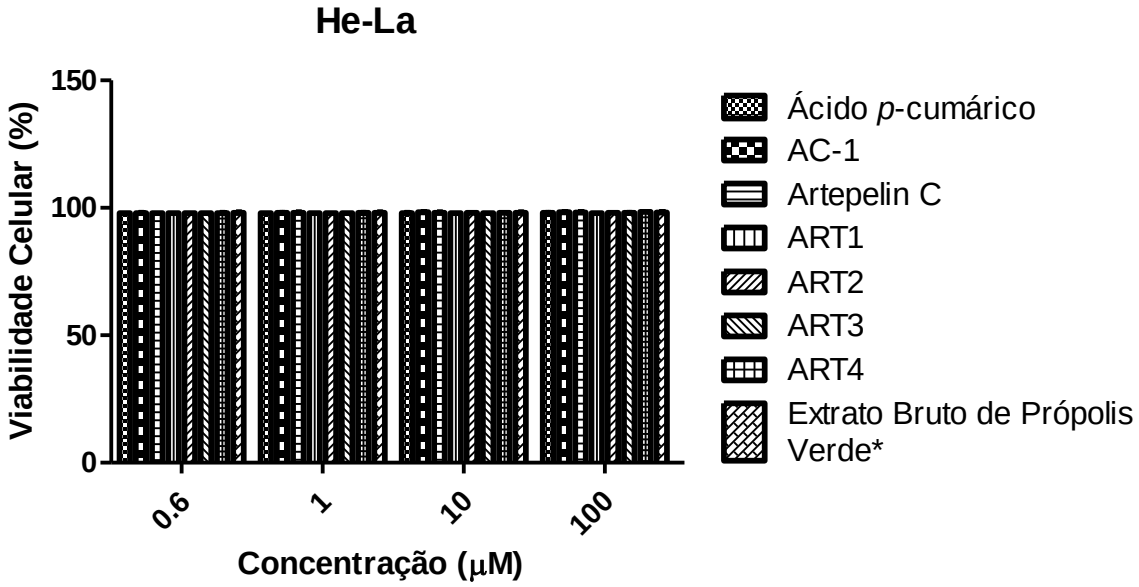


Figura 78. Média ± DP da % de viabilidade celular em relação ao controle negativo (doxorrubicina a 0,5 μM) após 24 h do tratamento com as amostras na linhagem celular HeLa

Além da obtenção da porcentagem de viabilidade celular após incubação das amostras com as células da linhagem CH-k1, para se certificar da não-toxicidade dos compostos, calculou-se o índice de seletividade de cada um deles (tabela 30). O índice se seletividade (IS) é um parâmetro farmacêutico que estima a seletividade

das amostras para as células tumorais levando-se em consideração a razão entre o valor de IC_{50} do composto para a célula de linhagem não tumoral (neste caso a linhagem CHO-k1) e o valor de IC_{50} para a linhagem tumoral. Quanto maior o índice de seletividade, mais seletivo é o composto para as células tumorais: IS acima de 1,0 demonstra boa atividade contra as células tumorais e baixa toxicidade para as células normais e IS acima de 3,0 indicam ótima eficácia com alta seletividade para as células tumorais. Este parâmetro pode também ser utilizado para otimização das doses empregadas em estudos clínicos (Antoszczak et al., 2014)

Ao se analisarem os dados de viabilidade celular e valor de IC_{50}, o composto mais promissor contra a linhagem AGP-01 foi o ART4, seguido por seu precursor, o artepelin C. Então a importância de se avaliar a seletividade destes para as células tumorais é importante, sendo que o ART4 possui IS >11 e o artepelin C >6,5. Isto indica que tais compostos são altamente seletivos para as células tumorais da linhagem AGP-01.

Tabela 30. Valores de IC_{50} do artepelin C, ácido *p*-cumárico e seus derivados para as linhagens tumorais AGP-01, HeLa e não tumoral CHO-K1 e índice de seletivade destes compostos para AGP-01

	IC_{50} (μM)			**SI**
	AGP-01	**He-La**	**CHO-K1**	**AGP-01**
Artepelin C	15,39	>100	>100	> 6,50
ART-4	9,09	>100	>100	> 11,00
ART-1	18,68	>100	>100	> 5,35
ART-2	53,91	>100	>100	> 1,84
ART-3	24,57	>100	>100	> 4,07
Ácido *p*-cumárico	42,20	>100	>100	> 2,36
AC-1	>100	>100	>100	>1,00

4.5.2 Ensaios antiparasitários contra *Leishmania*

Nos ensaios iniciais avaliou-se a atividade dos compostos frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*: a 50 μM, todas as amostras foram capazes de reduzir a viabilidade celular significativamente, especialmente o extrato de própolis verde, ART4, ácido *p*-cumárico, AC-1 e artepelin C (viabilidade celular por volta de 40%) (figura 76). A 25 e 12,5 μM, estes compostos também foram tóxicos aos parasitas, demonstrando viabilidades celulares abaixo de 65%. A 6,25 e 3,12 μM, as

amostras mais eficazes foram AC-1, artepelin C e ART4, respectivamente. Devido a estes compostos serem os mais ativos, o ART4, AC-1 e seus precursores foram também avaliados contra a forma amastigota deste parasita.

