

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Lorena Rodrigues Riani

**Artepilina C: isolamento, desenvolvimento e validação de metodologia de
quantificação por CLUE-EM-Q-TOF e avaliação das atividades biológicas em
Caenorhabditis elegans e Zebrafish**

Juiz de Fora
2017

Lorena Rodrigues Riani

Artepilina C: isolamento, desenvolvimento e validação de metodologia de quantificação por CLUE-EM-Q-TOF e avaliação das atividades biológicas em *Caenorhabditis elegans* e Zebrafish

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas – Área de concentração: Produtos naturais bioativos.

Orientador: Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho

Juiz de Fora

2017

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Riani, Lorena Rodrigues.

Artepilina C: isolamento, desenvolvimento e validação de metodologia de quantificação por CLUE-EM-Q-TOF e avaliação das atividades biológicas em *Caenorhabditis elegans* e Zebrafish / Lorena Rodrigues Riani. -- 2017.

117 p.

Orientador: Ademar Alves da Silva Filho

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2017.

1. Artepilina C. 2. Própolis verde. 3. CLUE-EM. 4. *C. elegans*. 5. Zebrafish. I. da Silva Filho, Ademar Alves, orient. II. Título.

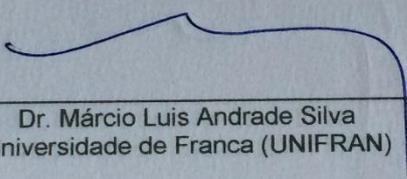
Artepilina C: isolamento, desenvolvimento de metodologia de quantificação por CLUE-EM-Q-TOF e avaliação das atividades biológicas em *Caenorhabditis elegans* e Zebrafish

Lorena Rodrigues Riani

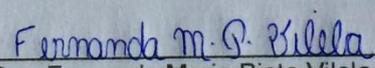
ORIENTADOR: Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

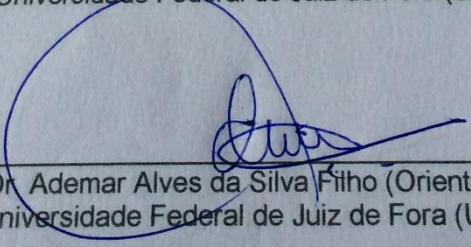
Aprovada em 27/07/2017



Dr. Márcio Luis Andrade Silva
Universidade de Franca (UNIFRAN)



Dra. Fernanda Maria Pinto Vilela
Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)



Dr. Ademar Alves da Silva Filho (Orientador)
Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)

*Dedico este trabalho à memória de meu amado pai Tadeu, minha fonte de
inspiração, exemplo de honestidade, dedicação e amor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por guiar o meu caminho e me ensinar que nem sempre o que eu desejo é o melhor para mim no momento. Por me ensinar a ter calma para compreender o caminho traçado por mim e por ser força nos momentos de incerteza e tristeza.

Ao meu pai Tadeu, que embora não esteja presente em corpo físico, foi o maior incentivador deste trabalho e esteve comigo todos os dias em pensamento. À minha mãe Gizela, minha maior e melhor companhia, exemplo de amor e bondade. À minha irmã Larissa, exemplo de amor ao próximo e dedicação, por sua amizade. Esta conquista, sem dúvida, é de vocês.

Ao Dudu, por todo amor, incentivo e ajuda nos momentos mais difíceis. Por dar o seu melhor quando mais precisei e por ser fonte de alegria nos momentos de descanso.

Às minhas amigas do colégio e do Octano, por permitirem sempre momentos alegres e divertidos e por estarem presentes nos momentos difíceis.

Aos professores Dra. Luciana Chedier e Dr. Daniel Pimenta, que foram essenciais durante a iniciação científica e, em especial à Luciana, por toda a amizade.

Aos amigos que conquistei na CIMED indústria de medicamentos LTDA, com quem aprendi muito do que foi possível aplicar neste trabalho.

Aos amigos que conquistei no laboratório NIPPAN, obrigada por me receberem de braços abertos neste grupo que levarei comigo para sempre, vocês são maravilhosos! Obrigada à Lívia, pela amizade, companhia diária e pelas conversas, à Poli, por toda a amizade e à Débora, pelo mês português que passamos juntas. Ohana, Lauriene, Lara, Clarissa, Paulo Henrique, Allan, Lucas, Matheus, Ismael, Thalita, Vinícius, Bianca, Fernanda, Reinaldo, Larinha, Monique e Marcela, foi um presente pra mim conhecer todos vocês.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ademar, por me receber em seu laboratório e me passar todo seu conhecimento, sempre disposto a ajudar e entusiasmado com os resultados.

Ao Prof. Dr. Alberto Dias e seus alunos Nikola, Rejaine, Elizabeth, Inês e Bianca e ao Dr. Carlos Bessa, pelos dois meses de aprendizado na Universidade do Minho, em Braga, Portugal.

Ao Prof. Dr. Marcone e ao Dr. Fernando Simas Vaz, por toda ajuda nos testes em eletroforese capilar.

Ao Prof. Dr. Jorge Willian, por toda ajuda e paciência com as análises de validação analítica.

À Carolina Gasparetto, pela ajuda constante na CentralBio.

Ao Prof. Dr. Lyderson e à Sirlei Julião, por toda ajuda e paciência com os testes de cultivo *in vitro*.

Ao Prof. Dr. Luis David Solis Murgas, por disponibilizar o seu laboratório para os ensaios com Zebrafish, e às suas alunas Dra. Gilmara Junqueira, Bárbara Rodrigues e Isabela, por toda a ajuda nos ensaios.

Ao Dr. Humberto de Mello Brandão, da EMBRAPA Gado de Leite, pela doação da artepilina C (Wako).

À CAPES pela bolsa concedida.

Obrigada!

*“Se todas as coisas boas durassem para sempre,
você saberia como são importantes?”
Bill Waterson*

RESUMO

A artepilina C é o principal marcador químico utilizado no controle de qualidade da própolis verde, a qual é produzida especialmente em Minas Gerais e comercializada principalmente para o Japão e que possui como principal fonte botânica a planta *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae). Entre as técnicas que podem ser utilizadas para a análise da artepilina C, a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) acoplada a espectrometria de massas (EM) apresenta inúmeras vantagens. Em relação às suas atividades biológicas, a artepilina C apresenta ação antioxidante e antitumoral, não tendo sido ainda avaliada sua embriotoxicidade e atividade antienvhecimento. O presente trabalho teve como objetivos isolar a artepilina C, desenvolver e validar método analítico de quantificação dessa substância por CLUE-EM-Q-TOF, bem como determinar sua atividade antienvhecimento em nematoides *Caenorhabditis elegans* e sua toxicidade em embriões de Zebrafish. Para isolar a artepilina C de amostra de própolis verde, foi realizada extração básica seguida de acidificação, com posterior fracionamento por cromatografia líquida a vácuo (CLV) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) semipreparativa. Para identificação da substância, foi realizada análise por CLAE e ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C . Após isolamento, a substância foi utilizada como padrão para validação de metodologia de quantificação da artepilina C em própolis verde por CLUE-EM-Q-TOF. A metodologia mostrou-se específica, linear, precisa, exata e robusta nas condições avaliadas. Em relação aos ensaios biológicos frente ao nematoide *C. elegans*, a artepilina C não foi tóxica ao animal, em nenhuma das concentrações avaliadas. Contudo, a artepilina C (125 μM) não foi capaz de prolongar seu tempo de vida. Em embriões de Zebrafish, a substância foi tóxica nas concentrações de 250, 125 e 50 μM , indicando a necessidade de estudos mais aprofundados quanto à sua embriotoxicidade.

Palavras-chave: Artepilina C. Própolis verde. CLUE-EM. *C. elegans*. Zebrafish.

ABSTRACT

Artepillin C is the main chemical marker used in quality control of green propolis, which is produced especially in Minas Gerais and marketed mainly to Japan, being *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae) its main botanical source. Among the techniques that can be used for the analysis of artepillin C, ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) coupled with mass spectrometry (MS) has many advantages. Regarding its biological activities, artepillin C shows antioxidant and antitumor action, and its embryotoxicity and antiaging activity have not been evaluated yet. The aim of this work was to isolate artepillin C, to develop and validate the analytical method of quantification of this substance by UHPLC-MS-Q-TOF, as well as to determine its antiaging activity in *Caenorhabditis elegans* nematodes and its toxicity in Zebrafish embryos. To isolate the artepillin C from green propolis sample, basic extraction was performed followed by acidification, with subsequent fractionation by vacuum liquid chromatography (VLC) and semipreparative high performance liquid chromatography (HPLC). HPLC and nuclear magnetic resonance (NMR) ^1H and ^{13}C analysis were performed for the substance identification. After isolation, the substance was used as standard for validation of quantification methodology of artepillin C in green propolis by UHPLC-MS-Q-TOF. The methodology was specific, precise, accurate and robust for the evaluated conditions. About the biological assays in *C. elegans* nematode, artepillin C was not toxic for the animal at any of evaluated concentrations. However, artepillin C (125 μM) was not able to prolong its life span. In Zebrafish embryos, the substance was toxic at 250, 125 e 50 μM concentrations, showing the need for further studies about its embryotoxicity.

Keywords: Artepillin C. Green propolis. UHPLC-MS. *C. elegans*. Zebrafish

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química da artepilina C.....	21
Figura 2	<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC.....	22
Figura 3	Estruturas químicas de substâncias encontradas em extratos de <i>Baccharis dracunculifolia</i>	23
Figura 4	Abelha <i>Apis mellifera</i> no momento da coleta de material resinoso de ápices foliares de <i>Baccharis dracunculifolia</i>	24
Figura 5	Própolis verde obtida comercialmente.....	26
Figura 6	Estruturas químicas de substâncias encontradas em própolis verde.....	28
Figura 7	Ionização por electrospray (ESI).....	34
Figura 8	Analisador de massas do tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF).....	36
Figura 9	Ciclo de vida de <i>Caenorhabditis elegans</i>	41
Figura 10	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	43
Figura 11	Embriões de Zebrafish em placa de petri.....	44
Figura 12	Fluxograma de obtenção do precipitado (PPT).....	48
Figura 13	Cromatografia líquida a vácuo (CLV) do precipitado (PPT)..	50
Figura 14	Diagrama de distribuição da artepilina C em função do pH..	63
Figura 15	CCD do padrão de artepilina C (Wako Pure Chemical) e precipitado obtido (PPT).....	63
Figura 16	Perfil cromatográfico e espectro de UV do padrão de artepilina C (Wako Pure Chemical) em CLAE-DAD e o tempo de retenção.....	64
Figura 17	Perfil cromatográfico do precipitado (PPT) em CLAE-DAD, espectro de UV do pico majoritário e tempos de retenção dos picos.....	64
Figura 18	CCDs das frações obtidas por CLV do precipitado (PPT).....	65
Figura 19	Perfil cromatográfico da eluição em gradiente da fração Pv-A em CLAE-DAD, espectro de UV do pico majoritário e tempo de retenção dos picos.....	66

Figura 20	Perfil cromatográfico da eluição isocrática (MeOH 80 %) da fração Pv-A em CLAE-DAD, espectro de UV do pico majoritário e tempo de retenção dos picos.....	67
Figura 21	Perfil cromatográfico da eluição isocrática (MeOH 75 %) da fração Pv-A em CLAE-DAD, espectro de UV do pico majoritário e tempo de retenção dos picos.....	67
Figura 22	Perfil cromatográfico em escala semipreparativa da fração Pv-A em CLAE-DAD, espectro de UV do pico majoritário e tempo de retenção dos picos.....	68
Figura 23	Perfil cromatográfico e espectro de UV da substância isolada obtida em CLAE-DAD.....	69
Figura 24	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da substância isolada.....	70
Figura 25	Expansão da região dos hidrogênios olefínicos H-2 e H-3 e aromáticos H-5 e H-5' do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da substância isolada.....	70
Figura 26	Expansão da região dos hidrogênios metilênicos H-8 e H-8' e olefínicos H-9 e H-9' do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da substância isolada.....	71
Figura 27	Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) da substância isolada.....	72
Figura 28	Perfil cromatográfico do padrão de artepilina C (Wako Pure Chemical) para determinação de pureza em CLAE-DAD, espectro de UV e tempo de retenção.....	75
Figura 29	Perfil cromatográfico da artepilina C isolada para determinação de pureza em CLAE-DAD, espectro de UV e tempo de retenção.....	75
Figura 30	Avaliação da infusão direta de artepilina C em detector Q-TOF utilizando energias de colisão de 0, 15, 25 e 30 eV.....	76
Figura 31	Proposta de fragmentação da artepilina C.....	77
Figura 32	Análise de amostra de própolis verde por CLUE-EM-Q-TOF na condição 1.....	78

Figura 33	Análise de amostra de própolis verde por CLUE-EM-Q-TOF na condição 2.....	79
Figura 34	Estruturas químicas da diidrocanferida e da canferida.....	80
Figura 35	Análise de amostra de própolis verde por CLUE-EM-Q-TOF na condição 3.....	81
Figura 36	Análise de amostra de própolis verde por CLUE-EM-Q-TOF na condição 4.....	82
Figura 37	Análise de amostra de própolis verde por CLUE-EM-Q-TOF na condição 4, realizando seleção m/z (299 → 200,12).....	83
Figura 38	Cromatogramas de especificidade do método de quantificação da artepilina C por CLUE-EM-QTOF.....	84
Figura 39	Cromatogramas de linearidade e espectro de massas da menor concentração do método de quantificação da artepilina C por CLUE-EM-Q-TOF.....	85
Figura 40	Linearidade (curva de calibração) da artepilina C em método de quantificação da artepilina C por CLUE-EM-Q-TOF.....	86
Figura 41	Cromatogramas de precisão por repetibilidade e precisão intermediária do método de quantificação da artepilina C por CLUE-EM-Q-TOF.....	88
Figura 42	Cromatogramas de exatidão do método de quantificação da artepilina C por CLUE-EM-Q-TOF.....	91
Figura 43	Cromatogramas de robustez de temperatura do método de quantificação da artepilina C por CLUE-EM-Q-TOF.....	92
Figura 44	Cromatogramas de robustez de fluxo do método de quantificação da artepilina C por CLUE-EM-Q-TOF.....	93
Figura 45	Toxicidade de artepilina C em <i>Caenorhabditis elegans</i>	95
Figura 46	Longevidade de <i>Caenorhabditis elegans</i> frente a artepilina C.....	97
Figura 47	Embriões de Zebrafish, visualizados em microscópio 48hpf..	99
Figura 48	Taxa de eclosão de embriões de Zebrafish frente ao tratamento com artepilina C.....	100
Figura 49	Zebrafish eclodido vivo 48hpf.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Frações obtidas por CLV do PPT de própolis verde.....	50
Tabela 2	Condições testadas no desenvolvimento de metodologia de quantificação da artepilina C por CLUE-EM-Q-TOF.....	53
Tabela 3	Comparação dos dados de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) e ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) da substância isolada com os da literatura.....	73
Tabela 4	Resultados da precisão em método de quantificação da artepilina C por CLUE-EM-Q-TOF.....	87
Tabela 5	Resultados da exatidão em método de quantificação da artepilina C por CLUE-EM-Q-TOF.....	90
Tabela 6	Resultados da robustez de método de quantificação da artepilina C por CLUE-EM-Q-TOF.....	92
Tabela 7	Porcentagem (%) de embriões vivos após a exposição a artepilina C, ao longo do tempo de desenvolvimento.....	99
Tabela 8	Porcentagem (%) de larvas de Zebrafish vivas, após a exposição a artepilina C, ao longo do tempo de desenvolvimento.....	101
Tabela 9	Porcentagem (%) de alterações morfológicas nas larvas de Zebrafish, após exposição a artepilina C, ao longo do tempo de desenvolvimento.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACN - Acetonitrila
- AME – Aromadendrina-4'-metil éter
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APCI – Ionização Química a Pressão Atmosférica
- APPI – Ionização por Fótons a Pressão Atmosférica
- CaCl₂ – Cloreto de Cálcio
- CCD – Cromatografia em Camada Delgada
- CDCl₃ – Clorofórmio deuterado
- CG – Cromatografia em fase gasosa
- CH₂Cl₂ – Diclorometano
- CHCl₃ - Clorofórmio
- CI – Ionização Química
- CL – Cromatografia Líquida
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CLAE-UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de Ultravioleta
- CLUE – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
- CLUE-EM – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a detector de Espectrometria de Massas
- CLUE-EM-Q-TOF – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a detector de Espectrometria de Massas com analisador de massas do tipo Quadrupolo acoplado a Tempo de Vôo
- CLV – Cromatografia líquida a vácuo
- CuSO₄•5H₂O – Sulfato de Cobre penta-hidratado
- CV – Coeficiente de variação
- DAD – Detector de arranjo de diodos
- DCBEN – Ácido 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-benzopirano
- DIC – Dissociação Induzida por Colisão
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DPR – Desvio padrão relativo
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EI – Impacto Eletrônico

EM – Espectrometria de Massas
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EROs – Espécies Reativas do Oxigênio
ESI – Ionização por Electrospray
FDA – *Food and Drug Administration*
FET – Teste de toxicidade aguda em peixes
FeSO₄•7H₂O – Sulfato de Ferro hepta-hidratado
ICH – *International Conference on Harmonization*
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IR – Índice de Refração
K₂HPO₄ – Fosfato de potássio dibásico
KH₂PO₄ – Fosfato de potássio monobásico
KOH – Hidróxido de Potássio
LD – Limite de detecção
LQ – Limite de quantificação
m/z – Razão massa/carga
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MeOH – Metanol
MgSO₄ – Sulfato de Magnésio
MgSO₄•7H₂O – Sulfato de Magnésio hepta-hidratado
MnCl₂•4H₂O – Cloreto de Manganês tetra-hidratado
Na₂CO₃ – Carbonato de Sódio
Na₂EDTA – EDTA dissódico
Na₂HPO₄•7H₂O – Hidrogenofosfato dissódico hepta-hidratado
NaCl – Cloreto de Sódio
NaClO – Hipoclorito de Sódio
NaOH – Hidróxido de Sódio
OECD – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS – Organização Mundial da Saúde
pH – Potencial hidrogeniônico
PPT - Precipitado
Q – Quadrupolo
Q-TOF – Quadrupolo acoplado a tempo de voo
QqQ – Triplo quadrupolo

Rf – Fator de retenção

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SIM – Monitoramento de íons selecionados

SRM – Monitoramento de reações selecionadas

TIC – Cromatograma de íons totais

TMS - Tetrametilsilano

TOF – Tempo de voo

UV – Ultravioleta

ZnSO₄•7H₂O – Sulfato de Zinco hepta-hidratado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 <i>Baccharis dracunculifolia</i> DC. (ASTERACEAE)	22
2.2 PRÓPOLIS VERDE	25
2.3 ARTEPILINA C.....	29
2.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CLUE-EM).....	32
2.5 VALIDAÇÃO ANALÍTICA	37
2.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS EM MODELOS ANIMAIS	40
2.6.1 <i>Caenorhabditis elegans</i>	40
2.6.2 Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	42
3 OBJETIVOS	45
3.1 OBJETIVO GERAL	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 INSTRUMENTAÇÃO	46
4.2 ISOLAMENTO DA ARTEPILINA C	48
4.2.1 Obtenção de extrato enriquecido em artepilina C	48
4.2.2 Fracionamento cromatográfico do precipitado obtido	49
4.2.3 Isolamento de artepilina C por CLAE semipreparativa	50
4.3 IDENTIFICAÇÃO DA ARTEPILINA C	51
4.4 DETERMINAÇÃO DA PUREZA DA SUBSTÂNCIA ISOLADA.....	52
4.5 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO POR CLUE-EM-Q-TOF	52
4.6 VALIDAÇÃO ANALÍTICA DE METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO POR CLUE-EM-Q-TOF.....	54
4.7 ENSAIOS BIOLÓGICOS EM MODELOS ANIMAIS.....	56
4.7.1 <i>Caenorhabditis elegans</i>	56
4.7.1.1 <i>Ensaio de toxicidade</i>	57
4.7.1.2 <i>Ensaio de Longevidade</i>	59
4.7.2 Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	59
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1 ISOLAMENTO DA ARTEPILINA C A PARTIR DA PRÓPOLIS VERDE	62
5.1.1 Obtenção de extrato enriquecido em artepilina C	62
5.1.2 Fracionamento cromatográfico do precipitado obtido	65
5.1.3 Isolamento de artepilina C por CLAE semipreparativa	65
5.2 IDENTIFICAÇÃO DA ARTEPILINA C	68

5.3 DETERMINAÇÃO DA PUREZA DA SUBSTÂNCIA ISOLADA.....	73
5.4 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO POR CLUE-EM-Q-TOF	75
5.5 VALIDAÇÃO ANALÍTICA DE METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO POR CLUE-EM-Q-TOF.....	82
5.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS EM MODELOS ANIMAIS.....	94
5.6.1 <i>Caenorhabditis elegans</i>	94
5.6.1.1 <i>Ensaio de toxicidade</i>	94
5.6.1.2 <i>Ensaio de Longevidade</i>	95
5.6.2 Zebrafish	98
6 CONCLUSÃO	103
REFERÊNCIAS	104

1 INTRODUÇÃO

A busca pela cura de doenças sempre esteve presente ao longo da história da humanidade e o uso de produtos naturais para fins alimentares e medicinais é muito antigo (VIEGAS JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Assim, a história do desenvolvimento das civilizações é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina e no controle de pragas. O ópio, por exemplo, extraído de *Papaver somniferum* L., é conhecido há séculos por suas propriedades analgésicas e esta planta é utilizada há milhares de anos (LIMA, 2013).

