

ISOLAMENTO DE DITERPENOS DA PRÓPOLIS MARROM BRASILEIRA DE ARAUCARIA SP

João Victor Andrade¹; Ana Carla R. Rosa¹; Hílary O. G. Caprini¹; Leonardo B. Verly¹; Cecília F. P. M. Marques¹; Giulia S. Miranda¹; Gabriel F. A. Vieira¹; Mário F. C. Santos¹; Rodrigo C. S. Veneziani²; Sérgio R. Ambrósio².

¹ Universidade Federal do Espírito Santo. Alto Universitário s/n – Guararema, 29500-000, Alegre, Espírito Santo, Brasil, joavictorandrade927@gmail.com, anacarlarangelrosa@yahoo.com, hillarygcaprini214@gmail.com, leobindelli@gmail.com, ceciliafernandespmm@gmail.com, giustavarakas@gmail.com, finottigabriel1@gmail.com, mariosantos408@gmail.com.

² Núcleo de Pesquisa em Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade de Franca, Franca, SP, Brazil, rodrigo.veneziani@unifran.edu.br, sergio.ambrosio@unifran.edu.br.

Palavras-Chave: Produtos naturais, Alternativas terapêuticas, Abelhas.

Introdução

O uso de medicamentos à base de produtos naturais tem crescido significativamente nos últimos anos, refletindo uma tendência global de busca por alternativas terapêuticas mais seguras e sustentáveis. Este movimento é impulsionado por diversos fatores, incluindo a crescente conscientização sobre os efeitos colaterais dos medicamentos sintéticos, a valorização dos conhecimentos tradicionais e a demanda por produtos que respeitem o meio ambiente (Talk Science, 2019).

A indústria farmacêutica tem investido fortemente na pesquisa e desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos, que são obtidos a partir de matérias-primas vegetais. Em 2011, o mercado mundial de fitoterápicos movimentou cerca de US\$ 26 bilhões, representando 3,2% do total de vendas de medicamentos naquele ano. No Brasil, o mercado de fitoterápicos movimentou R\$ 1,1 bilhão no mesmo período, evidenciando o potencial de crescimento deste setor (Talk Science, 2019).

A eficácia dos medicamentos à base de produtos naturais é respaldada por inúmeros estudos científicos. Pesquisas indicam que muitos desses produtos possuem propriedades terapêuticas comprovadas, como atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes. Por exemplo, a própolis, uma substância resinosa produzida pelas abelhas, tem demonstrado eficácia no combate a uma variedade de patógenos, além de possuir propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras (Bankova *et al.*, 2014; Sforcin, 2016).

A demanda por medicamentos naturais também é impulsionada por mudanças regulatórias que facilitam o acesso a esses produtos. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) tem implementado políticas que incentivam a produção e comercialização de fitoterápicos, tornando-os mais acessíveis à população. Além disso, o envelhecimento da população e o aumento do poder de consumo entre os brasileiros têm contribuído para a expansão deste mercado (Anvisa, 2023).

A própolis é uma substância resinosa produzida pelas abelhas a partir de exsudatos vegetais, combinados com cera e secreções salivares das abelhas. Este composto é utilizado pelas abelhas para revestir e proteger a colmeia, criando uma barreira contra microrganismos e outros invasores (Bankova *et al.*, 2014).

A composição química da própolis varia conforme a flora local, mas geralmente inclui flavonoides, ácidos fenólicos, terpenos e outros compostos bioativos. Estudos demonstram que

a própolis possui propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antioxidantes e imunomoduladoras, tornando-a eficaz no combate a bactérias, vírus e fungos, além de fortalecer o sistema imunológico (Sforcin, 2016).

A atividade antimicrobiana da própolis tem sido amplamente documentada. Pesquisas indicam que a própolis é eficaz contra uma variedade de patógenos, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. A presença de flavonoides e ácidos fenólicos é atribuída a essa atividade, pois esses compostos interferem na membrana celular dos microrganismos, levando à sua destruição (Silva-Carvalho *et al.*, 2015).

Além disso, a própolis apresenta propriedades anti-inflamatórias significativas. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que a própolis pode inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-1 beta (IL-1 β). Esses efeitos são mediadores pela inibição da via de sinalização NF- κ B, que desempenha um papel crucial na resposta inflamatória (Borrelli *et al.*, 2002).