O ácido *p*-cumárico e o ART4 foram os compostos mais promissores: a 50 e 25 μM, a viabilidade celular destes parasitas se encontrava entre 29 e 45% e a 12,5; 6,25 e 3,12 μM entre 37 e 49%. Em concentrações acima de 12,5 μM, a incubação do artepelin C com as formas amastigotas levaram a viabilidades celulares menores do que 50% (figura 77). Por outro lado, os ensaios com o composto AC-1 mostraram que, mesmo na maior concentração testada (50 μM), a viabilidade celular ficou acima de 50%.

Então, para se avaliar se as amostras são promissoras como agentes antiparasitários calcularam-se os valores de IC_{50}, que é a concentração capaz de causar a morte de 50% dos parasitas. Calculou-se também o índice de seletividade. Os valores de IC_{50} (tabela 31) mostram que o ART4 possui atividade leishmanicida significativa contra amastigotas de *L. amazonensis*, com valor abaixo de 10 μM. Além disso, o ART4 parece ser seguro, pois o índice de seletividade está acima de 2,0 (>28,65 para amastigotas). Já o ácido *p*-cumárico possui boa atividade contra as formas amastigotas do parasita (IC_{50}<3,12), enquanto o AC-1 é eficaz contra a forma promastigota do parasita. Estes compostos também possuem índices muito bons de seletividade, indicando que os compostos são seguros para células normais (IS >42,37 e 10,69 para o ácido p-cumárico e para o AC-1, respectivamente).

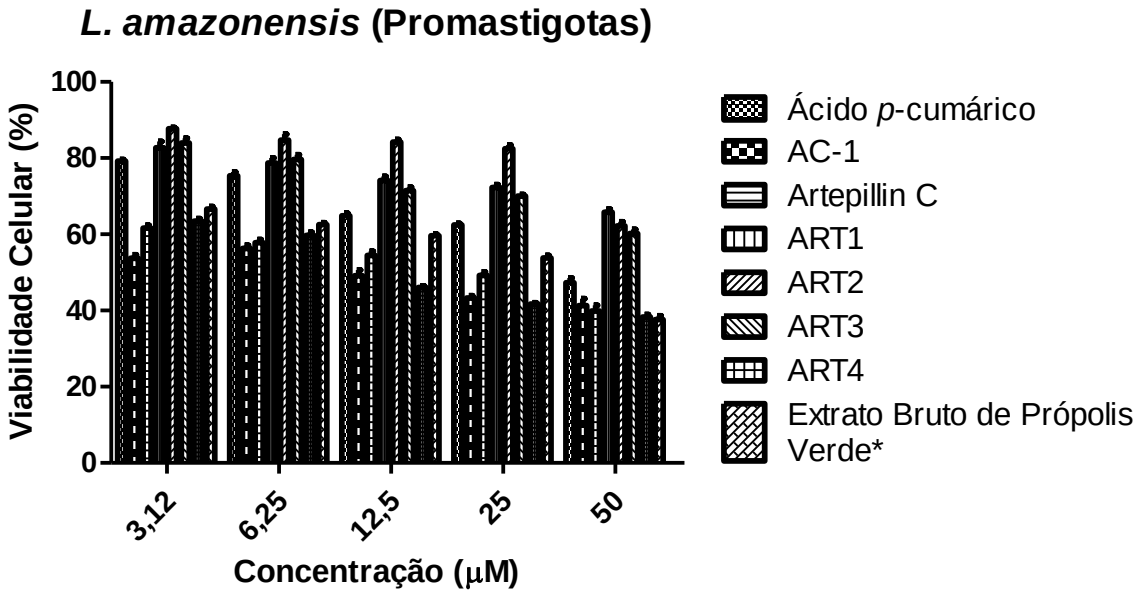


Figura 79. Média ± DP da % de viabilidade celular das formas promastigotas de *L. amazonensis* após 24 h do tratamento com as amostras