O Brasil, com sua enorme biodiversidade e sendo o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, tem um papel importante na pesquisa dos produtos naturais. Aliada a isso, a rica diversidade étnica e cultural que detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais faz o país ter o potencial necessário para o desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas (OLIVEIRA et al., 2012; PINTO et al., 2002).

Ao final da década de 1970, a Organização Mundial da Saúde (OMS) criou o Programa de Medicina Tradicional que recomendava aos estados-membros o desenvolvimento de políticas públicas para facilitar a integração da medicina tradicional e da medicina complementar alternativa nos sistemas nacionais de atenção à saúde, assim como promover o uso racional dessa integração (BRASIL, 2006).

Sabe-se que, principalmente nos países em desenvolvimento, grande parte da população depende da medicina tradicional para seus cuidados básicos à saúde. Dessa forma, em 1991 a OMS reforçou a importância da contribuição da medicina tradicional, especialmente às populações que têm pouco acesso aos sistemas de saúde. Além disso, sugeriu que os produtos naturais, em particular os derivados de plantas, poderiam conduzir ao descobrimento de novas substâncias terapêuticas (BRASIL, 2006). Dessa forma, torna-se importante a pesquisa de produtos naturais e derivados de plantas.

A própolis, um produto resinoso e balsâmico, coletado e processado por abelhas, especialmente *Apis mellifera*, a partir de várias fontes vegetais vem ganhando destaque nos últimos anos. A composição da própolis é complexa e varia de acordo com alguns fatores, como a planta de origem, as estações do ano e características genéticas das abelhas (SOUSA et al., 2007a). A coloração da própolis é dependente de sua procedência, podendo variar do marrom escuro, passando por uma tonalidade

esverdeada até o marrom avermelhado. Possui um odor característico que pode variar de uma amostra para outra e seu potencial biológico se deve a um sinergismo que ocorre entre os seus muitos constituintes (LUSTOSA et al., 2008).

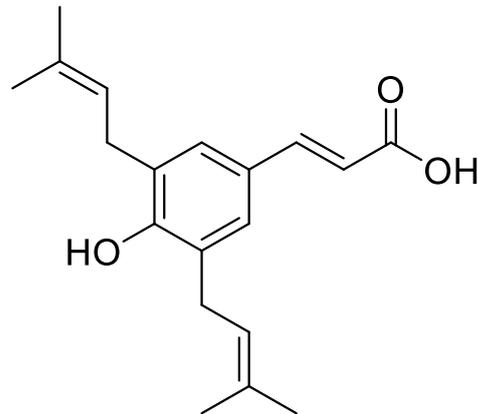
Entre os tipos de própolis existentes, a chamada própolis verde é obtida principalmente da espécie *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae), sendo produzida a partir dos ápices vegetativos desta planta, a qual é conhecida popularmente como “alecrim-do-campo” e “vassourinha”. *B. dracunculifolia* é um arbusto lenhoso que pode atingir até cerca de 4 metros de altura, sendo uma espécie perene, dioica, reproduzida por sementes e que apresenta galhos muito ramificados. Essa planta é nativa do Brasil, ocorrendo nas regiões sul, leste, centro e zona da mata de Minas Gerais, leste de São Paulo, norte do Paraná e em regiões serranas do Espírito Santo e Rio de Janeiro (SFORCIN et al., 2012). A produção da própolis verde está centrada em Minas Gerais, sendo que a própolis produzida pelo estado é considerada a melhor do mundo pelos japoneses (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

Por se tratar de uma mistura de substâncias, as quais variam de acordo com vários fatores, a padronização da própolis torna-se dificultada. A técnica mais utilizada para a análise química e controle de qualidade da própolis verde é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), especialmente a CLAE acoplada a detector de ultravioleta (UV) (FERNANDES-SILVA et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2008).

Atualmente, outras técnicas de análise estão disponíveis e apresentam vantagens em relação à CLAE-UV. A Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) é uma técnica mais avançada em relação à CLAE, já que possui melhor eficiência de separação das substâncias devido à redução no tamanho das partículas da fase estacionária. Além disso, o acoplamento desta técnica a detectores de espectrometria de massas (EM) apresenta a grande vantagem de ser muito mais específico em termos de identificação das substâncias presentes nas amostras analisadas (LEE et al., 2015; ORTEGA et al., 2010).

Entre os constituintes da própolis verde estão várias substâncias fenólicas, sendo uma das mais estudadas a artepilina C (Figura 1). Essa substância é um fenilpropanoide, utilizado como marcador químico no controle de qualidade desta própolis (NOBUSHI et al., 2012).

Figura 1 – Estrutura química da artepilina C



Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

Várias atividades biológicas têm sido reportadas para a artepilina C, entre elas a antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e, especialmente, a antitumoral (CHEUNG et al., 2011; IZUTA et al., 2009; MARQUIAFÁVEL et al., 2015; SZLISZKA et al., 2012). Modelos de avaliação biológica de substâncias potencialmente ativas, como o *Caenorhabditis elegans* e o Zebrafish (*Danio rerio*), têm sido utilizados atualmente como modelos alternativos a modelos *in vivo* em camundongos, por apresentarem vantagens como simplicidade nos ensaios, tempos de vida curtos e baixo custo (HERNÁNDEZ et al., 2015; LI et al., 2013).

Dessa forma, diante das vantagens da utilização da técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de espectrometria de massas (CLUE-EM) e da inexistência de métodos de quantificação da artepilina C em própolis verde utilizando essa técnica, torna-se importante o desenvolvimento e validação de metodologia com essa finalidade. Além disso, a inexistência de estudos utilizando os modelos animais *C. elegans* e Zebrafish para avaliação de atividade antienvhecimento e embriotoxicidade, respectivamente, da artepilina C e as vantagens relacionadas a esses modelos, tornam essa avaliação importante.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Baccharis dracunculifolia* DC. (ASTERACEAE)

Baccharis dracunculifolia DC. (Figura 2) é uma espécie pertencente à família Asteraceae, que possui cerca de 1.500 gêneros e 23 mil espécies. Quimicamente, esta família destaca-se pela enorme diversidade de metabólitos secundários, sendo caracterizada principalmente pela presença de terpenoides e flavonoides. Dentro desta família está o gênero *Baccharis* L. que possui cerca de 500 espécies, distribuídas principalmente no Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai (DA SILVA FILHO, 2012; ZDERO; BOHLMAN, 1990).

Figura 2 – *Baccharis dracunculifolia* DC.



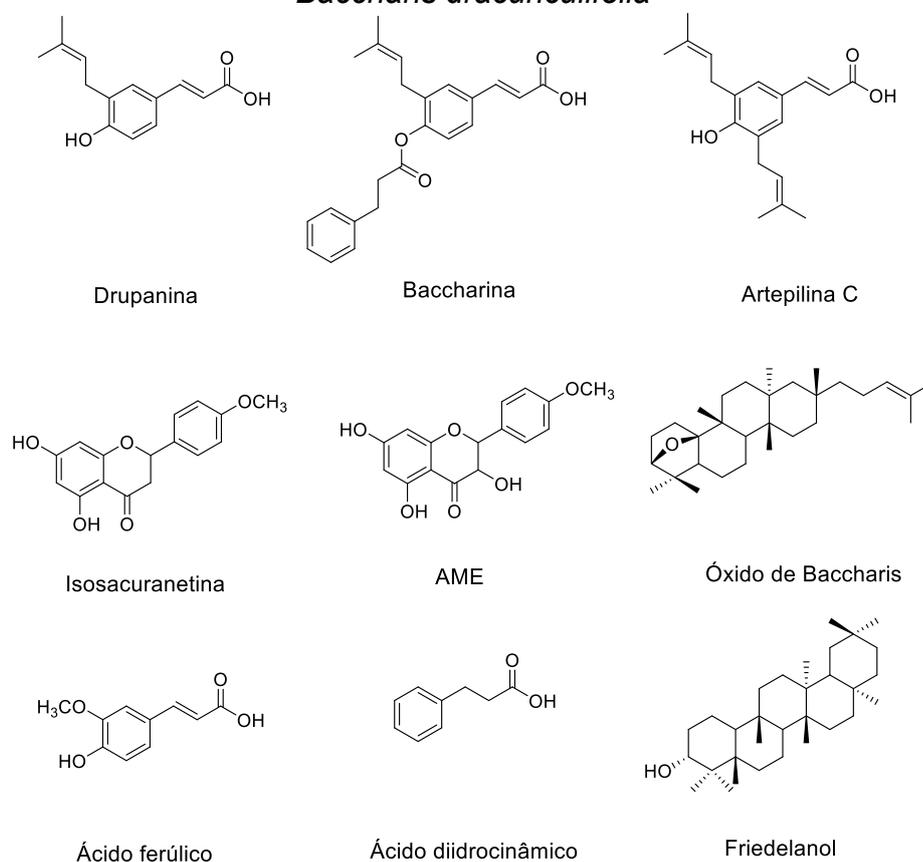
Fonte: Imagem cedida por Everton Allan Ferreira, 2017.

Conhecida popularmente como “alecrim-do-campo” e “vassourinha”, *B. dracunculifolia* é um arbusto dioico, perene e de características invasoras. Esta planta é nativa do Brasil, onde ocorre nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, principalmente nas áreas de cerrado, em pastagens abandonadas e em áreas em processo de sucessão (PARK et al., 2004; SFORCIN et al., 2012).

Até o ano de 1999, o interesse por esta planta se restringia ao seu uso popular como anti-inflamatório. Porém, a partir da descoberta de que esta planta é a principal fonte botânica para a produção da própolis verde, várias pesquisas têm sido realizadas com esta espécie, focando tanto na parte química quanto nas suas atividades biológicas (KUMAZAWA et al., 2003; SALATINO et al., 2005; SFORCIN et al., 2012; SOUSA et al., 2007a).

Vários trabalhos têm sido relatados na literatura sobre a composição química de extratos desta espécie, como por exemplo, a análise realizada por Kumazawa e colaboradores (2003), na qual o extrato etanólico de *B. dracunculifolia*, mostrou a presença de derivados do ácido cumárico, como a drupanina, ácido 3-prenil-4-(dihidrocinaoiloxi)-cinâmico (baccharina) e artepilina C (Figura 3). Da Silva Filho e colaboradores (2004), reportaram o isolamento e a identificação da isosacuranetina, aromadendrina-4'-metil éter (AME), óxido de baccharis, ácido ferúlico, ácido diidrocinâmico, ácido 3-prenil-4-(dihidrocinaoiloxi)-cinâmico (baccharina) e friedelanol (Figura 3).

Figura 3 – Estruturas químicas de substâncias encontradas em extratos de *Baccharis dracunculifolia*



Fonte: Adaptado de DA SILVA FILHO et al., 2004; KUMAZAWA et al., 2003.

Em relação a essa composição química, vários estudos demonstram que os ácidos fenólicos prenilados, principalmente a artepilina C, são as principais substâncias encontradas nos ápices foliares de *B. dracunculifolia* (DE OLIVEIRA et al., 2014; PAULA et al., 2016; RESENDE et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2005).

Quanto às atividades biológicas, o extrato metanólico da espécie já foi descrito como protetor de danos celulares em ilhotas pancreáticas em modelos de obesidade e diabetes, sendo esta atividade relacionada com a presença de flavonoides, substâncias fenólicas e derivados do ácido cumárico neste extrato (HOCAYEN et al., 2015). Além disso, *B. dracunculifolia* também apresenta importante atividade antibacteriana, sendo que a atividade frente a microrganismos cariogênicos tem ganhado destaque (LEITÃO et al., 2004). Estudo recente mostrou que o óleo essencial de *B. dracunculifolia* é capaz de reduzir a formação de biofilmes produzidos por *Streptococcus mutans* (PEREIRA et al., 2016). Outro estudo, realizado por Pedrazzi e colaboradores (2015), evidencia o desenvolvimento de enxaguatório bucal, contendo extrato hidroalcoólico e óleo essencial da espécie, demonstrando em ensaios clínicos que este produto foi também capaz de reduzir a taxa de formação de biofilme.

Vários estudos com *Baccharis dracunculifolia* estão relacionados ao fato de esta espécie ser a principal fonte vegetal da própolis verde, uma vez que as abelhas visitam seus ápices foliares coletando a resina para a posterior produção de própolis (Figura 4) (SFORCIN et al., 2012).

Figura 4 – Abelha *Apis mellifera* no momento da coleta de material resinoso de ápices foliares de *Baccharis dracunculifolia*



Fonte: Imagem cedida por Everton Allan Ferreira, 2017.

2.2 PRÓPOLIS VERDE

Própolis é uma palavra de origem grega, na qual “pro” significa “em defesa”, e “polis” significa “comunidade”. Assim, própolis é o nome genérico dado para a resina coletada das plantas e processada por abelhas (*Apis mellifera*), sendo usada para proteção de suas colmeias. A própolis é uma mistura complexa de substâncias, coletada principalmente dos brotos e exsudatos de árvores, podendo conter ainda secreções salivares das abelhas. De forma geral, as abelhas utilizam a própolis para proteção contra insetos e microrganismos, reparo de frestas ou danos à colmeia, preparo de locais para postura da abelha rainha e mumificação de insetos invasores (LUSTOSA et al., 2008; PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

A coloração da própolis depende de sua fonte vegetal, variando do marrom escuro, passando a uma tonalidade esverdeada, até o marrom avermelhado. Possui odor característico que pode variar de uma amostra para outra e é um material duro em 15 °C, tornando-se maleável a partir de 30 °C. Seu ponto de fusão varia entre 60 e 70 °C, sendo que em alguns casos pode atingir até 100 °C (MARCUCCI, 1996).

Na Europa, América do Norte e oeste da Ásia, a fonte botânica dominante da própolis é o exsudato do botão de álamo (*Populus* sp.). Entretanto, na América do Sul, espécies deste gênero não são nativas, existindo grande variedade vegetal como fonte botânica para a retirada das resinas (PARK et al., 2002). Assim, pinheiros (*Pinus* spp.), carvalhos (*Quercus* spp.), salgueiros (*Salix* spp.) e acácias (*Acacia* spp.) são algumas das outras fontes botânicas de própolis em várias partes do mundo. A própolis vermelha, por exemplo, é reportada como sendo típica de Cuba e Venezuela, onde as origens botânicas são espécies do gênero *Clusia* L. (TRUSHEVA et al., 2006).

No Brasil, devido à enorme biodiversidade, podem existir várias fontes vegetais para a própolis. Park e colaboradores (2000) identificaram e classificaram 12 tipos de própolis no Brasil, baseando-se em suas características químicas e procedência. Entre as principais fontes vegetais da própolis brasileira estão a *B. dracunculifolia* (alecrim do campo), *Dalbergia ecastophyllum* var. *cuprea* Pellegr. (rabo-de-bugio), *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (pinheiro brasileiro) e o *Eucalyptus citriodora* Hook. (eucalipto) (MELO; MATSUDA; ALMEIDA-MURADIAN, 2012).

A própolis produzida no cerrado brasileiro, rica em derivados prenilados do ácido *p*-cumárico, é conhecida internacionalmente como própolis verde ou *green propolis* (Figura 5) e tem como principal fonte vegetal a espécie *B. dracunculifolia*. Durante a coleta, as abelhas fragmentam os ápices vegetativos da espécie, como brotos, primórdios foliares e folhas jovens (Figura 4). A resina é então carregada para a colmeia repleta de fragmentos epidérmicos, levando então tecidos jovens contendo clorofila, o que dá a cor específica desse tipo de própolis. Além disso, as folhas jovens possuem tricomas glandulares, os quais contêm substâncias voláteis e aromáticas, conferindo o aroma típico desta própolis (SALATINO et al., 2005; SOUSA et al., 2007a).