A capacidade antioxidante da própolis também é notável. A presença de compostos fenólicos permite que a própolis neutralize radicais livres, reduzindo o estresse oxidativo e prevenindo danos celulares. Estudos sugerem que a própolis pode proteger contra doenças crônicas, como câncer e doenças cardiovasculares, ao mitigar os efeitos nocivos dos radicais livres (Watanabe *et al.*, 2011).

Nesse sentido, o presente estudo visa realizar uma avaliação química detalhada da própolis marrom brasileira, utilizando métodos cromatográficos avançados para o isolamento e identificação dos principais compostos bioativos presentes. Através do uso de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção por arranjo de diodos (RP-HPLC/DAD), pretende-se desenvolver e validar um método analítico capaz de quantificar seis diterpenos, seguindo as diretrizes da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Material e Métodos

Foram coletadas amostras de própolis marrom de *Apis mellifera* e resina de *Araucaria sp.* em União da Vitória, Paraná, Brasil. Após a remoção de impurezas, esses produtos resinosos foram armazenados em frascos âmbar e mantidos a -20°C .

Para o isolamento dos principais diterpenos, 50 g de própolis marrom foram extraídos com 6 litros de uma solução hidroalcoólica de etanol-água (7:3 v/v) por 24 horas por maceração. Após a remoção do solvente a vácuo, foi obtido 20 g de extrato bruto hidroalcoólico da própolis marrom (EHBSP). Uma fração de 12 g deste extrato foi submetida a cromatografia HPLC preparativa usando uma coluna semipreparativa e uma fase móvel gradiente. Foram obtidas 20 frações, das quais foram isolados seis diterpenos principais. Os compostos foram analisados por espectroscopia de RMN para confirmação da pureza e estrutura.

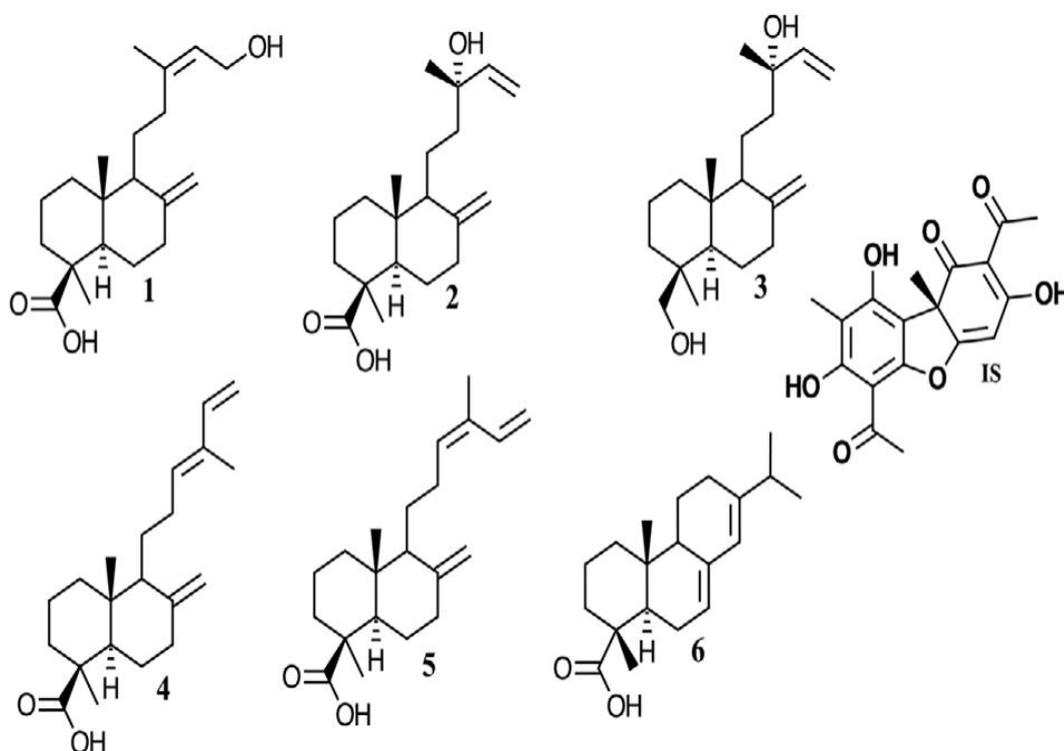
Resultados e Discussão

Para desenvolver métodos analíticos cromatográficos, primeiro é necessário realizar uma caracterização química das amostras por meio do isolamento e da identificação de seus principais compostos. Em seguida, os compostos isolados podem ser usados em estudos de investigação farmacológica e toxicológica para selecionar os marcadores químicos e os metabólitos ativos [13, 27, 28] e para desenvolver métodos analíticos para o controle de qualidade de fontes naturais, extratos e produtos [22-25].