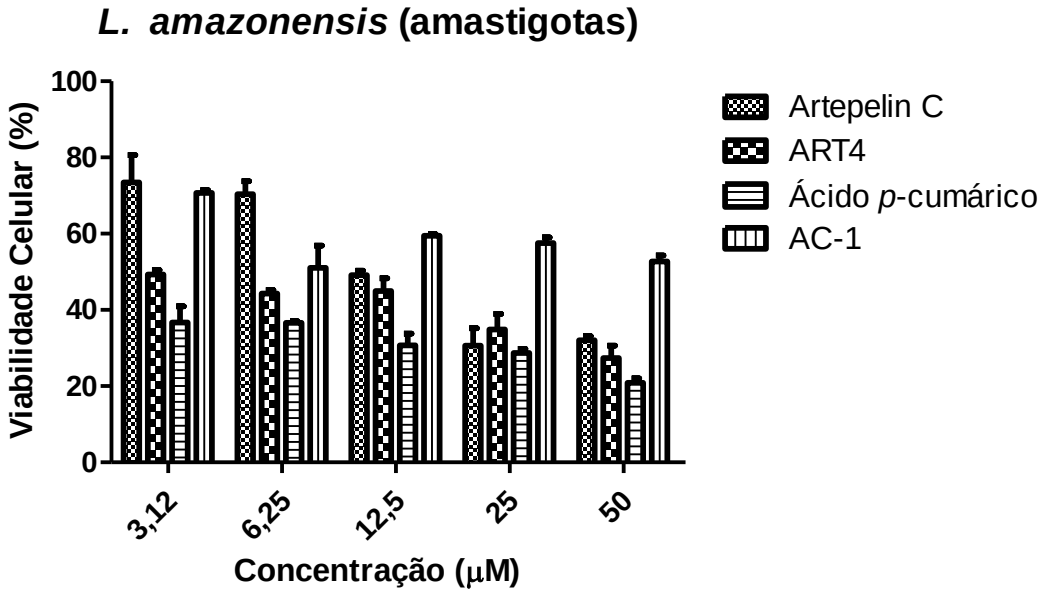


Figura 80. Média ± DP da % de viabilidade celular das formas amastigotas de *L. amazonensis* após 48 h do tratamento com artepelin C, ART4, ácido p-cumárico e AC-1.

Tabela 31. Valores de IC_{50} do artepelin C, ácido *p*-cumárico e seus derivados para as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e índice de seletividade destes compostos

	IC_{50} (μM)			SI	
	CHO-K1	***L. amazonensis* (promastigote)**	***L. amazonensis* (amastigote)**	***L. amazonensis* (promastigote)**	***L. amazonensis* (amastigote)**
Artepelin C	>100	17,46	13,22	> 5,72	>7,56
ART-4	>100	12,86	3,49	> 7,78	>28,65
ART-1	>100	>50	-	> 2	
ART-2	>100	>50	-	> 2	
ART-3	>100	>50	-	> 2	
Ácido *p*-cumárico	>100	48,46	<3,12	> 2,06	>42,37
AC-1	>100	9,35	>50	> 10,69	>2

Os compostos que mostram melhor atividade antiparasitária contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* foram o AC-1 e ART4 (valores de IC_{50} 9,35 e 12,86 μM, respectivamente), o que indica que a modificação na configuração da ligação dupla de *E* para *Z*, em ambos artepelin C e seu precursor ácido *p*-cumárico, leva a melhora da atividade leishmanicida contra as formas promastigotas deste parasita. De forma similar, o ART4 apresentou efeito melhor contra as formas amastigotas do que o artepelin C (IC_{50} 3,49 e 13,22 μM para o ART4 e artepelin C, respectivamente). Por outro lado, enquanto o ácido p-cumárico apresentou ótimo efeito leishmanicida contra as formas amastigotas (IC_{50}< 3,12 μM), o AC-1 não foi eficaz (IC_{50}>50 μM). Tais compostos inibiram o crescimento dos parasitas de forma concentração-dependente. Os índices de seletividade foram muito bons para estes compostos: contra promastigotas, o índice foi >7,78 μM para o ART4, >5,72 μM para o artepelin C e >10,69 μM para o AC-1 e contra amastigotas, o ART4 > 28,65 μM, artepelin C >7,56 μM, ácido *p*-cumárico >42,37 μM e, finalmente, >2,0 μM para o AC-1.

Assim sendo, tais compostos são promissores para continuarem a serem estudados quanto à sua eficácia, mecanismo de ação, efeitos colaterais; pois a descoberta de novos fármacos para o tratamento de parasitoses, como a leishmaniose, é de suma importância atualmente. Uma das razões é que esta doença é geralmente fatal e prejudicial aos humanos e animais e atinge mais de 12 milhões de pessoas no mundo. Além disso, não há vacinas ou medicamentos que sejam totalmente eficazes ou específicos contra *Leishmania* spp. Um outro problema

é que este parasita possui mais de uma forma morfológica, sendo uma forma extracelular flagelada, a promastigota e a forma intracelular, a amastigota. Portanto, fármacos que sejam capazes de agirem em ambas as formas são interessantes, pois podem ser mais efetivos do que os medicamentos atualmente encontrados no mercado (Boitz et al., 2017).

Muitos dos fármacos leishmanicidas agem principalmente como antioxidantes, quelando os íons metálicos e removendo radicais livres. O metabolismo de ferro, por exemplo, é uma via essencial para a sobrevivência de *Leishmania* e também para a replicação nos fagolisossomos dos macrófagos e muitos dos compostos fenólicos possuem tal propriedade, além de serem capazes de induzir morte por apoptose de *Leishmania* através de outras vias. Um exemplo de composto fenólico ativo contra *Leishmania* é o ácido rosmarínico, que foi capaz de alterar a morfologia de promastigotas e também a apigenina, que promoveu deformação na membrana celular. Estes dois compostos também interromperam a fase G0/G1 nas promastigotas (Antwi et al., 2019).