Figura 5 – Própolis verde obtida comercialmente



Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

Esse tipo de própolis tem se tornado muito importante no mercado internacional, sobretudo no Japão, país que considera a própolis produzida pelo estado de Minas Gerais a melhor do mundo. Dados do Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior mostram que a comercialização da própolis verde no exterior com selo de MG movimentou, entre janeiro e maio de 2012, cerca de US\$1,5 milhão. A cotação média da própolis verde de MG no exterior é cerca de US\$120,00 o quilo, sendo um dos produtos mais valorizados do agronegócio estadual (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002; RIGHI, 2013). O Serviço Nacional de Apoio às Micro

e Pequenas Empresas no Brasil aponta grande demanda externa pelo produto brasileiro, sendo a Coreia do Sul, a China e o Japão os principais compradores, onde a própolis verde tem sido estudada e utilizada em alimentos e bebidas com a finalidade de manter ou melhorar a saúde humana (MELO; MATSUDA; ALMEIDA-MURADIAN, 2012).

Esta própolis é amplamente consumida no Japão como suplemento alimentar, sendo utilizada na profilaxia de doenças, principalmente devido às suas ótimas características organolépticas e atividades biológicas, além de possuir coloração característica, a qual é utilizada para rápida identificação no processo de comercialização pelos japoneses. Comercialmente, a própolis tem ocupado importante lugar não só no mercado internacional, mas também no mercado nacional de produtos apícolas. Sua inserção se deve, essencialmente, às inúmeras constatações das diferentes atividades biológicas atribuídas aos seus constituintes químicos (SOUSA et al., 2007a; TEIXEIRA et al., 2003).

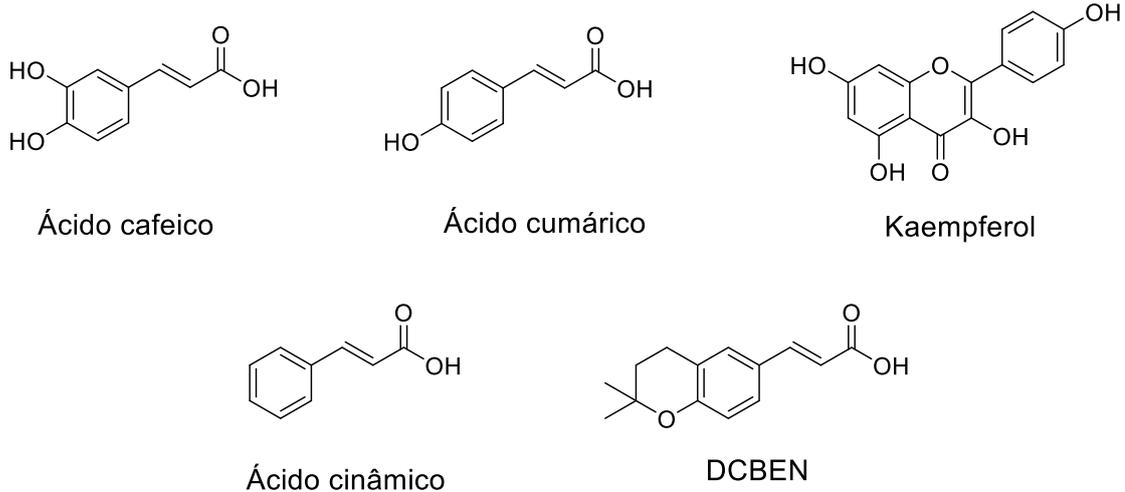
Em 2001, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) aprovou uma legislação específica onde constam padrões de identidade e qualidade da própolis produzida no país, visando os mercados interno e externo (BRASIL, 2001). Além disso, atualmente existe uma legislação da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), a RDC nº 24, de 14 de junho de 2011, que dispõe sobre o registro de medicamentos específicos, classificando a própolis como medicamento opoterápico (BRASIL, 2011).

Quanto à composição química, algumas substâncias estão presentes em vários tipos de própolis, enquanto outras ocorrem somente em própolis derivadas de espécies em particular. As amostras de própolis em geral incluem a presença de flavonoides (como a galangina, quercetina, pinocembrina e kaempferol), terpenoides, fenilpropanoides (como os ácidos cafeico e clorogênico), esteroides, aminoácidos, polissacarídeos, ácidos graxos e várias outras substâncias em pequenas quantidades (LUSTOSA et al., 2008).

Especificamente na própolis do tipo verde, os principais derivados prenilados do ácido-*p*-cumárico presentes em extratos de *B. dracunculifolia* (artepilina C, drupanina e baccharina – Figura 3), estão presentes. Além destas importantes substâncias, destacam-se ácido cafeico, ácido cumárico e kaempferol (Figura 6) neste tipo de própolis. Particularmente, a artepilina C é a substância majoritária desta própolis e, por isso, vem sendo estudada como seu marcador químico (JORGE et al.,

2008; TANI et al., 2010). Sousa e colaboradores (2007b) realizaram quantificação de dez substâncias fenólicas encontradas na própolis verde, sendo elas o ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, aromadendrina-4'-metil-éter (AME), isosacuranetina, drupanina, artepilina C, baccharina e ácido 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano (DCBEN) (Figuras 3 e 6).

Figura 6 – Estruturas químicas de substâncias encontradas em própolis verde



Fonte: Adaptado de SOUSA et al., 2007b; TANI et al., 2010.

As substâncias encontradas na própolis verde confirmam a *B. dracunculifolia* como sua principal fonte vegetal. O estudo realizado por Kumazawa e colaboradores (2003), mostrou a presença das mesmas substâncias encontradas em extrato etanólico da planta, no extrato de própolis verde, sendo estas drupanina, ácido 3-prenil-4-(dihidrocinamoiloxi)-cinâmico (baccharina), ácido-4,5-dicafeoilquínico, ácido-3,4-dicafeoilquínico e, principalmente a artepilina C.

Em relação às suas atividades biológicas, a própolis verde tem sido investigada como imunomoduladora, anti-inflamatória, antitumoral e hepatoprotetora (TAVARES et al., 2010). Em recente estudo *in vivo* com humanos, ressaltou-se a biodisponibilidade dos polifenóis presentes em própolis verde, agindo como antioxidante em pacientes com diabetes tipo 2 (ZHAO et al., 2016). Paulino e colaboradores (2014) relataram atividade hepatoprotetora de extrato de própolis verde em ratos com dano hepático induzido por administração de tetracloreto de carbono. Esta atividade foi relacionada com seu efeito antioxidante, também realizado no estudo, confirmando o uso popular da própolis para tratar danos hepáticos ou outras patologias com inflamação mediada por radicais livres.

Além disso, assim como a *B. dracunculifolia*, a própolis verde também vem sendo avaliada quanto à atividade em microrganismos cariogênicos, sendo que um estudo recente realizado no Japão, mostrou uma diminuição no crescimento de *S. mutans* após exposição a extrato etanólico de própolis verde (ODA et al., 2016).

Tendo em vista a importância da própolis verde para o estado de Minas Gerais e sua comercialização no mercado internacional, além das várias atividades biológicas relacionadas, é importante o estudo de seus principais constituintes químicos e de sua fonte vegetal. Neste sentido, destaca-se a artepilina C, que além de ser o marcador químico, é frequentemente correlacionada às atividades biológicas do produto. (FUNARI; FERRO, 2006).

2.3 ARTEPILINA C

A artepilina C (Figura 1) é um fenilpropanoide, sendo um derivado diprenilado do ácido *p*-cumárico, também chamado de ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico. A própolis verde é o único tipo de própolis que possui a artepilina C como principal constituinte, sendo este considerado o marcador químico e padrão para controle de qualidade desta própolis (CHEUNG et al., 2011; BARTH et al., 2013).

Além disso, esta substância tem sido muito estudada quanto às suas atividades biológicas. Em 1994, um estudo evidenciou a atividade antimicrobiana de substâncias obtidas da própolis coletada em São Paulo. Entre as três substâncias avaliadas, a artepilina C foi a que mostrou melhor atividade, sendo ativa contra os fungos cutâneos *Micosporum gypseum* e *Arthroderma benhamiae*, além de várias cepas bacterianas como *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium phlei*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (AGA et al., 1994). Este e outros estudos sugerem que a atividade antimicrobiana da própolis verde esteja relacionada principalmente com a presença da artepilina C. Neste sentido, em estudo recente, foi desenvolvido um extrato seco padronizado de própolis verde com altos teores de artepilina C, utilizando diferentes sistemas de encapsulamento, de forma a manter a atividade antibacteriana (MARQUIAFÁVEL et al., 2015).

Além da atividade antimicrobiana, a artepilina C demonstrou atividade imunossupressora em células T e efeito anti-inflamatório e analgésico em modelo animal. Em relação a este efeito anti-inflamatório, foi sugerida sua ação na inibição de prostaglandina E2 durante a indução da dor e inflamação (CHEUNG et al., 2011; PAULINO et al., 2008). Em relação à atividade imunossupressora, Chan, Cheung e

Sze (2013) ressaltam a capacidade da própolis verde e da artepilina C de matar células leucêmicas e induzir a imunossupressão em células T, além de potenciais propriedades antitumorais.

Esta atividade antitumoral da substância tem sido frequentemente descrita. Szliszka e colaboradores (2012) relataram essa atividade em estudo que mostrou a artepilina C como um agente imunológico e químico na prevenção do câncer de próstata. Outro estudo comparou a atividade da artepilina C e da baccharina, isoladas, em relação aos extratos da própolis verde e de *B. dracunculifolia* frente a uma linhagem de células tumorais. Neste caso, foram relatadas atividades antiproliferativas superiores para as substâncias isoladas em relação a mistura das duas substâncias, tendo sido destacada a atividade antiproliferativa da artepilina C (DE OLIVEIRA et al., 2014).

Outra atividade extensamente estudada para essa substância é a antioxidante. Estudo realizado por Shimizu e colaboradores (2004) investigou a capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo* e a prevenção de danos causados por espécies reativas de oxigênio (EROs) da artepilina C, sugerindo que esta atue como um antioxidante biodisponível. Em estudo posterior, foi sugerido que grupos prenila são importantes para a atividade antioxidante da artepilina C, uma vez que esta apresentou propriedade antioxidante superior em relação à drupanina e à baccharina (IZUTA et al., 2009). Esta atividade foi também relatada juntamente com atividade anti-inflamatória por Szliszka e colaboradores (2013).

O potencial antioxidante vem sendo relacionado com outras atividades, como foi feito, por exemplo, em estudo realizado por Monteiro Neto e colaboradores (2011), que mostrou a substância agindo na quimioprevenção de danos cromossômicos e genômicos e atribuiu esse efeito ao potencial antioxidante e estímulo da produção de enzimas de desintoxicação no fígado. Neste estudo, a artepilina C apresentou efeito protetor do DNA contra danos induzidos, mas não mostrou efeito genotóxico, o que também foi relatado em outro estudo mais recente, realizado por De Oliveira e colaboradores (2013), no qual a substância foi efetiva em reduzir a genotoxicidade induzida.

A atividade antioxidante também está relacionada à atividade antienvhecimento, uma vez que o processo de envelhecimento está intimamente ligado ao acúmulo de espécies reativas do oxigênio (EROs). Dessa forma, o presente trabalho propõe a avaliação do efeito antienvhecimento da artepilina C em

nematoides *C. elegans*, um modelo animal alternativo frequentemente utilizado nos últimos anos (SU; WINK, 2015).

Além disso, diante das inúmeras atividades descritas para a artepilina C, é necessária a avaliação de sua toxicidade, a fim de determinar concentrações de segurança em sua utilização. Os modelos animais alternativos *C. elegans* e Zebrafish são capazes de avaliar esse efeito tóxico, como ensaios preliminares no descobrimento de novas substâncias, sendo que em Zebrafish é possível avaliar a toxicidade da substância em fase inicial da vida, de desenvolvimento embrionário (HERNÁNDEZ et al., 2015; LI et al., 2013).

A RDC nº 24, de 14 de junho de 2011 (BRASIL, 2011) determina a necessidade de análises qualitativa e quantitativa de marcadores específicos em laudos de controle de qualidade de própolis. Uma vez que a artepilina C é o marcador químico da própolis verde, torna-se essencial sua avaliação no controle de qualidade desta própolis.

Dessa forma, vários estudos têm sido realizados para otimizar a determinação e quantificação da artepilina C em amostras de própolis verde, principalmente envolvendo Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Matsuda e Almeida-Muradian (2008) realizaram a validação de um método de quantificação da substância por CLAE e fizeram a quantificação em 33 amostras de própolis coletadas em diferentes regiões do Brasil. Sousa e colaboradores (2009) também realizaram a validação de um método analítico por CLAE, porém quantificando várias substâncias fenólicas de extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *B. dracunculifolia*, entre elas a artepilina C. Nobushi e colaboradores (2012) também validaram método de determinação e quantificação da substância em amostra de própolis verde. Em todos os estudos citados, foram utilizadas colunas analíticas de fase reversa (C₁₈) e detector de UV.

Diante das vantagens da técnica de CLUE acoplada a detector de espectrometria de massas (CLUE-EM) frente a CLAE acoplada a detector de UV (CLAE-UV), busca-se desenvolver e validar método de quantificação da substância utilizando uma nova técnica de análise.

2.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CLUE-EM)

Técnicas cromatográficas de análise são técnicas importantes na separação de substâncias presentes em matrizes complexas, como fluidos biológicos e produtos naturais. Na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) o solvente, também chamado de fase móvel ou eluente, é bombeado em direção à coluna, onde está a fase estacionária, sólida. Juntamente com o eluente, é introduzida a amostra, que tem suas substâncias separadas e direcionadas a um detector, que gera um sinal em função do tempo, denominado cromatograma (LANÇAS, 2009).

Desde o início da cromatografia líquida (CL), na década de 1950, muitos avanços foram alcançados em relação à eficiência de separação e todos eles se concentraram em um desenvolvimento contínuo das partículas de fase estacionária, na tentativa de melhoria da seletividade e eficiência das separações. Inicialmente, na década de 50, o tamanho das partículas girava em torno de 100 a 200 μm , sendo estas irregulares. A partir da década de 60, foram introduzidas partículas rígidas de 40 a 50 μm e na década 70, partículas porosas com cerca de 10 μm . Nos anos 80, foram introduzidas as partículas esféricas com cerca de 5 μm e, dez anos mais tarde, surgiram as partículas de cerca de 3 μm , com eficiência significativamente maior que as anteriores (MALDANER; JARDIM, 2009).

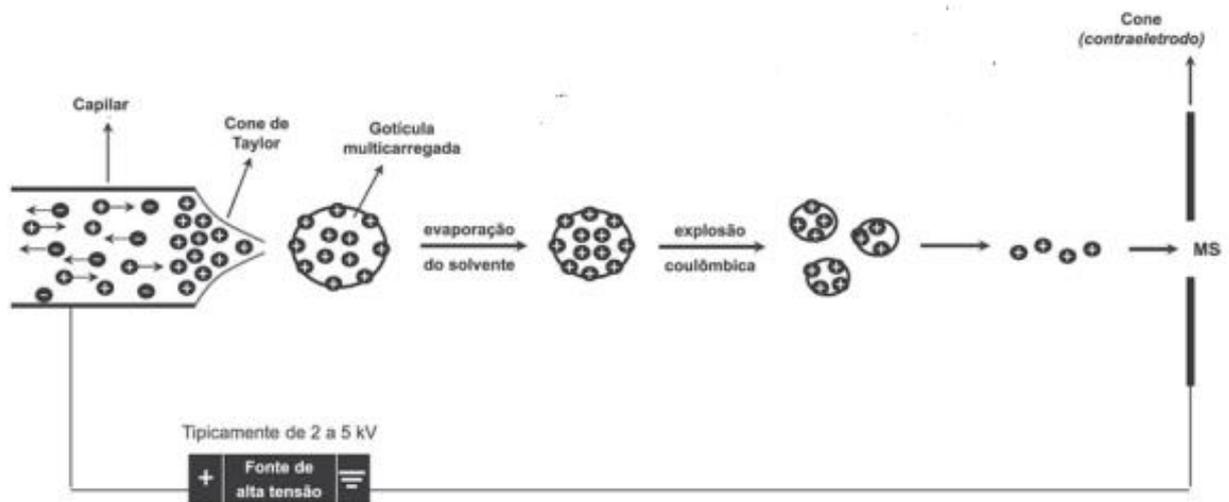
O avanço mais recente nas separações cromatográficas foi a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), que utiliza fases estacionárias com partículas menores que 2 μm , aumentando a resolução e diminuindo o tempo das análises. Para tornar isso possível, em 2004, a Waters Corporation desenvolveu o primeiro equipamento comercial capaz de operar em pressões de até 100 MPa (15000 psi), denominado *Acquity™ ultra performance liquid chromatography system* (UPLC™). Além de altas pressões, os equipamentos de CLUE necessitam trabalhar com volumes internos muito menores (conexões, amostragem, cela do detector e bombas), colunas muito resistentes (para suportarem o aumento de pressão) e injetores com alta precisão na faixa de volumes pequenos. Em contrapartida, além da alta resolução e pequeno tempo de análise, obtém-se grande economia na quantidade de fase móvel utilizada e no volume de amostra, levando à menor geração de resíduos (MALDANER; JARDIM, 2009; MALDANER; JARDIM, 2012; WU et al., 2012).

Acoplados aos cromatógrafos de fase líquida atuais, vários tipos de detectores podem ser utilizados. Os detectores de índice de refração (IR), ultravioleta (UV), espalhamento de luz e fluorescência são muito utilizados em análises quantitativas, porém tornam-se bastante limitados em termos de identificação das substâncias analisadas. O acoplamento de detectores de espectrometria de massas (EM) a cromatografia líquida certamente foi um grande avanço em relação à identificação e, principalmente, confirmação da identidade de substâncias em uma amostra analisada por cromatografia e, atualmente, o seu uso em análises quantitativas ganha a cada dia mais espaço (MORIN; MESS; GAROFOLO, 2013; VU et al., 2014; XIE et al., 2012).

Um espectrômetro de massas é basicamente composto por uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector. As fontes de ionização do tipo impacto eletrônico (EI) e ionização química (CI) são tipos de fontes que operam a pressões muito baixas (vácuo), sendo principalmente utilizadas quando o detector é acoplado a cromatografia em fase gasosa (CG). Já em cromatografia líquida, devido à diferença no estado físico da fase móvel utilizada, as fontes de ionização empregadas atuam a pressão atmosférica e não só realizam a ionização da amostra, como também facilitam o processo de transferência da amostra que sai da coluna para a fase gasosa, no espectrômetro de massas. As fontes de ionização mais utilizadas nesse caso são electrospray (ESI), ionização química a pressão atmosférica (APCI) e ionização por fótons a pressão atmosférica (APPI) (GOSETTI et al., 2010; LANÇAS, 2009; RODRIGUEZ-ALLER et al., 2013).