Os compostos 1-6 (Figura 1) foram isolados como diterpenos principais do extrato hidroalcoólico do BPS. Os dados espectroscópicos (^1H e ^{13}C -NMR) de todos os compostos estão em total concordância com aqueles relatados anteriormente na literatura [29-32]: ácido isocuprésico (1), ácido 13-epi-cuprésico (2), epi-13-toruloso (3), ácido trans-comunicante (4),

ácido ciscomunicante (5) e ácido abiético (6). As purezas desses diterpenos foram estimadas por análises de RP HPLC/DAD, 1H e 13C NMR entre 94 e 97%. O isolamento de metabólitos secundários é uma das etapas mais importantes no campo de pesquisa de produtos naturais e áreas relacionadas. Assim, a seleção do processo cromatográfico é crucial para o sucesso dos estudos. Além disso, foram relatados métodos de HPLC para isolar e analisar os principais compostos [33, 34]. Nesse sentido, a HPLC com um detector de arranjo de fotiodos é o método mais usado para determinar os constituintes e a purificação em larga escala.

FIGURA 1 - Estruturas químicas do diterpeno isolado de própolis marrom (1-6) e padrão interno (IS) ácido úsnico.



FONTE: Os autores (2024).

A soma dos teores dos compostos 1-6, quantificados pelo uso do método analítico desenvolvido, correspondeu a aproximadamente 78% do total de BPS, considerando o ácido isocuprêsico (1; 10,78%), o ácido 13-epi-cuprêsico (2; 14,50%), o epi-13-torulol (3; 17,42%), o ácido trans-comunicante (4; 6,58%), o ácido cis-comunicante (5; 11,75%) e o ácido abiético (6; 16,99%). Uma comparação entre os dois estudos nos permitiu observar que os diterpenos ácido isocuprêsico (1), ácido trans-comunicante (4), ácido cis-comunicante (5) e ácido abiético (6) foram isolados e identificados em ambos os estudos.

Essas informações coincidentes denotam a relevância desses quatro diterpenos na BPS e sugerem que tais metabólitos devem ser considerados marcadores químicos desse tipo de própolis brasileira. No entanto, diterpenos distintos também foram obtidos nessas pesquisas, o que reforça a necessidade de estudos adicionais para investigar os efeitos sazonais no metabolismo secundário dessa resina natural.

Conclusão

O método analítico RP-HPLC/DAD descrito demonstra alta confiabilidade na identificação e quantificação de seis diterpenos presentes na própolis marrom brasileira



originária de *Araucaria* sp, produzida por *Apis mellifera* no estado do Paraná. Os diterpenos ácido isocupressico, ácido trans-comunicico, ácido cis-comunicico e ácido abietico são considerados adequados como marcadores químicos para a própolis de *Araucaria*. O método desenvolvido cumpre rigorosamente as diretrizes estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e comprovou ser preciso, sensível e confiável para a análise da própolis marrom de *Araucaria*.

Referências

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Anuário Estatístico do Mercado Farmacêutico 2022**. Brasília: ANVISA, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/medicamentos/cmed/anuario-estatistico-2022>. Acesso em: 09 set. 2024.
- Bankova, V.; Popova, M.; Trusheva, B. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. **Chemistry Central Journal**, v. 8, p. 1-8, 2014.
- Borrelli, F.; Maffia, P; Pinto, L.; Ianaro, A.; Russo, A.; Capasso, F.; Ialenti, A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**, v. 73, p. S53-S63, 2002.
- Sforcin, J. M. Biological properties and therapeutic applications of propolis. **Phytotherapy research**, v. 30, n. 6, p. 894-905, 2016.
- Silva-Carvalho, R.; Baltazar, F.; Almeida-Aguiar, C. Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, n. 1, p. 206439, 2015.
- Talk Science. **Tendência dos insumos naturais para produção de medicamentos**. Talk Science. Disponível em: <https://www.talkscience.com.br/industria-farmaceutica/tendencia-dos-insumos-naturais-para-producao-de-medicamentos>. Acesso em: 09 set. 2024.
- Watanabe, M. A. E.; Amarante, M. K.; Conti, B. J.; Sforcin, J. M. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 11, p. 1378-1386, 2011.