Extratos de própolis diminuíram a viabilidade celular de promastigotas *de L. braziliensis* de forma dose-dependente. Eles agiram modulando o perfil inflamatório dos macrófagos através da diminuição da produção de TGF-β e IL-10 e aumento de TNF-α, além de reduzirem os níveis de óxido nítrico e superóxido nos macrófagos infectados (Rebouças-Silva et al., 2017). Da Silva et al. (2013) relataram o efeito leishmanicida *in vitro* e *in vivo* de amostras de própolis coletadas em Botucatu (SP). Os macrófagos incubados com própolis apresentaram significante aumento da interiorização e morte dos parasitas, além de aumento na produção de TNF-α e diminuição da produção de IL-12 nos ratos tratados. Então, a própolis possui ação direta em tal parasita e efeitos imunomodulatórios nos macrófagos murínicos. Como a própolis possui diversos compostos fenólicos em sua composição química, a atividade leishmanicida pode estar relacionada a tais compostos.

Assim sendo, o artepelin C, o ácido *p*-cumárico e seus produtos de degradação ativos contra *Leishmania* podem apresentar mecanismos de ação semelhantes a outros compostos fenólicos e devem ser futuramente avaliados quanto a seu mecanismo de ação, toxicidade, ação in vivo, entre outros para certificação da eficácia, absorção e toxicidade destes compostos.

4.5.3 Ensaios antimicrobianos contra bactérias bucais

Em relação ao efeito antimicrobiano, o artepelin C foi capaz de inibir o crescimento de diferentes espécies de bactérias bucais a 200 e/ou 400 μg/mL, exceto *Enterococcus faecalis* (tabela 32). Os produtos de degradação ART1 e ART2 não foram ativos contra as bactérias testadas. Em comparação com o artepelin C, o ART3 e o ART4 possuem um efeito mais potente contra *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguinis*, sendo os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de 50 e 100 μg/mL para o ART3; 100 e 200 μg/mL para o ART4, respectivamente. O ácido *p*-cumárico não foi ativo contra as bactérias nas concentrações testadas e AC-1 possui valores de CIM e CBM de 400 μg/mL contra *Streptococcus mitis*.

Embora haja relatos dos efeitos antimicrobianos da própolis verde (Berretta et al., 2017) e o artepelin C e alguns produtos de degradação sejam ativos contra várias bactérias bucais, seus valores de CIM e CBM não demonstram boa atividade antimicrobiana, pois, para um composto isolado ser considerado promissor, seu CIM deve estar abaixo de 10 μg/mL (Arruda et al., 2017).

Tabela 32. Valores de CIM e CBM do artepelin C, ácido *p*-cumárico e seus produtos de degradação majoritários contra bactérias bucais.

Composto	***S. mutans* ATCC 25175**		***S. mitis* ATCC 49456**		***S. sobrinus* ATCC 33478**		***S. sanguinis* ATCC 10556**		***L. casei* ATCC 11578**		***S. salivarius* ATCC 25975**		***E. faecalis* ATCC 4082**	
	MIC μg/mL	**MBC μg/mL**	**MIC μg/mL**	**MBC μg/mL**	**MIC μg/mL**	**MBC μg/mL**	**MIC μg/mL**	**MBC μg/mL**	**MIC μg/mL**	**MBC μg/mL**	**MIC μg/mL**	**MBC μg/mL**	**MIC μg/mL**	**MBC μg/mL**
Artepelin C	200	200	200	200	400	400	200	400	400	>400	200	400	>400	>400
ART 1	>400	>400	>400	>400	>400	>400	400	400	>400	>400	>400	>400	>400	>400
ART 2	>400	>400	400	400	>400	>400	200	400	>400	>400	>400	>400	>400	>400
ART 3	200	200	50	100	200	400	50	100	200	400	400	>400	>400	>400
ART 4	>400	>400	100	200	>400	>400	100	200	400	400	400	400	>400	>400
Ácido p-cumárico	400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400
AC-1	>400	>400	400	400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400
Clorexidina	0,922	0,922	7,375	7,375	0,922	0,922	0,922	0,922	0,922	0,922	1,844	1,844	7,370	7,370

4. Conclusões

Os experimentos realizados mostram que, quando expostos à luz solar, o artepelin C e o ácido *p*-cumárico dão origem aos seus isômeros *Z* como produtos de degradação majoritários. O artepelin C, após armazenado em altas temperaturas, fornece três derivados como produtos majoritários, enquanto o ácido *p*-cumárico se mantém estável.

O método analítico desenvolvido e validado em CLAE-FR para quantificar o artepelin C, o ácido *p*-cumárico e seus principais produtos de degradação apresenta linearidade, exatidão, precisão e robustez de acordo com os manuais e validação da ANVISA e do ICH.

Os estudos de estabilidade demonstraram que o artepelin C é sensível à luz e temperatura e que o ácido p-cumárico é estável, a menos que seja exposto simultaneamente à alta temperatura e à luz. As melhores condições de armazenamento e transporte para o artepelin C, isolado ou na própolis verde, são a temperaturas abaixo de -2,5ºC e proteção da luz. O ácido *p*-cumárico pode ser armazenado à temperatura ambiente em embalagens de plástico opacas, comumente empregadas pelas indústrias, sem perda significativa de seu conteúdo.