Ao acoplar um equipamento de CL a um detector de EM com fonte de ionização do tipo ESI, uma substância que foi separada das demais substâncias da amostra na cromatografia está solubilizada na fase móvel e passa através de um capilar, a pressão atmosférica, mantido a alta voltagem. Na saída deste capilar são formadas gotículas (spray) carregadas, que sofrem dessolvatação ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de eletrodos carregados. Essa dessolvatação é acompanhada por um fluxo contínuo de gás (em geral N_2) e o tamanho das gotículas vai reduzindo até que ocorra uma força de repulsão muito grande capaz de gerar a chamada “explosão coulômbica”, que produz a ionização. Os íons então fluem para o espectrômetro de massas, atraídos por força eletrostática e pelo vácuo, que está presente, neste caso, após a ionização (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). Esse tipo de ionização está ilustrado na Figura 7.

Figura 7 – Ionização por electrospray (ESI)



Fonte: Adaptado de CANTU et al., 2008.

A fonte de ionização pode operar tanto no modo negativo quanto no modo positivo, dependendo da tensão aplicada ao capilar. No modo negativo, as gotículas saem do capilar carregadas negativamente e são atraídas pelo eletrodo do cone, que tem carga positiva; o contrário acontece quando a fonte de ionização opera no modo positivo. Em ESI ocorre o tipo de ionização branda, ou suave, porque a energia utilizada não é suficiente para gerar uma fragmentação significativa nas moléculas da substância analisada. Dessa forma, são gerados íons pseudo-moleculares no modo negativo $[M-H]^-$ ou no modo positivo $[M+H]^+$ (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; LANÇAS et al., 2009).

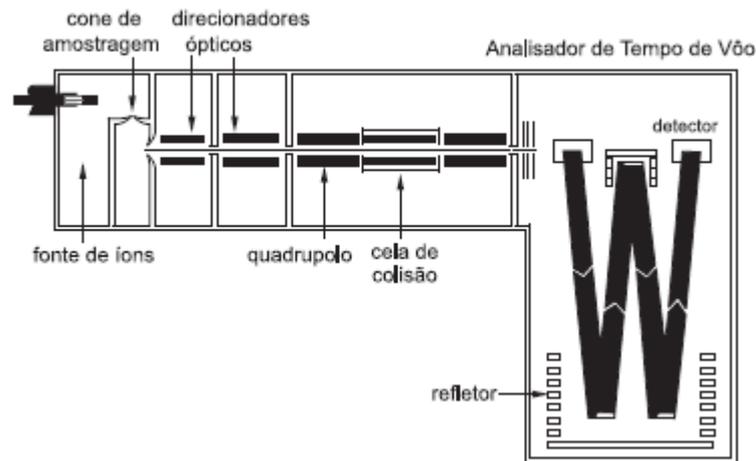
Após a fonte de ionização, os espectrômetros de massas possuem os chamados analisadores de massas, onde ocorre a separação dos íons em função de sua razão massa/carga (m/z). Existem vários tipos de analisadores, que vão se diferenciar em função de suas características de construção, operação, benefícios e limitações. O analisador de massas do tipo quadrupolo (Q) é um dos mais utilizados e é composto por 4 hastes metálicas, onde os pares opostos são conectados por campo elétrico, sendo também aplicada uma combinação de corrente contínua e radiofrequência. Os íons passam pelo quadrupolo a velocidade constante e somente os íons que apresentarem determinada m/z que esteja em ressonância com o campo aplicado irão atravessar o quadrupolo e serão detectados (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; LANÇAS et al., 2009; LEE, 2005; RODRIGUEZ-ALLER et al., 2013).

Outro tipo de analisador de massas existente é o “*time of flight*”, ou tempo de voo (TOF). Neste analisador, os íons são acelerados a altas velocidades em um longo tubo por um campo elétrico. Como os íons são gerados por uma mesma fonte de ionização, assume-se que as diferenças nas velocidades são decorrentes das diferenças de suas m/z e, dessa forma, é medido o “tempo de voo” de cada um dentro do espectrômetro de massas (LEE, 2005; RODRIGUEZ-ALLER et al., 2013). Além dos analisadores do tipo quadrupolo e TOF, o íon-trap está entre os mais utilizados, sendo um tipo de quadrupolo tridimensional.

Quando ocorre uma junção de dois ou mais analisadores de massas, pode-se dizer que está sendo realizada uma espectrometria de massas do tipo tandem ou EM-EM. Um tipo de analisador de massas muito comum neste caso é o triplo quadrupolo (QqQ), que consiste de um acoplamento de três quadrupolos em série onde o segundo quadrupolo, ao invés de separar m/z (como o primeiro e o terceiro), funciona como uma câmara de colisão, onde os íons selecionados no primeiro quadrupolo são fragmentados, geralmente por dissociação induzida por colisão (DIC) com um gás inerte de elevada energia (geralmente Ar, He ou N₂). Este processo pode dar informações estruturais da molécula analisada e melhorar a detecção de um método, sendo este o tipo de analisador mais utilizado para análises quantitativas atualmente (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; LEE, 2005; MORIN; MESS; GAROFOLO, 2013).

Outro tipo de espectrometria de massas do tipo EM-EM consiste na utilização do analisador de massas do tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF), que foi o tipo de analisador utilizado no presente trabalho. Neste caso, o último quadrupolo do triplo quadrupolo é substituído por um analisador do tipo TOF, ortogonalmente ao segundo quadrupolo. Este tipo de detector detecta todos os íons que entram no tubo em um determinado tempo específico, ao invés de fazer uma varredura sequencial de m/z , como aconteceria no triplo quadrupolo. Como consequência, apresentam elevada resolução nos espectros de massas obtidos, favorecendo a identificação de substâncias, mas em geral apresentam menor sensibilidade e robustez que os equipamentos com analisador do tipo triplo quadrupolo. Entretanto, atualmente, vários estudos têm mostrado que esse tipo de analisador tem se mostrado eficiente não só em análises qualitativas, mas também em análises quantitativas (MORIN, MESS, GAROFOLO, 2013; XIE et al., 2012). A Figura 8 ilustra esse tipo de analisador de massas.

Figura 8 – Analisador de massas do tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF)



Fonte: CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008.

Após a passagem pelo analisador de massas, os íons chegam finalmente ao detector, onde é registrada a carga induzida ou a corrente produzida quando um íon atravessa uma superfície. Sendo o equipamento capaz de fazer uma varredura de todas as m/z que chegam ao detector, é gerado um espectro de massas. Existe uma grande variedade de detectores para EM e os mais comuns são as chapas fotográficas, o detector de Faraday e o multiplicador de elétrons, sendo que este último é o mais utilizado na maioria dos espectrômetros de massas (LANÇAS, 2009). Ao final da detecção é obtido um cromatograma contendo todos os íons produzidos pelo espectrômetro de massas, denominado cromatograma de íons totais (TIC - “*total ion chromatogram*”). Além disso, pode-se obter um cromatograma contendo apenas os íons de interesse, a partir do monitoramento de íons selecionados (SIM - “*selected ion monitoring*”), ou monitoramento de reações selecionadas (SRM - “*selected reaction monitoring*”), quando ocorre a seleção de íons em dois estágios (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; RODRIGUEZ-ALLER et al., 2013).

Diante do fato da própolis verde ser uma amostra complexa, a CLUE-EM torna-se extremamente importante para sua análise, uma vez que a identificação das substâncias presentes na amostra torna-se muito mais fácil. Essa análise foi realizada por Gardana e colaboradores (2007) utilizando um equipamento de CLAE acoplado a dois tipos de detectores, sendo eles detector de arranjo de diodos (DAD) e detector de EM, com analisador de massas do tipo triplo quadrupolo. Estes pesquisadores fizeram análises de própolis provenientes de diferentes países, incluindo o Brasil, e

validaram a quantificação de várias substâncias fenólicas presentes nestas amostras. A artepilina C, apesar de ter sido identificada nas amostras de própolis provenientes do Brasil, não teve sua quantidade avaliada por essa metodologia. Outros pesquisadores também já avaliaram amostras de própolis utilizando espectrometria de massas, mas a artepilina C nunca foi quantificada em amostras de própolis verde por essa metodologia (CARVALHO et al., 2011; CORREA et al., 2016; ZHANG et al., 2017a). Como essa substância é o marcador químico da própolis verde e a técnica, como visto, está em crescimento, o presente trabalho propõe a validação de um método de quantificação da substância por esta técnica.

2.5 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Segundo a RE 899, de 29 de maio de 2003, resolução vigente para validação de métodos analíticos no Brasil, o objetivo de uma validação analítica é demonstrar que um método desenvolvido é apropriado para a finalidade pretendida. Dessa forma, a validação analítica deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atende às exigências das aplicações analíticas, com segurança nos resultados. Ainda segundo esta resolução, essas informações se aplicam a técnicas analíticas que façam uso de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o que significa que, uma vez que um método de quantificação por esta técnica é desenvolvido, este método deve ser validado, de forma a comprovar que é adequado para esta quantificação. A validação de um método é um processo contínuo, que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento. Um processo de validação bem definido mostra evidências de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso pretendido (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004; SHRIVASTAVA, GUPTA; 2011).

No Brasil, existem duas agências reguladoras capazes de verificar a competência de laboratórios de ensaios: a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). A legislação vigente (RE 899) para os laboratórios nacionais pertence a ANVISA e consiste de um “Guia de Validação para Métodos Analíticos e Bioanalíticos”. Esta resolução passou por recente avaliação da agência reguladora, sendo que há cerca de um ano foi lançada a Consulta Pública nº 129, de 12 de fevereiro de 2016, que sugeriu atualizações para esta norma; recentemente, foi

publicada a RDC n° 166, de 24 de julho de 2017, que dispõe sobre validação de métodos analíticos e dá outras providências, e entrará em vigor a partir de 2018. O INMETRO possui um documento de caráter orientativo intitulado “Orientação sobre validação de métodos analíticos” (DOQ-CGCRE-008) que pode auxiliar quanto a realização dos testes de validação.

Além destes documentos nacionais, alguns documentos podem fornecer ajuda no processo de validação analítica, sendo estes: “*Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry*” (Guia FDA 2015) e “*Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)*”, sendo este último realizado pela ICH (*International Conference on Harmonization*), na tentativa de agências reguladoras dos EUA, Japão e Europa de harmonizar parâmetros, requerimentos e metodologias de validação para métodos analíticos.

Uma metodologia analítica validada deve avaliar os seguintes parâmetros:

- Especificidade e seletividade: consiste na capacidade do método de avaliar uma substância mesmo na presença de outras, como degradantes, impurezas ou componentes da matriz. Além disso, o método deve garantir a identidade da substância (BRASIL, 2003; ICH – Q2 (R1), 2005);
- Linearidade: consiste na capacidade de um método analítico de mostrar resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada, dentro de um intervalo determinado. Devem ser avaliadas, no mínimo, 5 concentrações diferentes e os resultados devem ser avaliados estatisticamente (BRASIL, 2003; ICH – Q2 (R1), 2005);
- Intervalo: é a faixa de quantificação entre o limite inferior e superior, geralmente proveniente do teste de linearidade (BRASIL, 2003);
- Precisão: avalia a proximidade dos resultados de uma série de medidas e pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV %), podendo ser dividida em:
 - Precisão por repetibilidade: avalia a concordância de resultados em um mesmo local, com análises realizadas por um mesmo analista, em um mesmo equipamento e em um curto intervalo de tempo;
 - Precisão intermediária: avalia a concordância de resultados em um mesmo local, mas com análises realizadas por analistas diferentes e/ou em equipamentos diferentes, com pelo menos um dia de diferença;

- Reprodutibilidade: avalia a concordância de resultados obtidos em laboratórios diferentes (BRASIL, 2003);
- Limite de detecção (LD): é a menor quantidade da substância presente em uma amostra capaz de ser detectada pelo método desenvolvido, porém não necessariamente quantificada. Este limite pode ser estimado através da equação:

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{S}$$
 onde:
 σ = desvio padrão da resposta, podendo ser estimado pelo desvio padrão residual da linha de regressão ou pelo desvio padrão das intercessões com o eixo y de três curvas de calibração;
 S = inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003; ICH – Q2 (R1), 2005; SHRIVASTAVA, GUPTA; 2011);
- Limite de quantificação (LQ): é a menor quantidade da substância presente em uma amostra capaz de ser quantificada pelo método desenvolvido com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser estimado através da equação:

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{S}$$
 onde:
 σ = desvio padrão da resposta, podendo ser estimado pelo desvio padrão residual da linha de regressão ou pelo desvio padrão das intercessões com o eixo y de três curvas de calibração;
 S = inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003; ICH – Q2 (R1), 2005; SHRIVASTAVA, GUPTA; 2011);
- Exatidão: consiste na proximidade dos resultados obtidos pelo método analítico desenvolvido em relação ao valor verdadeiro. Pode ser realizada pelo método de adição de padrão, no qual são adicionadas quantidades conhecidas de padrão a amostra, em três concentrações diferentes. A exatidão é determinada pela relação entre a concentração determinada experimentalmente e a concentração teórica de padrão adicionada a amostra (BRASIL, 2003; ICH – Q2 (R1), 2005);
- Robustez: consiste na capacidade do método analítico de resistir a pequenas variações de parâmetros analíticos. No caso de cromatografia líquida, essas variações podem ser pH da fase móvel, fabricantes de coluna, temperatura de coluna ou fluxo de fase móvel. Ao notar-se susceptibilidade do método a

alguma dessas variações, estas deverão ser controladas e cuidados deverão ser ressaltados no procedimento (BRASIL, 2003; ICH – Q2 (R1), 2005).

2.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS EM MODELOS ANIMAIS

2.6.1 *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans (Figura 9) é um pequeno nematoide de vida livre encontrado em todo o mundo, que possui cerca de 0,25 mm de comprimento quando recém eclodido e 1 mm quando adulto. Possui um ciclo de vida rápido (4 dias a 25 °C; do ovo ao adulto de postura) e existe principalmente como hermafrodita, embora surjam machos em pequena frequência. Nos últimos 50 anos, *C. elegans* tornou-se um poderoso modelo de escolha para estudos genéticos eucarióticos. O animal tem um número invariante de células somáticas (959 células) e pesquisadores foram capazes de rastrear o destino de cada célula entre a fertilização e a idade adulta para gerar uma linhagem completa de células, além de cada um dos 302 neurônios do hermafrodita adulto. O nematoide foi o primeiro organismo multicelular com sequenciamento completo do genoma, em 1998 (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015; VARSHNEY et al., 2012).

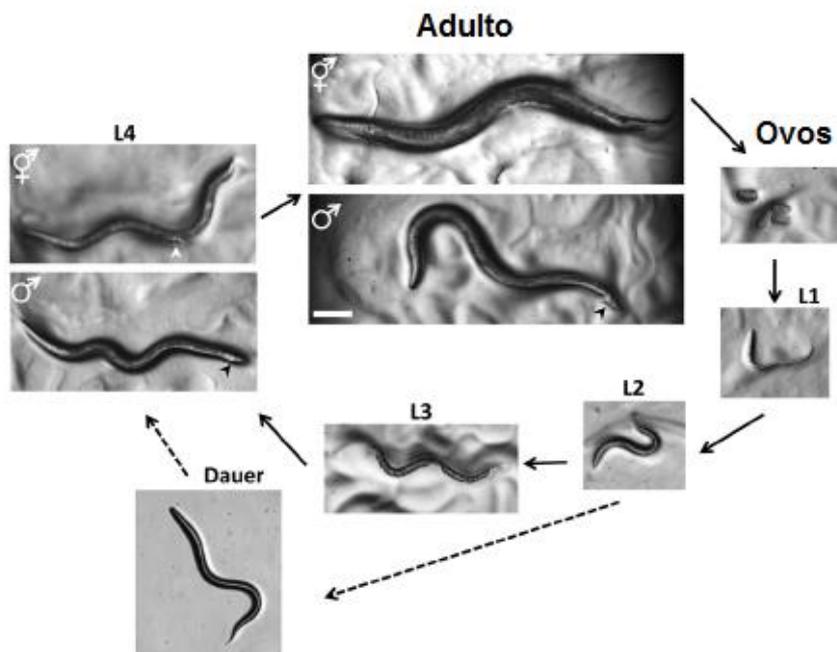
Em laboratório, os animais são normalmente cultivados em placas de ágar contendo a bactéria *E. coli*, a qual é utilizada como seu alimento e essencial para o desenvolvimento da fase larval. Várias características facilitam a manutenção do animal e sua utilização experimental. Primeiramente, é um hermafrodita auto-fertilizante, o que significa que um único animal pode preencher uma placa com vários. Em segundo lugar, as populações podem ser congeladas por anos e reativadas quando necessário. Além disso, o animal é muito pequeno, fazendo com que muitos possam ser cultivados em pequeno espaço, em temperatura que pode variar de 12 a 25 °C (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015).

A embriogênese do animal leva aproximadamente 16 horas a 20 °C. A casca dos ovos, praticamente impermeável, é feita após a fertilização, permitindo que o embrião se desenvolva independente da mãe. No entanto, os embriões são geralmente retidos dentro da hermafrodita até chegar a 24 células, momento de postura dos ovos. Após eclosão, o animal começa a se alimentar e se desenvolve através de quatro estágios larvais (L1-L4), sendo que a fase L1 dura cerca de 16 horas, enquanto as outras três duram aproximadamente 12 horas. Cada etapa termina

com um período de inatividade no qual uma nova cutícula (camada colagenosa exterior) é feita. Após o período reprodutivo, os animais hermafroditas podem viver algumas semanas antes de morrer, sendo que o seu tempo de vida é de aproximadamente 20 dias (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE 2015; FÉLIX; BRAENDLE, 2010). A Figura 9 mostra os 4 estágios larvais do animal, além do animal adulto e os ovos.

Apesar de apresentar estrutura física aparentemente simples, o *C. elegans* possui alta complexidade nos níveis celulares e fisiológicos. O interesse pelo modelo reside no fato de que muitos dos processos fisiológicos básicos e respostas ao estresse observados em organismos superiores (por exemplo, os seres humanos) são também detectáveis em *C. elegans*. É importante ressaltar que os nematoides têm diversos tipos de células semelhantes aos seres humanos, incluindo neurônios, células musculares, intestino e células excretoras, além de compartilhar diversos genes (60% a 80% de homologia) e mecanismos celulares com os seres humanos. Os vermes sofrem de doenças neurodegenerativas que afligem o homem, incluindo doenças infecciosas, distúrbios de controle fisiológico, além do processo de envelhecimento (KALETTA; HENGARTNER, 2006).

Figura 9 – Ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans*



Fonte: Adaptado de CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015.