Em relação aos ensaios biológicos, conclui-se que a própolis verde é uma importante fonte de compostos bioativos, especialmente o artepelin C e ácido *p*-cumárico. Também, que o ART4, o isômero *Z* do artepelin C, possui efeito significativo contra a linhagem de células de câncer gástrico AGP-01 e contra *Leishmania amazonensis*, especialmente a forma amastigota deste parasita. O ácido *p*-cumárico também apresentou atividade promissora contra amastigotas de *L. amazonensis*, enquanto o AC-1, seu isômero Z, foi efetivo contra as formas promastigotas. Portanto, tais compostos têm potencial para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de leishmaniose e câncer gástrico e devem ser mais estudados para comprovação de seus efeitos, bem como de seus parâmetros farmacodinâmicos e farmacocinéticos.

6. Referências

ANVISA: Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitáris. RDC Nº 899 2003.

ANVISA: Ministério da saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 166 2017.

Albuquerque BR, Prieto MA, Barreiro MF, Rodrigues A, Curran TP, Barros L, et al. Catechin-based extract optimization obtained from Arbutus unedo L. fruits using maceration/microwave/ultrasound extraction techniques. Ind Crops Prod 2017;95:404–15. doi:10.1016/j.indcrop.2016.10.050.

Androutsopoulos VP, Papakyriakou A, Vourloumis D, Tsatsakis AM, Spandidos DA. Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention: Substrates and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes. Pharmacol Ther 2010;126:9–20. doi:10.1016/j.pharmthera.2010.01.009.

Antoszczak M, Popiel K, Stefańska J, Wietrzyk J, Maj E, Janczak J, et al. Synthesis, cytotoxicity and antibacterial activity of new esters of polyether antibiotic - Salinomycin. Eur J Med Chem 2014;76:435–44. doi:10.1016/j.ejmech.2014.02.031.

Antwi CA, Amisigo CM, Adjimani JP, Gwira TM. In vitro activity and mode of action of phenolic compounds on leishmania donovani. PLoS Negl Trop Dis 2019;13:1–22. doi:10.1371/journal.pntd.0007206.

Arimboor R, Natarajan RB, Menon KR, Chandrasekhar LP, Moorkoth V. Red pepper (Capsicum annuum) carotenoids as a source of natural food colors: analysis and stability—a review. J Food Sci Technol 2015;52:1258–71. doi:10.1007/s13197-014-1260-7.

Arruda C, Eugênio D de S, Moreira MR, Símaro GV, Bastos JK, Martins CHG, et al. Biotransformation of (-)-cubebin by Aspergillus spp. into (-)-hinokinin and (-)-parabenzlactone, and their evaluation against oral pathogenic bacteria. Nat Prod Res 2017;6419:1–14. doi:10.1080/14786419.2017.1380017.

Arruda C, Mejía JAA, Pena Ribeiro V, Costa Oliveira L, e Silva MLA, Bastos JK. Development of a Validated High-Performance Liquid Chromatography Method and Optimization of the Extraction of Lignans from *Piper cubeba*. J Agric Food Chem

2019;67:753–9. doi:10.1021/acs.jafc.8b05359.

Avelino, Luciano Oliveira; dos Santos F de AR. The presence of Fabaceae in the pollen profile of propolis produced in northeastern Brazil. Acta Bot Brasilica 2018;32:602–14. doi:10.1590/0102-33062018abb0077.

Azeredo HMC. Betalains: Properties, sources, applications, and stability - A review. Int J Food Sci Technol 2009;44:2365–76. doi:10.1111/j.1365-2621.2007.01668.x.

de Azevedo Bentes Monteiro Neto M, de Souza Lima IM, Furtado RA, Bastos JK, da Silva Filho AA, Tavares DC. Antigenotoxicity of artepillin C in vivo evaluated by the micronucleus and comet assays. J Appl Toxicol 2011;31:714–9. doi:10.1002/jat.1614.

Bardají, D. K. R.; da Silva, J. J. M.; Bianchi, T. C.; Eugenio, D. S.; de Oliveira PF., Leandro, L. F.; Rogez, H. L. G.; Venezianni, R. C.S; Ambrosio, S. R.; Tavares, D. C.; Bastos, J.K.;Martins CHG. Anaerobe Copaifera reticulata oleoresin : Chemical characterization and antibacterial properties against oral pathogens 2016;40:18–27. doi:10.1016/j.anaerobe.2016.04.017.

Barros, M P; Sousa, J P B; Bastos, J K; Andrade SF. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. J Ethnopharmacol 2007;110:567–71.

Barros MP de, Lemos M, Maistro EL, Leite MF, Sousa JPB, Bastos JK, et al. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. J Ethnopharmacol 2008;120:372–7. doi:10.1016/j.jep.2008.09.015.

Berretta AA, Arruda C, Miguel FG, Baptista N, Nascimento AP, Marquele-Oliveira F, et al. Functional Properties of Brazilian Propolis: From Chemical Composition Until the Market. Superfood Funct. Food - An Overv. Their Process. Util., 2017, p. 56–98. doi:10.5772/65932.

Boitz JM, Gilroy CA, Olenyik TD, Paradis D, Li Y, Riscoe MK, et al. Arginase Is Essential for Survival of Leishmania donovani Promastigotes but not intracellular amastigotes. Infect Immun 2017;85:1–14.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin 2018;68:394–424. doi:10.3322/caac.21492.

Búfalo MC, Candeias JMG, Sousa JPB, Bastos JK, Sforcin JM. In vitro cytotoxic activity of Baccharis dracunculifolia and propolis against HEp-2 cells. Nat Prod Res 2010;24:1710–8. doi:10.1080/14786410902909300.

Catchpole O, Mitchell K, Bloor S, Davis P, Suddes A. Antiproliferative activity of New Zealand propolis and phenolic compounds vs human colorectal adenocarcinoma cells. Fitoterapia 2015;106:167–74. doi:10.1016/j.fitote.2015.09.004.

Choi SS, Cha BY, Iida K, Lee YS, Yonezawa T, Teruya T, et al. Artepillin C, as a PPARγ ligand, enhances adipocyte differentiation and glucose uptake in 3T3-L1 cells. Biochem Pharmacol 2011;81:925–33. doi:10.1016/j.bcp.2011.01.002.

Collins CH, Braga GL, S BP. Fundamentos de Cromatografia. Campinas: Editora da Unicamp; 2006.

Conference I, Harmonisation ON, Technical OF, For R, Of R, For P, et al. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES 2005.

Costa P, Almeida MO, Lemos M, Arruda C, Casoti R, Somensi LB, et al. Artepillin C, drupanin, aromadendrin-4′-O-methyl-ether and kaempferide from Brazilian green propolis promote gastroprotective action by diversified mode of action. J Ethnopharmacol 2018;226:82–9. doi:10.1016/j.jep.2018.08.006.

Costa P, Boeing T, Somensi LB, Cury BJ, Espíndola VL, França TCS, et al. Hydroalcoholic extract from *Baccharis dracunculifolia* recovers the gastric ulcerated tissue, and *p* -coumaric acid is a pivotal bioactive compound to this action. BioFactors 2019:biof.1503. doi:10.1002/biof.1503.

Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli. Clin Microbiol Rev 2013;26:822–80. doi:10.1128/CMR.00022-13.

Cunha NL, Teixeira GMH, Martins TD, Souza AR, Oliveira PF, Símaro GV, et al. (-)-Hinokinin Induces G2/M Arrest and Contributes to the Antiproliferative Effects of Doxorubicin in Breast Cancer Cells. Planta Med 2016;82:530–8. doi:10.1055/s-0042-101761.

Daskalaki D, Kefi G, Kotsiou K, Tasioula-Margari M. Evaluation of phenolic compounds degradation in virgin olive oil during storage and heating. J Food Nutr

Res 2009;48:31–41.

Dummler B, Ohshiro K, Kumar R, Field J. Pak protein kinases and their role in cancer. Cancer Metastasis Rev 2009;28:51–63. doi:10.1007/s10555-008-9168-1.

Duque Estrada GO, Mendes da Silva JF, Ceva Antunes OA. Artepillin C: A Review. Lett Drug Des Discov 2008;5:88–92. doi:10.2174/157018008783928436.

Endo S, Hoshi M, Matsunaga T, Inoue T, Ichihara K, Ikari A. Autophagy inhibition enhances anticancer efficacy of artepillin C, a cinnamic acid derivative in Brazilian green propolis. Biochem Biophys Res Commun 2018;497:437–43. doi:10.1016/j.bbrc.2018.02.105.

Franca JR, De Luca MP, Ribeiro TG, Castilho RO, Moreira AN, Santos VR, et al. Propolis - based chitosan varnish: Drug delivery, controlled release and antimicrobial activity against oral pathogen bacteria. BMC Complement Altern Med 2014;14:1–11. doi:10.1186/1472-6882-14-478.

Fukuda I, Nishiumi S, Mukai R, Yoshida K, Ashida H. Catechins in tea suppress the activity of cytochrome P450 1A1 through the aryl hydrocarbon receptor activation pathway in rat livers. Int J Food Sci Nutr 2015;00:1–8. doi:10.3109/09637486.2014.992007.

GUIDELINE IHT. VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1) 2005.

Hattori H, Okuda K, Murase T, Shigetsura Y, Narise K, Semenza GL, et al. Isolation, identification, and biological evaluation of HIF-1-modulating compounds from Brazilian green propolis. Bioorganic Med Chem 2011;19:5392–401. doi:10.1016/j.bmc.2011.07.060.

Heyden, Y. V., Nijhuis, A., Verbeke, J. S., Vandeginste, B.G.M., Massart DL. Guidance for robustness/ ruggedness tests in method validation. J Pharm Biomed Anal 2001;24:723–53.

Hirota M, Matsuno T, Fujiwara T, Sugiyama H, Mineshita S. Enhanced cytotoxicity in a Z-photoisomer of a benzopyran derivative of propolis. J Nat Prod 2000;63:366–70. doi:10.1021/np990463m.