Alguns estudos mostram o *C. elegans* como modelo animal utilizado para pesquisa de produtos naturais, ligando a atividade antioxidante de suas substâncias com suas atividades de aumento de vida útil do animal e relacionando isso a atividades antienvhecimento e proteção a doenças neurodegenerativas e relacionadas ao estresse oxidativo. Por exemplo, extrato padronizado de folhas de *Ginkgo biloba* L., que é utilizado popularmente para terapia de diversos distúrbios cerebrais, já teve sua atividade avaliada neste modelo, mostrando capacidade de aumentar o tempo de vida e reduzir o tamanho do corpo, sem afetar a reprodução do nematoide (KAMPKÖTTER et al., 2007). A quercetina também já foi avaliada frente a esse modelo, confirmando sua elevada capacidade antioxidante e melhorando a resistência dos organismos ao estresse oxidativo (KAMPKÖTTER et al., 2008). Extrato de camu-camu (*Myrciaria dubia*) mostrou extensão significativa no tempo de vida do animal em 20%, efeito relacionado a presença de substâncias bioativas nesse extrato, também capaz de reduzir significativamente a paralisia em modelo de doença de *Alzheimer* (AZEVEDO, 2015).

Sendo assim, tendo em vista a atividade antioxidante da artepilina C, buscou-se avaliar a atividade dessa substância frente ao modelo *C. elegans*, de forma a determinar sua ação frente a doenças relacionadas ao envelhecimento.

2.6.2 Zebrafish (*Danio rerio*)

O Zebrafish ou peixe-zebra (Figura 10), também conhecido como paulistinha, é um pequeno teleósteo da espécie *Danio rerio*, tropical de água doce, que mede cerca de 3 a 4 cm quando adulto e vive cerca de 3 anos. Assim como o *C. elegans*, este animal tem sido muito utilizado como modelo experimental em laboratório, por apresentar seu genoma sequenciado e importante homologia com os mamíferos (70 % em genes codificadores de proteínas e mais de 80 % em genes associados a doenças humanas), sendo relevante para estudos comportamentais, genéticos, toxicológicos e para avaliação de novos agentes terapêuticos. Este modelo começou a ser estudado na década de 1960, pelo biólogo George Streisinger, sendo introduzido como modelo animal na pesquisa científica na década de 1980, e desde então os estudos com o animal estão em constante crescimento (BUGEL; TANGUAY; PLANCHART, 2014; SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012).

Figura 10 – Zebrafish (*Danio rerio*)

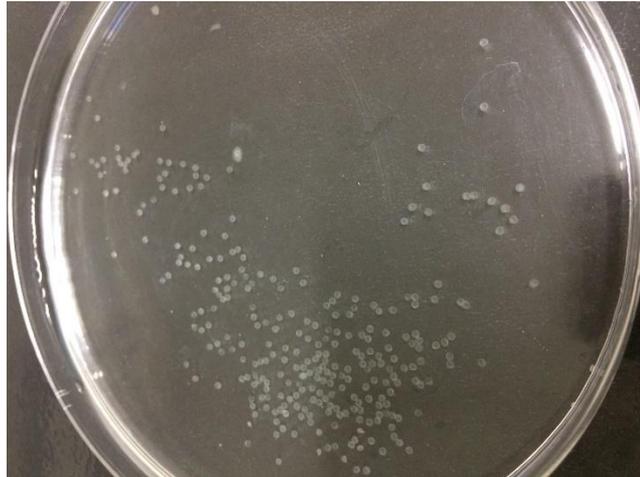


Fonte: SCHNEIDER et al., 2009.

O peixe apresenta algumas características facilitadoras para sua utilização em estudos em laboratório, como facilidade de reprodução, embriões transparentes, prole numerosa (200 a 300 ovos a cada 2 a 3 dias) e desenvolvimento rápido (em 48 a 72 horas passa de ovo a larva e se torna adulto aos 3 meses de vida). A utilização do animal em estudos de triagem possibilita uma redução no uso de animais de maior porte em abordagem inicial, como os roedores, e diminui significativamente a quantidade necessária de substância a ser testada, fator muito importante quando se tratam de substâncias isoladas de produtos naturais, já que em geral essas são obtidas em pequena quantidade (SCHNEIDER et al., 2009).

Apesar das semelhanças genéticas, o ser humano vive em um ambiente diferente do Zebrafish, exceto no período embrionário, quando os embriões humanos se desenvolvem no líquido amniótico, de onde recebem nutrientes e eletrólitos, podendo estar susceptíveis a agentes tóxicos. O Zebrafish gera muitos embriões em um único processo de reprodução e eles são pequenos (< 1 mm), translúcidos e facilmente manipulados (Figura 11). Dessa forma, o modelo tem sido muito utilizado como modelo universal para investigar a toxicidade durante estágios iniciais de desenvolvimento embrionário (BUGEL; TANGUAY; PLANCHART, 2014; ZOU et al., 2017).

Figura 11 – Embriões de Zebrafish em placa de petri



Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

O modelo Zebrafish já foi utilizado para investigar a toxicidade de produtos naturais em estágios iniciais de desenvolvimento embrionário. Herbarina A e B, geralmente isoladas de cepas do fungo *Cladosporium herbarum* foram sintetizadas por Heimberger e colaboradores (2015) e tiveram sua toxicidade avaliada em embriões de Zebrafish, sendo que a Herbarina B apresentou toxicidade neste modelo. Matrina e sofocarpina, dois alcaloides extraídos da raiz de *Sophora flavescens* Aiton utilizados amplamente na medicina tradicional chinesa, também tiveram sua toxicidade avaliada nestes embriões, sendo observados, para as duas substâncias, efeitos letais (falta de formação de somitos, falta de destacamento da cauda e falta de batimentos cardíacos) e teratogênicos (edema de pericárdio, lordose e retardo no crescimento) (LU et al., 2014).

Considerando a importância deste modelo, cabe ressaltar que não há trabalhos publicados descrevendo a avaliação da toxicidade da artepilina C frente a Zebrafish, tornando relevante esta avaliação, de forma a determinar sua toxicidade principalmente em estágios iniciais de desenvolvimento embrionário.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivos gerais isolar a artepilina C, desenvolver e validar método analítico de quantificação dessa substância por CLUE-EM-Q-TOF, bem como determinar sua atividade antienvhecimento em nematoides *Caenorhabditis elegans* e sua toxicidade em embriões de Zebrafish.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter um extrato rico em artepilina C a partir de amostra comercial de própolis verde;
- Isolar e purificar a artepilina C, através do fracionamento cromatográfico do extrato obtido, utilizando cromatografia líquida a vácuo (CLV) e CLAE semipreparativa;
- Desenvolver metodologia de quantificação da artepilina C por CLUE-EM-Q-TOF;
- Validar metodologia de quantificação da artepilina C em própolis verde por CLUE-EM-Q-TOF;
- Avaliar a toxicidade da artepilina C em nematoides *C. elegans*;
- Avaliar o impacto do tratamento com artepilina C na longevidade de *C. elegans*.
- Avaliar a toxicidade da artepilina C em embriões de Zebrafish, fazendo uma correlação com estágios iniciais do desenvolvimento embrionário humano.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

Os procedimentos deste trabalho foram realizados nos laboratórios: Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais (NIPPAN) da Universidade Federal de Juiz de Fora, CentralBio da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências da Vida e da Saúde (ICVS) da Universidade do Minho, Braga, Portugal e Biotério Central (ala de peixes) da Universidade Federal de Lavras. Foram utilizados os seguintes equipamentos:

- NIPPAN – Universidade Federal de Juiz de Fora:

- Balança analítica: marca Marte, modelo BL320H;
- Balança analítica: marca Marte, modelo AY220;
- Ultrassom: marca Sanders Medical, modelo Soniclean 2PS;
- Bomba a vácuo: marca Primatec, modelo 132;
- Rotaevaporador: marca Buchi, modelo RII;
- Bomba a vácuo: marca Buchi, modelo V-700;
- Banho ultratermostático: marca Cientec, modelo CT-281-28;
- Estufa com circulação e renovação de ar: marca Solab, modelo SL102;
- Lanterna de emissão de radiação ultravioleta: marca Boitton.

- CentralBio – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora:

- Ultrassom: marca Sanders Medical, modelo Soniclean 2;
- Microcentrífuga: marca Kasvi;
- Bomba a vácuo: marca Gast, modelo DOA-P704-AA;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência de bomba binária: marca Waters, modelo 1525; injetor automático: marca Waters, modelo 2707; Detector de arranjos de diodos (DAD): marca Waters, modelo 2998;
- Cromatógrafo líquido de ultra eficiência de bomba quaternária com injetor automático: marca Waters, modelo Acquity UPLC H-Class; Detector de espectrometria de massas com analisador de massas do tipo quadrupolo acoplado a “*time of flight*” marca Waters, modelo Xevo G2-S.

- ICVS – Universidade do Minho, Braga, Portugal:

- Centrífuga: marca Thermo Electron Corporation, modelo Heraeus Multifuge 3L-R;
- Incubadora de agitação: marca Shel Lab, modelo SSI10;
- Espectrofotômetro leitor de microplacas: marca Bio-Rad, modelo 680.

- Biotério Central (ala de peixes) – Universidade Federal de Lavras:

- Rack específica para manutenção de peixe-zebra: marca Rack Hidrus, modelo ZEB-40;
- Microscópio óptico de luz: marca Motic, modelo BA 310;
- Microscópio óptico de luz: marca Olympikus, modelo CX22LET.

Foram utilizados solventes de grau P.A., das marcas Vetec, Cromato Produtos Químicos LTDA, Quemis, Isofar e Alphatec. Para realização do processo de CLAE foram utilizados água ultrapura e metanol grau CLAE da marca J. T. Baker. Para a obtenção dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C foi utilizado clorofórmio deuterado da marca Cambridge Isotope Laboratories.

Para a realização de cromatografia em camada delgada (CCD), foram utilizadas cromatoplasmas de sílica gel 60 GF254 (Merck). A revelação das mesmas foi obtida através de irradiação no UV (254 e 366 nm), bem como de revelador químico, solução de vanilina sulfúrica, seguida de aquecimento.

Para a realização de cromatografia líquida a vácuo (CLV) foram utilizadas como adsorventes sílica PF₂₅₄: sílica 60H: sílica 70-230 mesh, na proporção de 1:1:4 (m/m), além de bomba a vácuo e coluna de vidro com 10 cm de diâmetro e 30 cm de altura, possuindo placa sinterizada.

Para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram utilizadas coluna analítica de fase reversa (Sun Fire C₁₈; 4,6 x 250 mm; 5 μm), na presença de pré-coluna (Sun Fire C₁₈; 4,6 x 20 mm; 5 μm) e coluna semipreparativa de fase reversa (SunFire C₁₈, 10 x 250 mm, 5 μm), na presença de pré-coluna (SunFire C₁₈ 10 x 20 mm, 5 μm).

Para cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) foi utilizada coluna analítica de fase reversa (Acquity BEH C₁₈; 2,1 x 100 mm; 1,7 μm), na presença de pré-coluna (Acquity BEH C₁₈; 2,1 x 5 mm; 1,7 μm).

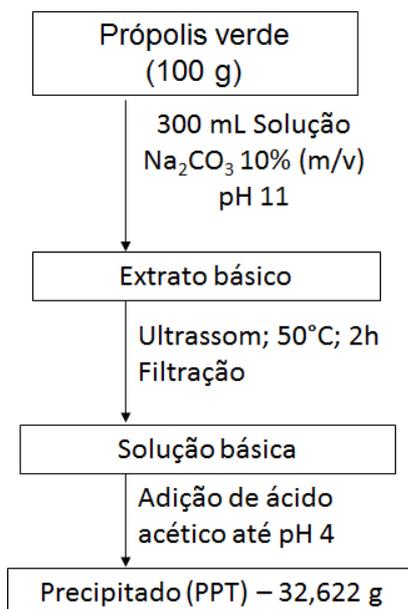
Foi utilizado padrão de artepilina C do fornecedor “Wako Pure Chemical”, obtido por doação da EMBRAPA Gado de Leite. Foi utilizada amostra de própolis verde do fornecedor “Bee Propolis Brasil LTDA”, Bambuí, Minas Gerais.

4.2 ISOLAMENTO DA ARTEPILINA C

4.2.1 Obtenção de extrato enriquecido em artepilina C

Uma alíquota de 100 g da amostra de própolis verde foi triturada e submetida à extração utilizando solução aquosa de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 10 % (m/v) pH 11. A amostra, contendo a solução aquosa básica, foi submetida a ultrassonicação, a 50 °C, por duas horas. Em seguida, a solução aquosa básica foi filtrada em papel de filtro e, posteriormente, acidificada com ácido acético até pH 4, sendo obtido um precipitado (PPT), conforme fluxograma mostrado na Figura 12.

Figura 12 – Fluxograma de obtenção do precipitado (PPT)



Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

Este precipitado foi analisado por CCD, em comparação com o padrão de artepilina C, utilizando diclorometano (CH_2Cl_2) e metanol (MeOH) na proporção 93:7 v/v como eluente e vanilina sulfúrica como revelador químico. Padrão e precipitado foram também analisados por CLAE utilizando-se coluna analítica de fase reversa C_{18} (4,6 x 250 mm, 5 μm), na presença de pré-coluna C_{18} (4,6 x 20 mm, 5 μm) em um

equipamento de CLAE com detector DAD. O gradiente de eluição consistiu de uma fase binária composta de água (acidificada com 0,1 % de ácido acético) e MeOH (acidificado com 0,1 % de ácido acético) em um gradiente linear de 20 a 100% de MeOH em 70 minutos e mantendo um sistema isocrático de 100 % de MeOH até 80 minutos. O fluxo utilizado foi 1 mL/min, o volume de injeção foi 30 μ L e a temperatura da coluna foi mantida a 40 °C. Esta metodologia de análise foi adaptada de Marquiefável e colaboradores (2015). A análise de dados foi feita a partir do *Software* Empower 3, no qual a partir da varredura (190 – 400 nm) foi selecionada a leitura de 315 nm.

Em relação ao preparo das amostras para serem injetadas em CLAE, o PPT (2 mg) foi solubilizado em MeOH na concentração de 2 mg/mL e colocado em ultrassom por aproximadamente 15 minutos. Em seguida foi centrifugado em microcentrífuga por 5 minutos a 10.000 rotações por minuto (rpm) e filtrado em unidade filtrante de poro 0,45 μ m. O padrão de artepilina C foi preparado da mesma forma, porém na concentração de 1 mg/mL.

4.2.2 Fracionamento cromatográfico do precipitado obtido

No intuito de se isolar a artepilina C, 30 g de PPT foram submetidos a cromatografia líquida a vácuo (CLV) empacotada com 600 g de sílica, de proporção descrita anteriormente (Figura 13). Foram utilizadas como eluentes misturas de clorofórmio (CHCl_3) e MeOH, em gradiente crescente de polaridade. Foram eluídos 2 L de cada fase móvel pela fase estacionária e as frações foram analisadas durante eluição por CCD, sendo obtidas 15 frações, nomeadas como Pv de I a XV (conforme Tabela 1). A concentração das frações foi feita por meio de rotaevaporação do solvente utilizando rotaevaporador, bomba a vácuo e banho ultratermostático. As frações Pv-III e Pv-IV foram reunidas após o término do fracionamento e nomeadas como Pv-A.

Figura 13 – Cromatografia líquida a vácuo (CLV) do precipitado (PPT)

Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

Tabela 1 – Frações obtidas por CLV do PPT de própolis verde

Fase Móvel (proporções v/v)	Frações	Massas (g)
CHCl ₃ : MeOH (99:1)	Pv-I	0,284
	Pv-II	0,296
	Pv-III	0,594
	Pv-IV	2,077
	Pv-V	0,517
CHCl ₃ : MeOH (98:2)	Pv-VI	0,389
	Pv-VII	0,100
	Pv-VIII	0,170
	Pv-IX	0,453
CHCl ₃ : MeOH (95:5)	Pv-X	0,084
	Pv-XI	1,500
	Pv-XII	0,235
CHCl ₃ : MeOH (90:10)	Pv-XIII	1,434
CHCl ₃ : MeOH (70:30)	Pv-XIV	0,893
CHCl ₃ : MeOH (50:50)	Pv-XV	1,272

4.2.3 Isolamento de artepilina C por CLAE semipreparativa

A fração Pv-A (junção das frações Pv-III e Pv-IV) foi analisada por CLAE, em comparação com o padrão de artepilina C já analisado anteriormente, utilizando a mesma forma de preparo de amostra utilizada para o PPT e as mesmas condições cromatográficas utilizadas anteriormente para PPT e padrão de artepilina C.

A partir do sistema em gradiente, foi selecionado um sistema isocrático de solvente para realizar o isolamento da artepilina C por CLAE semipreparativa. Foram

selecionados os sistemas eluentes de 80 % de MeOH (acidificado com 0,1 % de ácido acético) em água (acidificada com 0,1 % de ácido acético) e 75% de MeOH (acidificado com 0,1 % de ácido acético) em água (acidificada com 0,1 % de ácido acético), que foram testados em CLAE analítica, utilizando o mesmo fluxo, volume de injeção e temperatura da coluna utilizados anteriormente. Em seguida, selecionado o melhor sistema isocrático de separação, partiu-se para o isolamento em CLAE semipreparativa.

A amostra Pv-A (1,7 g) foi solubilizada em MeOH, centrifugada em microcentrífuga por 7 minutos a 15.000 rpm e filtrada em unidade filtrante de poro 0,45 μm . Foi então analisada em coluna semipreparativa de fase reversa C_{18} (10 x 250 mm, 5 μm), utilizando eluição isocrática MeOH (acidificado com 0,1 % de ácido acético) 80 % em água (acidificada com 0,1 % de ácido acético), fluxo de 5 mL/min e volume de injeção variando de 50 a 200 μL de acordo com a detecção do pico. Foram realizadas 110 injeções no total, sendo coletado o pico referente a artepilina C.

Após coleta do pico, foi feita rotaevaporação do solvente. Após evaporação do MeOH, houve turvação da amostra, a qual foi deixada em geladeira por 48h até precipitação/cristalização. O precipitado foi filtrado utilizando bomba a vácuo e armazenado em geladeira sob o abrigo de luz.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DA ARTEPILINA C

Após filtração foi obtido pó branco, que foi analisado por CLAE analítica em comparação com o padrão já analisado, conforme metodologia já descrita, e por RMN de H^1 e C^{13} , utilizando espectrômetro de RMN BRUKER AVANCE III 500 MHz, localizado no Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas (ICE) da UFJF e operado a 500 MHz para ^1H e a 125 MHz para ^{13}C . Foi utilizado clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente para os compostos e tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os dados obtidos foram tratados no programa Mestre Nova e comparados com dados obtidos na literatura.