Jorge R, Furtado NAJC, Sousa JPB, Da Silva Filho AA, Gregório Junior LE, Martins CHG, et al. Brazilian propolis: Seasonal variation of the prenylated p-coumaric acids

and antimicrobial activity. Pharm Biol 2008;46:889–93. doi:10.1080/13880200802370373.

Kakehashi A, Ishii N, Fujioka M, Doi K, Gi M, Wanibuchi H. Ethanol-extracted brazilian propolis exerts protective effects on tumorigenesis in wistar hannover rats. PLoS One 2016;11:1–15. doi:10.1371/journal.pone.0158654.

Kim J, Sudbery P. Candida albicans, a major human fungal pathogen. J Microbiol 2011;49:171–7. doi:10.1007/s12275-011-1064-7.

Kitamura H, Naoe Y, Kimura S, Miyamoto T, Okamoto S, Toda C, et al. Beneficial effects of Brazilian propolis on type 2 diabetes in ob/ob mice. Adipocyte 2013;2:227–36. doi:10.4161/adip.25608.

Kyoko Naramoto MK and KI. Effects of an ethanol extract of Brazilian green propolis on human cytochrome P450 enzyme activities in vitro. J Agric Food Chem 2014;62:11296–302.

Li L, Cui D, Ye L, Li Y, Zhu L, Yang L, et al. Codelivery of salinomycin and docetaxel using poly(d, l-lactic-co-glycolic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles to target both gastric cancer cells and cancer stem cells. Anticancer Drugs 2017;28:989–1001. doi:10.1097/CAD.0000000000000541.

Liazid A, Palma M, Brigui J, Barroso CG. Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. J Chromatogr A 2007;1140:29–34. doi:10.1016/j.chroma.2006.11.040.

Machado JL, Assunção AKM, da Silva MCP, Reis AS dos, Costa GC, Arruda D de S, et al. Brazilian Green Propolis: Anti-Inflammatory Property by an Immunomodulatory Activity. Evidence-Based Complement Altern Med 2012;2012:1–10. doi:10.1155/2012/157652.

Mariano LNB, Arruda C, Somensi LB, Costa APM, Perondi EG, Boeing T, et al. Brazilian green propolis hydroalcoholic extract reduces colon damages caused by dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. Inflammopharmacology 2018;26:1283–92. doi:10.1007/s10787-018-0467-z.

Messerli SM, Ahn M-R, Kunimasa K, Yanagihara M, Tatefuji T, Hashimoto K, et al. Artepillin C (ARC) in Brazilian green propolis selectively blocks oncogenic PAK1 signaling and suppresses the growth of NF tumors in mice. Phyther Res

2009;23:423–7. doi:10.1002/ptr.2658.

Metternich JB, Gilmour R. A Bio-Inspired, Catalytic e → Z Isomerization of Activated Olefins. J Am Chem Soc 2015;137:11254–7. doi:10.1021/jacs.5b07136.

Mohammad Akhoundi, Tim Downing, Jan Votýpka, Katrin Kuhls, Julius Luke, Arnaud Cannet, Christophe Ravel, Pierre Marty, Pascal Delaunay, Mohamed Kasbari, Bruno Granouillac LG and DS. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. Mol Aspects Med 2017;57:1–29. doi:10.1016/j.mam.2016.11.012.

Moreira MR, Souza AB, Moreira MA, Bianchi TC, Carneiro LJ, Estrela FT, et al. RP-HPLC analysis of manool-rich Salvia officinalis extract and its antimicrobial activity against bacteria associated with dental caries. Rev Bras Farmacogn - BrazilianJournal Pharmacogn 2013;23:870–6. doi:10.1590/S0102-695X2013000600003.

Oliveira PF De, Souza IM De, Munari CC, Bastos JK, Alves A, Tavares DC. Comparative Evaluation of Anti- proliferative Effects of Brazilian Green Propolis , Its Main Source Baccharis dracunculifolia , and Their Major Constituents Artepillin C and Baccharin. Planta Med 2014;80:490–2. doi:10.1055/s-0031.

Patel S. Emerging Adjuvant Therapy for Cancer: Propolis and its Constituents. J Diet Suppl 2016;13:245–68. doi:10.3109/19390211.2015.1008614.

Patra JK, Kim ES, Oh K, Kim HJ, Dhakal R, Kim Y, et al. Bactericidal effect of extracts and metabolites of Robinia pseudoacacia L. on Streptococcus mutans and Porphyromonas gingivalis causing dental plaque and periodontal inflammatory diseases. Molecules 2015;20:6128–39. doi:10.3390/molecules20046128.

Paulino N, Abreu SRL, Uto Y, Koyama D, Nagasawa H, Hori H, et al. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. Eur J Pharmacol 2008;587:296–301. doi:10.1016/j.ejphar.2008.02.067.

Pei K, Ou J, Huang J, Ou S. p-Coumaric acid and its conjugates: Dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. J Sci Food Agric 2016;96:2952–62. doi:10.1002/jsfa.7578.

Phillips KM, Council-Troche M, McGinty RC, Rasor AS, Tarrago-Trani MT. Stability of vitamin C in fruit and vegetable homogenates stored at different temperatures. J Food Compos Anal 2016;45:147–62. doi:10.1016/j.jfca.2015.09.008.

Pinto LC, Soares BM, Pinheiro J de JV, Riggins GJ, Assumpção PP, Burbano RMR, et al. The anthelmintic drug mebendazole inhibits growth, migration and invasion in gastric cancer cell model. Toxicol Vitr 2015;29:2038–44. doi:10.1016/j.tiv.2015.08.007.

Pontin K, Da Silva Filho AA, Santos FF, Silva MLAE, Cunha WR, Nanayakkara NPD, et al. In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. Parasitol Res 2008;103:487–92. doi:10.1007/s00436-008-0970-z.

Rebouças-Silva J, Celes FS, Lima JB, Barud HS, De Oliveira CI, Berretta AA, et al. Parasite Killing of Leishmania (V) braziliensis by Standardized Propolis Extracts. Evidence-Based Complement Altern Med 2017;2017. doi:10.1155/2017/6067172.

Rodriguez-Amaya DB. Natural food pigments and colorants. Bioact. Mol. Food, 2019, p. 867–901. doi:10.1016/J.COFS.2015.08.004.

DA SILVA, S. S.; THOMÉ, G. S.; CATANEO, A. H. D.; MIRANDA, M. M.; FELIPE, I.; ANDRADE, C. G. T. J.; WATANABE, M. A. E.; PIANA, G. M.; SFORCIN, J. M.; PAVANELLI, W. R.; COSTA IC. Brazilian Propolis Antileishmanial and Immunomodulatory Effects. Evidence-Based Complement Altern Med 2013:1–7.

Skold M, Borje A, Harambasic E, Karlberg AT. Contact allergens formed on air exposure of linalool. Identification and quantification of primary and secondary oxidation products and the effect on skin sensitization. Chem Res Toxicol 2004;17:1697–705. doi:10.1021/tx049831z.

de Sousa JPB, Bueno PCP, Gregório LE, da Silva Filho AA, Furtado NAJC, de Sousa ML, et al. A reliable quantitative method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian propolis by reverse phase high performance liquid chromatography. J Sep Sci 2007;30:2656–65. doi:10.1002/jssc.200700228.

Souza AB, Moreira MR, Borges CHG, Simão MR, Bastos JK, de Sousa JPB, et al. Development and validation of a rapid RP-HPLC method for analysis of (-)-copalic acid in copaíba oleoresin. Biomed Chromatogr 2013;27:280–3. doi:10.1002/bmc.2788.

Szliszka E, Zydowicz G, Mizgala E, Krol W. Artepillin C (3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid) sensitizes LNCaP prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. Int J Oncol 2012;41:818–28. doi:10.3892/ijo.2012.1527.

Tazawa S, Warashina T, Noro T, Miyase T. Studies on the Constituents of Brazilian Propolis. Chem Pharm Bull 1998;46:1477–9. doi:10.1248/cpb.37.3229.

Teerasripreecha, Dungporn, Phuwapraisirisan P, Chanchao C, Kimura K, Puthong S, Teerasripreecha D, Mori H, et al. In vitro antiproliferative/cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai Apis mellifera propolis. BMC Complement Altern Med 2012;12:1–17. doi:10.1186/1472-6882-12-27.

Teixeira MVS, Lima JQ, Pimenta ATA, Silva FRL d., Oliveira M da CF d., Pereira IG, et al. New flavone and other compounds from Tephrosia egregia: assessing the cytotoxic effect on human tumor cell lines. Brazilian J Pharmacogn 2018;28:333–8. doi:10.1016/j.bjp.2018.03.008.

Toreti VC, Sato HH, Pastore GM, Park YK. Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin. Evidence-Based Complement Altern Med 2013;2013:1–13. doi:10.1155/2013/697390.

Turek C, Stintzing FC. Stability of essential oils: A review. Compr Rev Food Sci Food Saf 2013;12:40–53. doi:10.1111/1541-4337.12006.

Urushisaki T, Takemura T, Tazawa S, Fukuoka M, Hosokawa-Muto J, Araki Y, et al. Caffeoylquinic acids are major constituents with potent anti-influenza effects in brazilian green propolis water extract. Evidence-Based Complement Altern Med 2011;2011. doi:10.1155/2011/254914.

Valente A, Sanches-Silva A, Albuquerque TG, Costa HS. Development of an orange juice in-house reference material and its application to guarantee the quality of vitamin C determination in fruits, juices and fruit pulps. Food Chem 2014;154:71–7. doi:10.1016/j.foodchem.2013.12.053.

Yi B, Hu L, Mei W, Zhou K, Wang H, Luo Y, et al. Antioxidant Phenolic Compounds of Cassava (. Molecules 2010;16:10157–67. doi:10.3390/molecules161210157.

Zhou T, Hu J, Li J. Er3+doped bismuth molybdate nanosheets with exposed {010} facets and enhanced photocatalytic performance. Appl Catal B Environ 2011;110:221–30. doi:10.1016/j.apcatb.2011.09.004.