4.4 DETERMINAÇÃO DA PUREZA DA SUBSTÂNCIA ISOLADA

Após realização de RMN, a substância isolada foi novamente submetida a CLAE, em análise quantitativa e comparativa com o padrão primário (Wako, pureza 98,0 %), a fim de ser determinada a sua pureza. Para essa análise, foi utilizada outra metodologia de análise, já validada para quantificação da substância por Nobushi e colaboradores (2012). A substância isolada e o padrão primário foram solubilizados em MeOH grau CLAE a 1 mg/mL e filtrados em unidade filtrante 0,45 µm. A eluição foi realizada por fase binária composta por água (acidificada com 0,5 % de ácido acético) e acetonitrila (ACN). Até 5 minutos, foi mantido um sistema isocrático com 30 % de ACN, de 5 a 30 minutos foi realizado um gradiente linear aumentando a concentração de ACN até 100 % e de 30 a 32 minutos foi realizado um gradiente linear voltando para a condição inicial de 30 % de ACN. Após cada injeção, a coluna foi reequilibrada com a condição inicial por 10 minutos. Foi utilizada coluna analítica de fase reversa C₁₈ (4,6 x 250 mm, 5 µm), na presença de pré-coluna C₁₈ (4,6 x 20 mm, 5 µm). Como a coluna utilizada por Nobushi e colaboradores (2012) era uma coluna analítica de comprimento inferior - fase reversa C₁₈ (4,6 x 150 mm, 5 µm), foi feito um ajuste de fluxo de fase móvel, que foi 1,7 mL/min ao invés de 1 mL/min como no artigo em referência. Foram realizadas 3 injeções de 30 µL para a substância isolada e 3 injeções de 30 µL para o padrão primário, sendo então comparadas as médias das áreas encontradas para o cálculo da pureza da substância isolada.

4.5 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO POR CLUE-EM-Q-TOF

Para caracterizar a substância isolada e determinar sua melhor energia de colisão a ser utilizada em análises em detector de espectrometria de massas, a substância foi analisada por infusão direta em detector EM com fonte de íons ESI e analisador tipo Q-TOF. A amostra foi solubilizada em MeOH grau CLAE, sendo utilizado modo negativo de aquisição, capilar de 3 kV, 40 V de voltagem no cone, temperatura da fonte de 80 °C, temperatura de dessolvatação 300 °C e fluxo do gás Nitrogênio de 20 L/h. O gás utilizado para colisão das moléculas é o Argônio e foram utilizadas as energias de 0, 15, 25 e 30 eV. Os resultados foram analisados pelo *Software* MassLynx, sendo determinada a melhor energia de colisão a ser utilizada,

comparadas a massas de fragmentação com referências da literatura e realizada uma proposta de fragmentação para essa substância.

Em seguida, foi preparada uma amostra de própolis verde para ser analisada por CLUE-EM-Q-TOF para desenvolvimento de método analítico. A amostra foi analisada nas condições sequenciais descritas na Tabela 2, de forma a chegar a uma condição final ideal para o método de quantificação a ser validado.

Tabela 2 - Condições testadas no desenvolvimento de metodologia de quantificação da artepilina C por CLUE-EM-Q-TOF

Condição	Modo de aquisição	Condição CLUE	Condição fonte de ionização (ESI)	Energia de colisão
Condição 1	- Negativo - EM ^e	- 0-14 min: gradiente linear 5 a 98 % de MeOH em água* - 14-16 min: 98 % MeOH em água* - 16-20 min: 5 % MeOH em água* - Fluxo: 0,4 mL/min - Temperatura: 45°C	- Capilar: 3 kV - Cone: 40V - Temperatura da fonte: 120°C - Temperatura de dessolvatação: 450°C - Fluxo gás: 50 L/h	- Função 1 (energia branda): 3 eV - Função 2: rampa 5 a 25 eV
Condição 2	- Negativo - EM/EM - Alvo: <i>m/z</i> 299	- 0-14 min: gradiente linear 5 a 98 % de MeOH em água* - 14-16 min: 98 % MeOH em água* - 16-20 min: 5 % MeOH em água* - Fluxo: 0,4 mL/min - Temperatura: 45°C	- Capilar: 3 kV - Cone: 40 V - Temperatura da fonte: 120°C - Temperatura de dessolvatação: 450°C - Fluxo gás: 50 L/h	25 eV
Condição 3	- Negativo - EM/EM - Alvo: <i>m/z</i> 299	- 0-8 min: 40 a 100 % de MeOH em água* - 8-10 min: 100% MeOH* - 10-14 min: 40 % de MeOH em água* - Fluxo: 0,4 mL/min - Temperatura: 45°C	- Capilar: 3 kV - Cone: 40 V - Temperatura da fonte: 120°C - Temperatura de dessolvatação: 450°C - Fluxo gás: 50 L/h	25 eV
Condição 4	- Negativo - EM/EM - Alvo: <i>m/z</i> 299	- 0-8 min: 40 a 100 % de MeOH em água* - 8-10 min: 100% MeOH* - 10-14 min: 40 % de MeOH em água* - Fluxo: 0,4 mL/min - Temperatura: 45°C	- Capilar: 3 kV - Cone: 40 V - Temperatura da fonte: 150°C - Temperatura de dessolvatação: 500°C - Fluxo gás: 50 L/h	25 eV

*MeOH e água acidificados com 0,01 % de ácido fórmico

O método de quantificação da artepilina C por CLUE-EM-Q-TOF foi então validado seguindo as seguintes condições: foi utilizada coluna analítica de fase reversa Acquity BEH C₁₈ (2,1 x 100 mm, 1,7 µm), sendo utilizado gradiente de eluição com fase binária composta de água (acidificada com 0,01 % de ácido fórmico) e metanol (MeOH) (acidificado com 0,01 % de ácido fórmico). Foi realizado um gradiente linear aumentando a concentração de MeOH de 40 % (inicial) até 100 % em 8 minutos; de 8 a 10 minutos, a condição de 100 % de MeOH foi mantida, sendo adicionados 4 minutos (10-14 minutos) em que a coluna foi reequilibrada com a condição inicial (40 % de MeOH em água). O fluxo utilizado foi 0,4 mL/min, o volume de injeção foi 1 µL e a temperatura da coluna foi mantida a 45 °C.

A fonte de ionização utilizada foi ESI, modo negativo de aquisição, capilar de 3 kV, 40 V de voltagem no cone, temperatura da fonte de 150 °C, temperatura de dessolvatação 500 °C e fluxo do gás de 50 L/h. O gás utilizado para colisão das moléculas é o Argônio e foi utilizada a energia de colisão 25 eV, determinada anteriormente. A *m/z* 299 foi selecionada como alvo e o fragmento *m/z* 200,12 foi utilizado para a quantificação (299 → 200,12). A análise de dados foi feita a partir do *Software* MassLynx®, sendo analisados os cromatogramas e os espectros de massas dos picos obtidos.

4.6 VALIDAÇÃO ANALÍTICA DE METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO POR CLUE-EM-Q-TOF

O método definido anteriormente foi validado seguindo as normas e especificações da RE 899 (ANVISA, 2003) e do Q2(R1) (ICH, 2005), sendo que a amostra e o padrão foram preparados da seguinte maneira:

- Amostra: Foram pesados 1.000 mg de própolis verde, transferidos para balão volumétrico de 100 mL e solubilizados em cerca de 50 mL de MeOH grau P.A.. Em seguida, o balão volumétrico foi levado a ultrassom por 1 h e o volume de MeOH foi completado, sendo a amostra filtrada em papel de filtro (solução estoque da amostra, concentração final de própolis verde igual a 10 mg/mL). A solução estoque foi diluída em MeOH grau CLAE (amostra 4: MeOH 6) e filtrada em unidade filtrante 0,22 µm, sendo a concentração final da amostra de própolis verde igual a 4 mg/mL;

- Padrão: Foi preparada uma solução estoque de artepilina C (isolada anteriormente) a 2.000 µg/mL, solubilizada em MeOH grau CLAE, que foi utilizada para o preparo de soluções de diferentes concentrações, a serem utilizadas nos testes de validação.

O modo de preparo de amostra e padrão foi adaptado do descrito por Matsuda e Almeida-Muradian (2008). Foram então realizados os seguintes testes de validação:

- Especificidade: Foram injetados os diluentes do padrão, das amostras e a fase móvel, de forma a confirmar, em comparação com as análises das amostras e do padrão, que o método proposto é capaz de avaliar apenas a artepilina C, nas condições propostas;
- Linearidade: Foi realizada uma curva de calibração a partir de solução estoque de artepilina C (2.000 µg/mL), a concentrações de 50, 100, 200, 300 e 400 µg/mL (sendo realizadas as correções de acordo com a pureza encontrada para a substância isolada), em triplicata. Essa curva de calibração foi tratada estatisticamente sendo definida a equação da reta, o coeficiente de correlação (r), coeficiente de determinação (r^2), análise dos resíduos e avaliação da igualdade de variâncias.
- Intervalo: Foi determinado através da linearidade, entre os limites inferior e superior de concentrações de artepilina C.
- Precisão: Para análise da precisão por repetibilidade, foram preparadas 6 amostras conforme descrito anteriormente e a análise da precisão foi realizada pelo desvio padrão relativo (DPR) dos resultados. A precisão intermediária foi realizada da mesma forma que a precisão por repetibilidade, porém em dias diferentes e por analista diferente, sendo os resultados comparados com os resultados da precisão por repetibilidade e avaliados também a partir do DPR. Para quantificação das amostras, foram definidas três concentrações de padrão para calibração, sendo estas as concentrações de 100, 200 e 300 µg/mL, preparadas a partir de solução estoque de artepilina C a 2.000 µg/mL.
- Limites de detecção e quantificação: Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados a partir da curva de calibração, conforme equações mostradas anteriormente.
- Exatidão: Para análise da exatidão, foi preparada solução estoque de amostra (10 mg/mL), conforme descrito anteriormente e esta foi diluída em MeOH grau

CLAE (amostra 1: MeOH 9), obtendo uma concentração final de 1 mg/mL e injetada em duplicata. Além disso, foram preparadas, 9 amostras para exatidão, sendo três de concentração mínima, três de concentração média e três de concentração máxima. Essas amostras foram constituídas de amostras de própolis verde (na concentração de 1 mg/mL) com adição de padrão de artepilina C, nas concentrações de 100, 200 e 300 µg/mL, respectivamente nas amostras mínima, média e máxima. Essas foram as concentrações de padrão a recuperar em presença de amostra. O cálculo da exatidão foi realizado a partir da concentração de padrão calculada para cada amostra (concentração obtida – concentração de amostra) em relação a concentração teórica. Para quantificação das amostras, novamente foram utilizadas três concentrações de padrão para calibração, sendo estas as concentrações de 100, 200 e 300 µg/mL, preparadas a partir de solução estoque de artepilina C a 2.000 µg/mL.

- **Robustez:** Para determinar se o método desenvolvido apresentaria capacidade de resistir a pequenas variações, foi preparada uma condição inicial de robustez, com análise do padrão nas três concentrações de calibração (100, 200 e 300 µg/mL), como anteriormente, e análise da amostra de própolis verde na concentração de 4 mg/mL (como nas precisões). A partir dessa análise, foram feitas alterações na temperatura da coluna (para 40°C e 50°C) e no fluxo de fase móvel (para 0,3 mL/min e 0,5 mL/min), sendo que para cada uma das alterações, foram analisados padrão (nas concentrações de calibração) e amostra. O cálculo da robustez foi feito a partir da variação na quantificação de artepilina C na amostra em todas as análises com variações em comparação com a quantificação da substância na amostra da análise na condição inicial.

4.7 ENSAIOS BIOLÓGICOS EM MODELOS ANIMAIS

4.7.1 *Caenorhabditis elegans*

Estes ensaios foram realizados no Instituto de Ciências da Vida e da Saúde na Universidade do Minho, Braga, Portugal, sob a orientação do Dr. Carlos Bessa e coordenação do Prof. Dr. Alberto Carlos Pires Dias. A metodologia utilizada para os ensaios foi adaptada por pesquisadores da Universidade do Minho a partir das metodologias descritas por Garcia e colaboradores (2007) e Voisini e colaboradores (2007).

4.7.1.1 *Ensaio de toxicidade*

Para realização do ensaio de toxicidade foi necessário o preparo de algumas soluções, como descrito a seguir:

- M9: composta por hidrogenofosfato dissódico hepta-hidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), Cloreto de Sódio (NaCl), Sulfato de Magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e água;
- Solução “bleaching”: composta por solução de hipoclorito de sódio (NaClO), solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) 1M e água;
- Citrato de Potássio 1M pH 6: composta por ácido cítrico monohidratado, Hidróxido de Potássio (KOH) e água;
- Solução de Traços de Metal: composta por Sulfato de Ferro hepta-hidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), EDTA dissódico (Na_2EDTA), Cloreto de Manganês tetra-hidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), Sulfato de Cobre penta-hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), Sulfato de Zinco hepta-hidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$);
- Meio S-basal: composta por Cloreto de Sódio (NaCl), Fosfato de Potássio dibásico (K_2HPO_4), Fosfato de Potássio monobásico (KH_2PO_4), colesterol (5mg/mL diluído em etanol) e água;
- Meio S-basal completo: composta por solução de Sulfato de Magnésio (MgSO_4) 1M, solução de Cloreto de Cálcio (CaCl_2) 1M, solução de Traços de Metal, solução de Citrato de Potássio pH 6 e solução de meio S-basal.

Os animais *C. elegans* foram mantidos em placas de petri com meio de cultura NGM, com cepas OP50 de *E. coli* como seu alimento.

Alguns dias antes do ensaio, a cepa OP50 de *E. coli* foi colocada para crescer em meio de cultura LB. Cerca de 16 horas depois, a bactéria foi sedimentada utilizando-se centrífuga a 3.500 rpm e 4 °C por 30 minutos. Após descartado o sobrenadante, a bactéria foi inativada com ciclos de 3 vezes de congelamento e descongelamento, utilizando nitrogênio líquido e banho de água regulado para 60°C. A bactéria inativada (pellets) foi armazenada em freezer a – 80°C.

No dia do ensaio, três placas de petri contendo *C. elegans* adultos foram lavadas com 10 mL de solução M9. Os vermes foram transferidos para um tubo e centrifugados utilizando centrífuga a 3.500 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi

descartado e o sedimento ressuspensão e incubado em solução “bleaching” durante 6 minutos, de modo a romper os animais e libertar os ovos. Foi então realizada nova centrifugação como anteriormente. Os ovos recolhidos foram lavados 3 vezes em solução M9 e o sedimento final foi ressuspensão com meio S-basal completo e diluído até obter uma concentração de aproximadamente 20 ovos por 15 μL de solução.

Foi então preparada uma solução de meio S-basal completo com antibióticos e colesterol, acrescentando Nistatina, Penicilina, Estreptomicina e solução de colesterol a 5mg/mL (em etanol) na solução de meio S-basal completo. Com essa solução, foram ressuspensos os pellets bacterianos congelados e foi feita leitura da absorbância com 20 μL da solução bacteriana e 40 μL de meio S-basal completo utilizando meio S-basal completo como branco. Ajustou-se a solução bacteriana, diluindo-a em meio S-basal completo, até obter absorbância de 0,7.

Foi preparada solução estoque de artepilina C (com a substância isolada de própolis verde) em dimetilsulfóxido (DMSO) 100 % a 25 mM, que em seguida foi diluída, de forma a obter as concentrações de 600, 300, 120, 60 e 24 μM em DMSO 2,4 %.

Foi então preparado o ensaio em placa de 96 poços, acrescentando em cada poço de amostra 15 μL da solução com os ovos, 20 μL da solução bacteriana de OP50 preparada anteriormente e 25 μL da solução de amostra em cada concentração a ser testada, sendo cada concentração testada em triplicata. Os poços de branco foram preparados com a mesma quantidade de amostra, além de 15 μL de meio S-basal completo e 20 μL de meio S-basal completo com antibióticos e colesterol. Sendo assim, as concentrações de amostras testadas foram 250, 125, 50, 25 e 10 μM em DMSO 1 %. Os poços de controle foram preparados com 15 μL da solução com os ovos, 20 μL da solução bacteriana de OP50 preparada anteriormente e 25 μL de solução DMSO, sendo a concentração deste 2,4 % em quatro poços e 12 % em quatro poços, chegando a uma concentração final de DMSO 1% e 5%, respectivamente.

A placa de 96 poços foi lida em espectrofotômetro leitor de microplacas a 595 nm e com 20 segundos de agitação. Em seguida, a placa foi armazenada em incubadora de agitação a 100 rpm e temperatura controlada de 20°C e foram feitas leituras diárias pelos próximos oito dias. Todo o ensaio foi conduzido em condições estéreis.

4.7.1.2 Ensaio de Longevidade

Para o ensaio de longevidade, foram preparadas placas de petri com meio de cultura NGM. Pellets de bactéria *E. coli* OP50 inativada foram preparados da mesma forma como descrito no ensaio de toxicidade. Para a longevidade, foi adicionada à bactéria a artemisina C. Para isto, pellets de bactéria foram ressuspensos em solução de meio S-basal e a esse meio foram acrescentados os antibióticos nistatina, penicilina e estreptomicina. A essa solução bacteriana, foi acrescentada quantidade de solução estoque de artemisina C (25 mM) de forma a chegar a concentração final de 125 µM de artemisina C e 0,5 % de DMSO. Ao controle, foi acrescentado DMSO 100 %, de forma a chegar a concentração final de 0,5 % de DMSO. Essa solução bacteriana foi adicionada às placas com meio de cultura NGM e estas ficaram secando por dois dias.

Foram colocados em três placas contendo bactéria OP50 com artemisina C e em três placas controle (OP50 sem droga) cinco animais *C. elegans* adultos, em idade de postura de ovos. Após uma hora, esses animais foram retirados das placas e deixados apenas os ovos. Dois dias depois, foram transferidos vinte animais de cada placa para uma nova placa. Em seguida, os animais foram contados diariamente para avaliar a mortalidade, e transferidos a cada três dias para novas placas, de forma a evitar uma possível degradação da substância e evitar a falta de alimento dos animais.

4.7.2 Zebrafish (*Danio rerio*)

Este ensaio foi realizado no Biotério Central (Ala de peixes) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Minas Gerais, sob a orientação da Dra. Gilmara Junqueira Machado Pereira e coordenação do Prof. Dr. Luis David Solis Murgas. A metodologia utilizada para o ensaio seguiu as especificações da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) protocolo 236, que trata de um guia para o teste de toxicidade aguda em peixes (FET – *Fish embryo acute toxicity*) (2013).

Todos os ensaios envolvendo o uso de peixes foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal incluídos nas normas da Comissão de Ética no Uso de Animais.

Peixes adultos de Zebrafish foram adquiridos de um produtor, localizado na Fazenda São Domingos, no município de Muriaé - MG e mantidos em caixa d'água em densidade de estocagem de dois animais por litro, por trinta dias, durante período

de aclimatação. Após esse período, os animais foram separados em famílias, na proporção de uma fêmea para dois machos e acondicionados em raques específicas para a espécie, em aquários de policarbonato, sendo a qualidade da água e temperatura de 28,5 °C controlados automaticamente pela raque. Os peixes eram alimentados 3 vezes ao dia com ração comercial e microcrustáceo *Artemia salina* e mantidos em ciclo de luz 14:10 (claro/escuro).

Para reprodução, os peixes de cada família foram separados de acordo com o sexo no dia anterior a reprodução, mas mantidos em contato em aquários de 60 L. No dia da reprodução, machos e fêmeas foram reunidos, meia hora antes do início do período claro. Cerca de duas horas depois, os embriões foram coletados por meio de um sifão e mantidos em água destilada, sendo separados em embriões bons ou ruins. As avaliações foram realizadas com auxílio de microscópio óptico de luz, com o aumento de 4x, sendo considerados bons os embriões sem alterações visíveis, com tamanho, cor e textura uniformes.

Para o ensaio de toxicidade, foi preparada uma solução estoque inicial de concentração 10 mM de artepilina C, solubilizada em 4 % de DMSO e água destilada. A partir desta, foram preparadas soluções de artepilina C a 250, 125, 50 e 10 µM, todas com concentração final de DMSO de 0,1 %. Como controle foram utilizadas solução de DMSO 0,1 % e água destilada. O ensaio foi realizado com os embriões bons, em placas de 96 poços, sendo alocado 1 embrião por poço com 200 µL da solução a ser testada. Foram utilizados 19 embriões para cada tratamento e as placas de 96 poços foram mantidas em temperatura controlada de 28,5 °C durante todo o desenvolvimento embrionário.

As avaliações do desenvolvimento embrionário frente ao tratamento com artepilina C foram realizadas nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas pós-fertilização (hpf), sendo avaliadas as seguintes características: formação de somitos, desenvolvimento de olhos, movimentos espontâneos, presença de circulação na aorta dorsal, edema de pericárdio, descolamento de cauda e lordose. O número de indivíduos mortos e o estágio de desenvolvimento foram verificados todos os dias, sendo removidos e contabilizados todos os embriões que não apresentaram batimento cardíaco, circulação sanguínea ou se encontraram em processo de degeneração.

Para o tratamento estatístico dos dados, as variáveis foram submetidas a uma análise de variância (ANOVA para Modelos Lineares Generalizados), aplicando-se o

teste de Tukey ($p < 0,05$) para as concentrações de artepilina C e tempo de exposição. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico Minitab.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

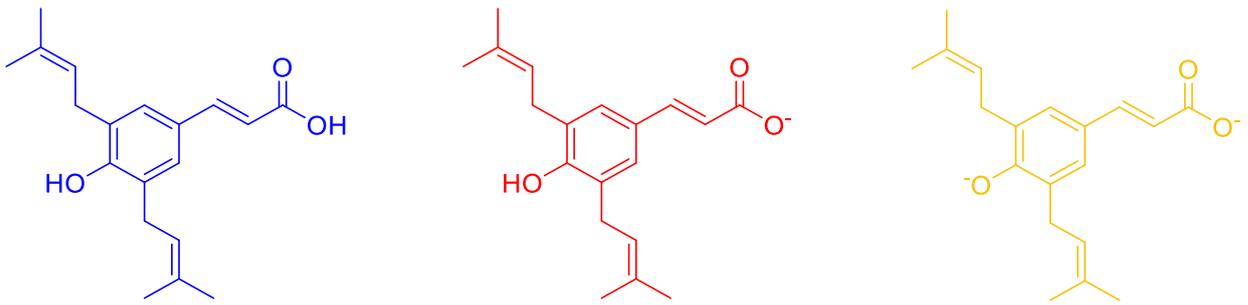
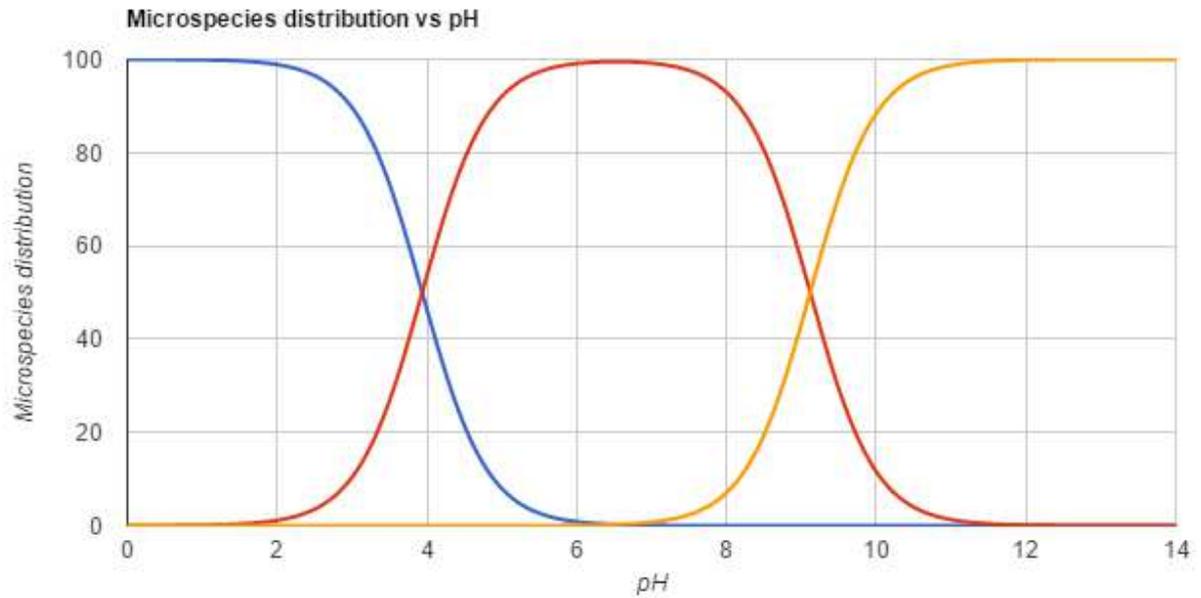
5.1 ISOLAMENTO DA ARTEPILINA C A PARTIR DA PRÓPOLIS VERDE

5.1.1 Obtenção de extrato enriquecido em artepilina C

A Figura 14 mostra o diagrama de distribuição da artepilina C de acordo com o pH do meio em que ela se encontra. Sendo assim, foi realizada uma extração em meio básico, de forma que a substância estaria em sua forma ionizada, permanecendo solúvel em meio aquoso, que é o meio de extração (Na_2CO_3 10 % m/v pH 11).

Em seguida, após extração e filtração, a solução básica foi acidificada com ácido acético até pH 4, obtendo um precipitado (PPT). Considerando o equilíbrio mostrado na Figura 14, em pH 4, pelo menos 50 % da substância, anteriormente ionizada e solúvel em meio aquoso, voltaria para sua forma não ionizada, deixando de ser solúvel e justificando a precipitação. Este precipitado foi analisado por CCD e CLAE em comparação com o padrão para confirmar a presença da artepilina C e estes resultados estão mostrados nas Figuras 15, 16 e 17. Foi possível confirmar a extração da artepilina C pelo método proposto, uma vez que, em CCD foi possível observar mancha de coloração azul de mesmo R_f que o padrão de artepilina C no precipitado. Além disso, em CLAE, foi possível observar pico com tempo de retenção similar ao do padrão (59,1 minutos para o padrão e 58,9 minutos para o PPT) e mesmo espectro de UV.

Figura 14 – Diagrama de distribuição da artepilina C em função do pH



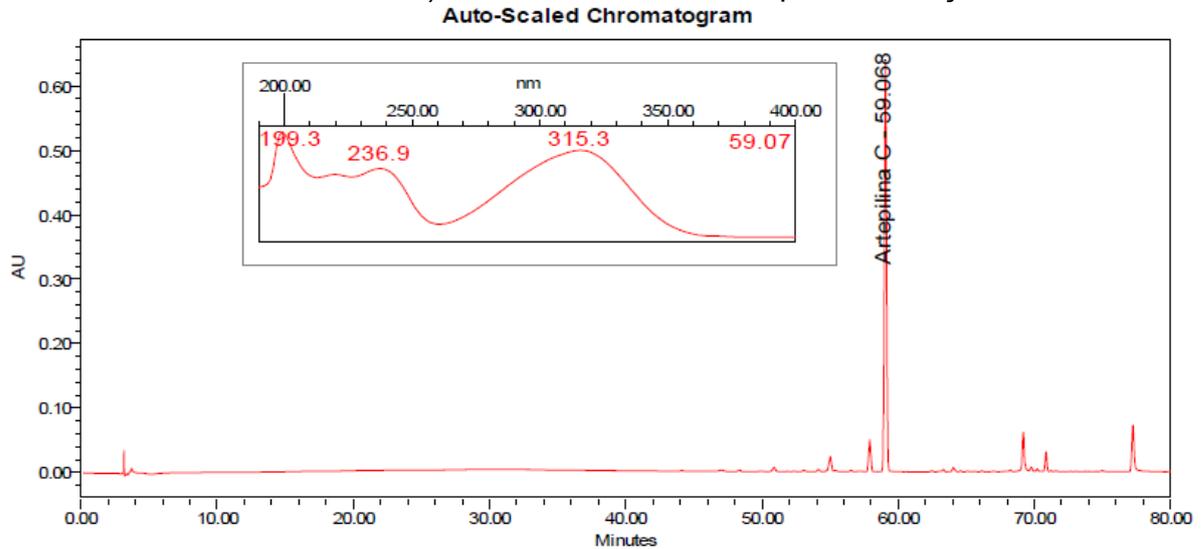
Fonte: Adaptado de chemicalize, 2017.

Figura 15 – CCD do padrão de artepilina C (Wako Pure Chemical) e precipitado obtido (PPT).



Eluente: CH₂Cl₂ (93:7 v/v). Revelador: Vanilina sulfúrica
 Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

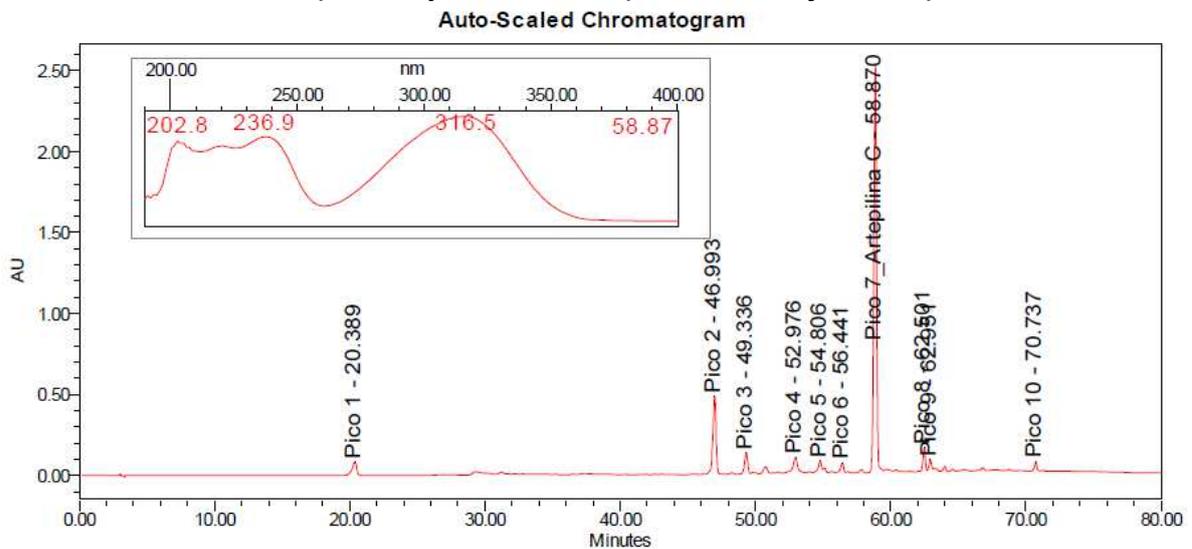
Figura 16 – Perfil cromatográfico e espectro de UV do padrão de artepilina C (Wako Pure Chemical) em CLAE-DAD e o tempo de retenção



Eluente: Gradiente linear 20 a 100% de MeOH em 70 minutos e 10 minutos de sistema isocrático MeOH 100%; Detecção: 315 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

Figura 17 – Perfil cromatográfico do precipitado (PPT) em CLAE-DAD, espectro de UV do pico majoritário e tempos de retenção dos picos



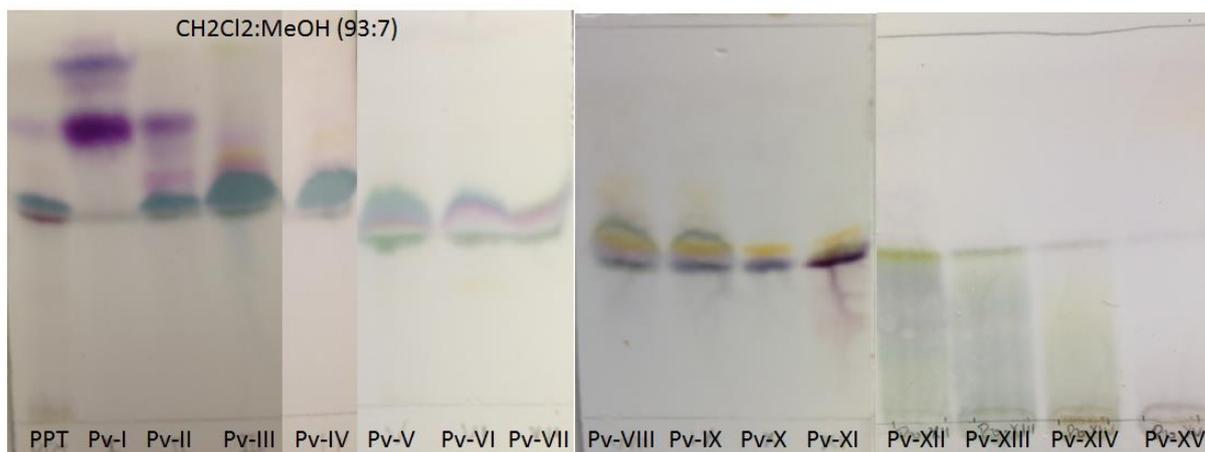
Eluente: Gradiente linear 20 a 100% de MeOH em 70 minutos e 10 minutos de sistema isocrático MeOH 100%; Detecção: 315 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

5.1.2 Fracionamento cromatográfico do precipitado obtido

Durante o fracionamento por CLV, foram realizadas CCDs para acompanhar a separação, de forma a determinar quais frações seriam ricas em artepilina C. A Figura 18 mostra as CCDs realizadas com as frações Pv-I a Pv-XV.

Figura 18 – CCDs das frações obtidas por CLV do precipitado (PPT)



Eluente: CH₂Cl₂:MeOH (93:7 v/v). Revelador: Vanilina sulfúrica.

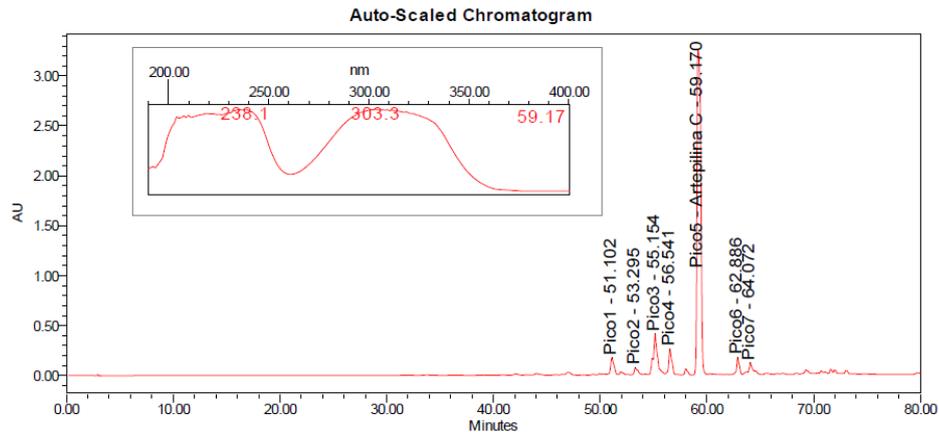
Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

Foi possível observar pelas CCDs realizadas, que a substância artepilina C estava presente nas frações Pv-II, Pv-III, Pv-IV e Pv-V, porém as frações Pv-III e Pv-IV apresentaram-se menos contaminadas de outras substâncias e por isso, foram reunidas e nomeadas como Pv-A, sendo esta fração utilizada para purificação em CLAE semipreparativa.

5.1.3 Isolamento de artepilina C por CLAE semipreparativa

A fração Pv-A foi injetada em CLAE conforme metodologia já descrita anteriormente, de forma a confirmar a presença da artepilina C e determinar em qual concentração de MeOH essa substância seria eluída. O cromatograma obtido está demonstrado na Figura 19 e mostra um pico da substância majoritária da fração (com detecção em 315 nm) com aproximadamente mesmo tempo de retenção (59,2 minutos) e apresentando o mesmo espectro de UV do padrão de artepilina C (Figura 16).

Figura 19 – Perfil cromatográfico da eluição em gradiente da fração Pv-A em CLAE-DAD, espectro de UV do pico majoritário e tempo de retenção dos picos

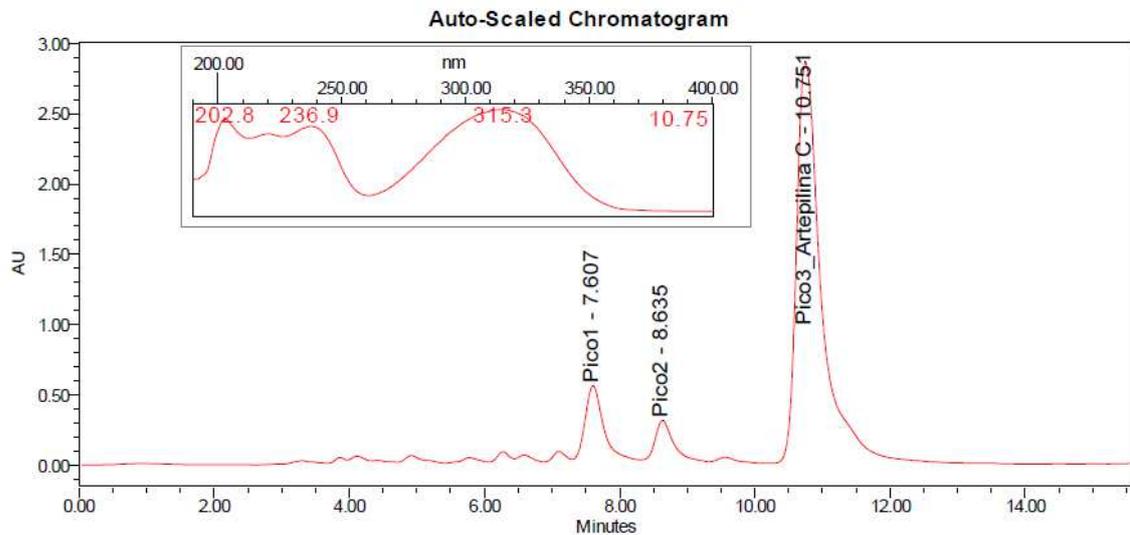


Eluente: Gradiente linear 20 a 100% de MeOH em 70 minutos e 10 minutos de sistema isocrático MeOH 100%; Detecção: 315 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

Sendo assim, foi calculada qual a concentração de MeOH na fase móvel no tempo de retenção de 59 minutos, que é o tempo de retenção aproximado da arteplina C. Para isso, foi utilizada a equação da reta do gradiente linear de fase móvel utilizado nesta eluição, que neste caso é $y = 1,14x + 20$, sendo x o tempo e y a concentração de MeOH em água. Desta forma, a concentração de MeOH na qual o pico da arteplina C é eluído, é 87,3 % e optou-se por realizar análises de Pv-A com sistemas isocráticos de 80 % e 75 % de MeOH em água (acidificada com 0,1 % de ácido acético). Os cromatogramas destas análises estão mostrados nas Figuras 20 e 21. Nos dois testes, o padrão de separação ficou parecido, porém no sistema isocrático de 80 % de MeOH em água (acidificada com 0,1 % de ácido acético), a arteplina C eluiu com 10,7 minutos enquanto no sistema isocrático de 75% de MeOH em água (acidificada com 0,1 % de ácido acético), esse tempo foi de 18,1 minutos. Desta forma, para otimizar o isolamento, optou-se por utilizar o sistema isocrático de 80 % de MeOH em água em escala semipreparativa.

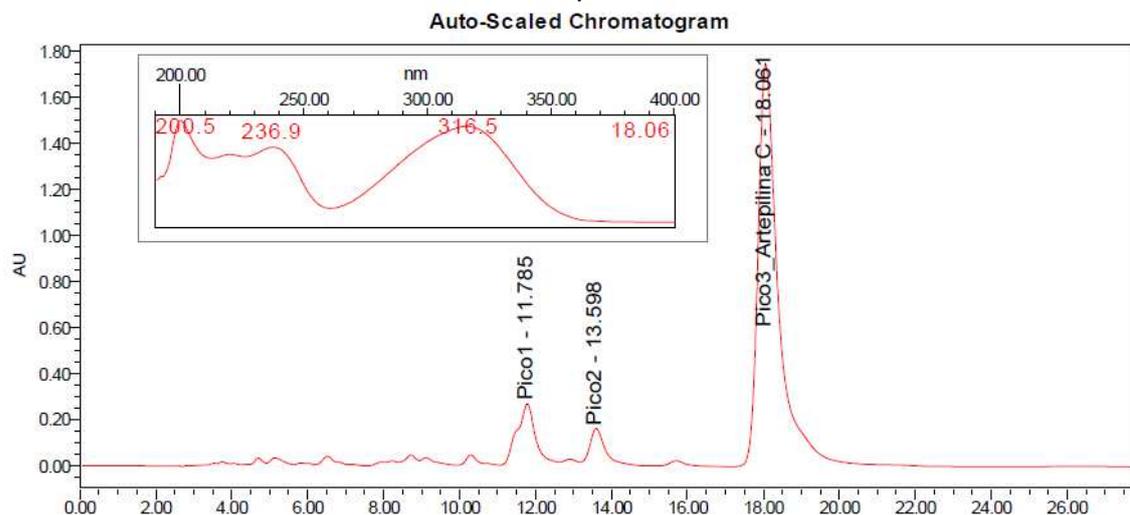
Figura 20 - Perfil cromatográfico da eluição isocrática (MeOH 80%) da fração Pv-A em CLAE-DAD, espectro de UV do pico majoritário e tempo de retenção dos picos



Eluente: Sistema isocrático 80 % de MeOH em água (acidificada com 0,1 % de ácido acético);
 Detecção: 315nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

Figura 21 - Perfil cromatográfico da eluição isocrática (MeOH 75%) da fração Pv-A em CLAE-DAD, espectro de UV do pico majoritário e tempo de retenção dos picos



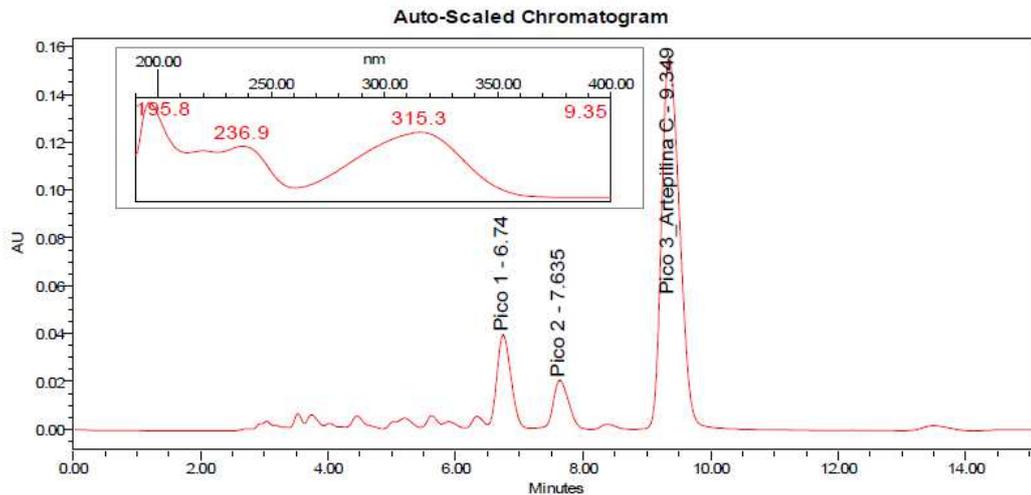
Eluente: Sistema isocrático 75 % de MeOH em água (acidificada com 0,1 % de ácido acético);
 Detecção: 315nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

Em escala semipreparativa, foi realizada uma injeção inicial de 10 μ L da fração Pv-A (Figura 22), para determinar o perfil de separação na coluna semipreparativa. Em seguida foram realizadas 110 injeções, variando o volume de

injeção de acordo com a detecção. Foi coletado o pico 3 da fração Pv-A e o volume coletado foi tratado conforme descrito anteriormente até obter cerca de 100 mg de pó cristalino, que foi então analisado para confirmar a identificação da substância.

Figura 22 – Perfil cromatográfico em escala semipreparativa da fração Pv-A em CLAE-DAD, espectro de UV do pico majoritário e tempo de retenção dos picos



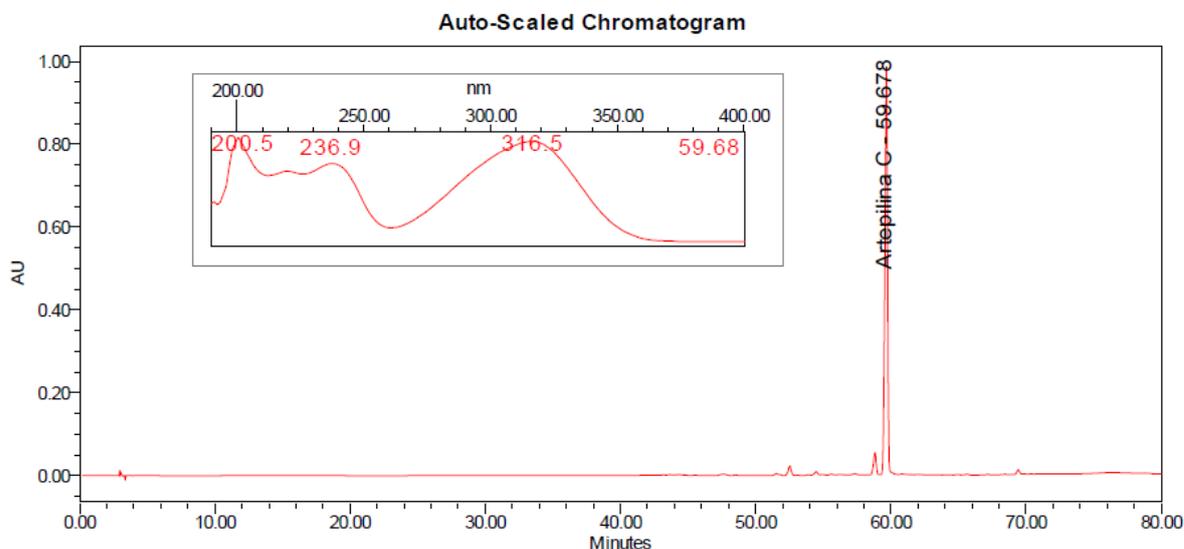
Eluente: Sistema isocrático 80 % de MeOH em água (acidificada com 0,1 % de ácido acético);
 Detecção: 315nm; Volume de injeção: 10 µL.
 Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DA ARTEPILINA C

Inicialmente, a substância isolada foi eluída em CLAE, nas mesmas condições de eluição do padrão, de forma a realizar comparação entre os dois cromatogramas. O cromatograma obtido está mostrado na Figura 23.

A partir do cromatograma obtido, foi possível observar que o tempo de retenção e o espectro de UV obtidos foram similares aos do padrão, mostrando uma alta probabilidade da substância isolada ser de fato a artepilina C.

Figura 23 - Perfil cromatográfico e espectro de UV da substância isolada obtida em CLAE-DAD



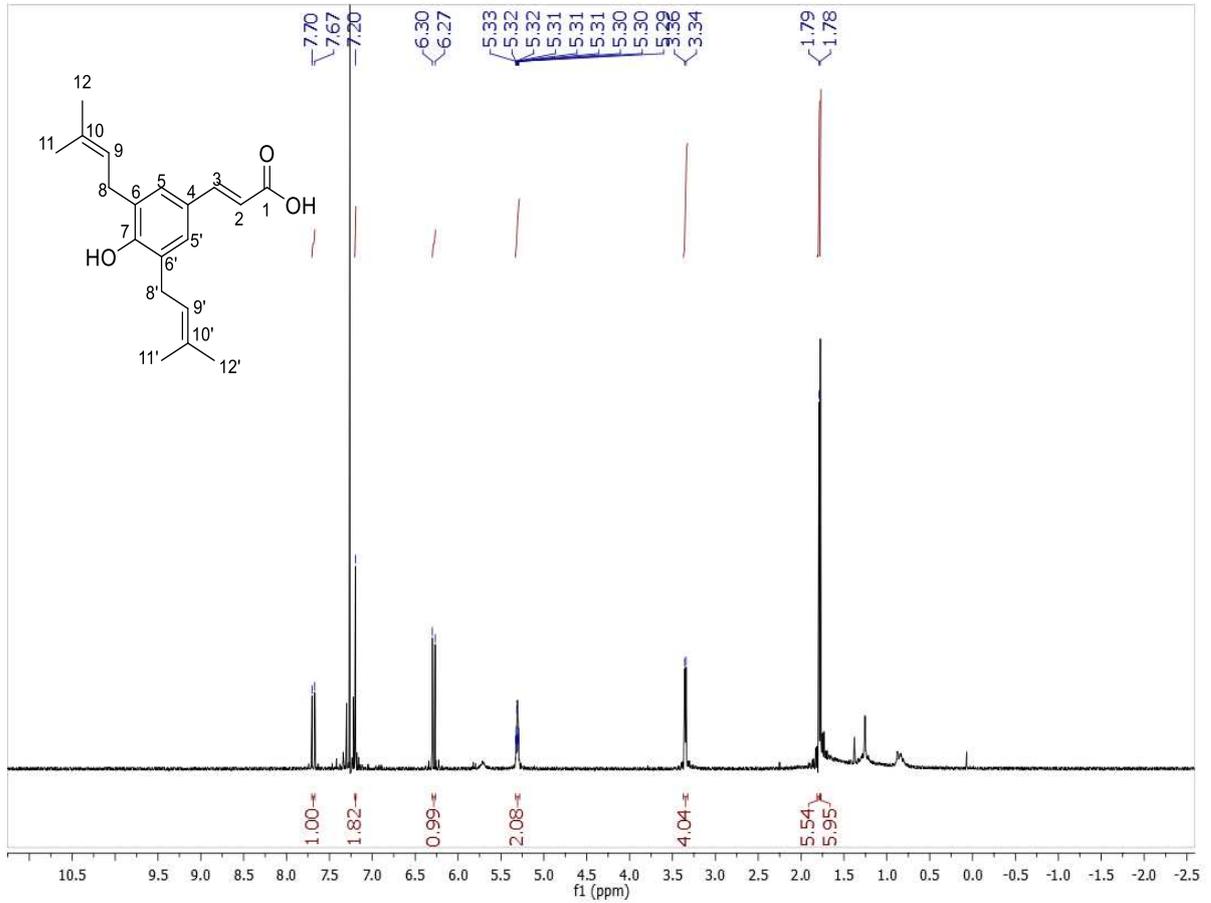
Eluente: Gradiente linear 20 a 100% de MeOH em 70 minutos e 10 minutos de sistema isocrático MeOH 100%; Detecção: 315 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

Assim, essa substância foi submetida a técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H e ^{13}C . Os espectros obtidos, bem como suas expansões, estão mostrados nas Figuras 24 a 27.

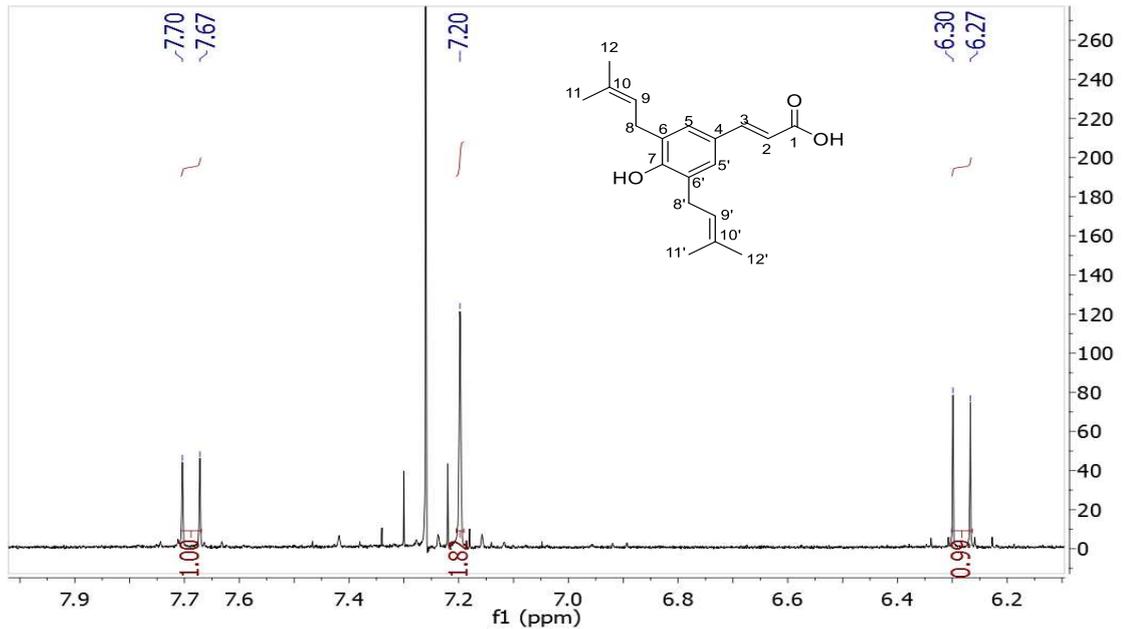
Analisando-se o espectro de RMN de ^1H (Figura 24), bem como de suas expansões (Figuras 25 e 26), foi possível observar o aparecimento de dois dupletos, centrados em δ 7,69 (1H, $J = 15,9$ Hz) e δ 6,28 (1H, $J = 15,9$ Hz), atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-3 e H-2, respectivamente. Observou-se também um simpleto em δ 7,20 (2H) referente aos hidrogênios aromáticos H-5 e H-5' e um duplete em δ 3,35 (4H, $J = 7,2$ Hz), referente aos hidrogênios metilênicos H-8 e H-8'. Além disso, foi observado um multiplete entre δ 5,33 – 5,29 (2H), correspondente aos hidrogênios olefínicos H-9 e H-9' e dois simpletos em δ 1,79 (6H) e δ 1,78 (6H), referentes aos hidrogênios metílicos H-11, H-11', H-12 e H-12'.

Figura 24 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da substância isolada



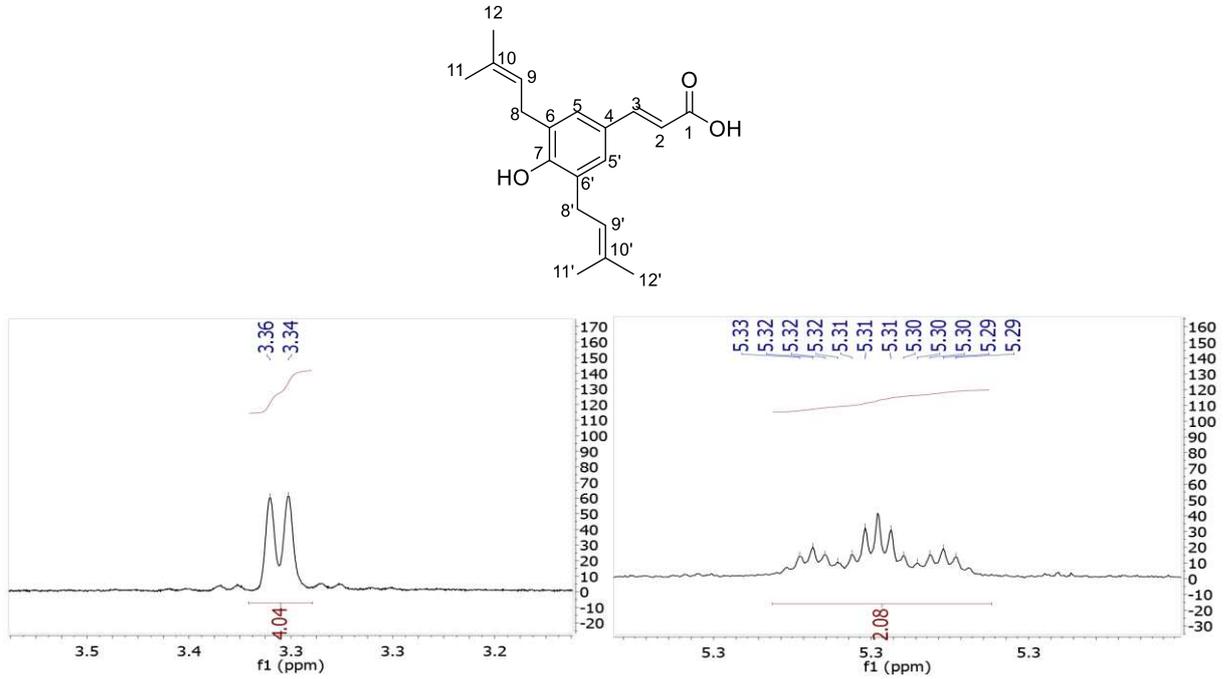
Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

Figura 25 – Expansão da região dos hidrogênios olefínicos H-2 e H-3 e aromáticos H-5 e H-5' do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da substância isolada



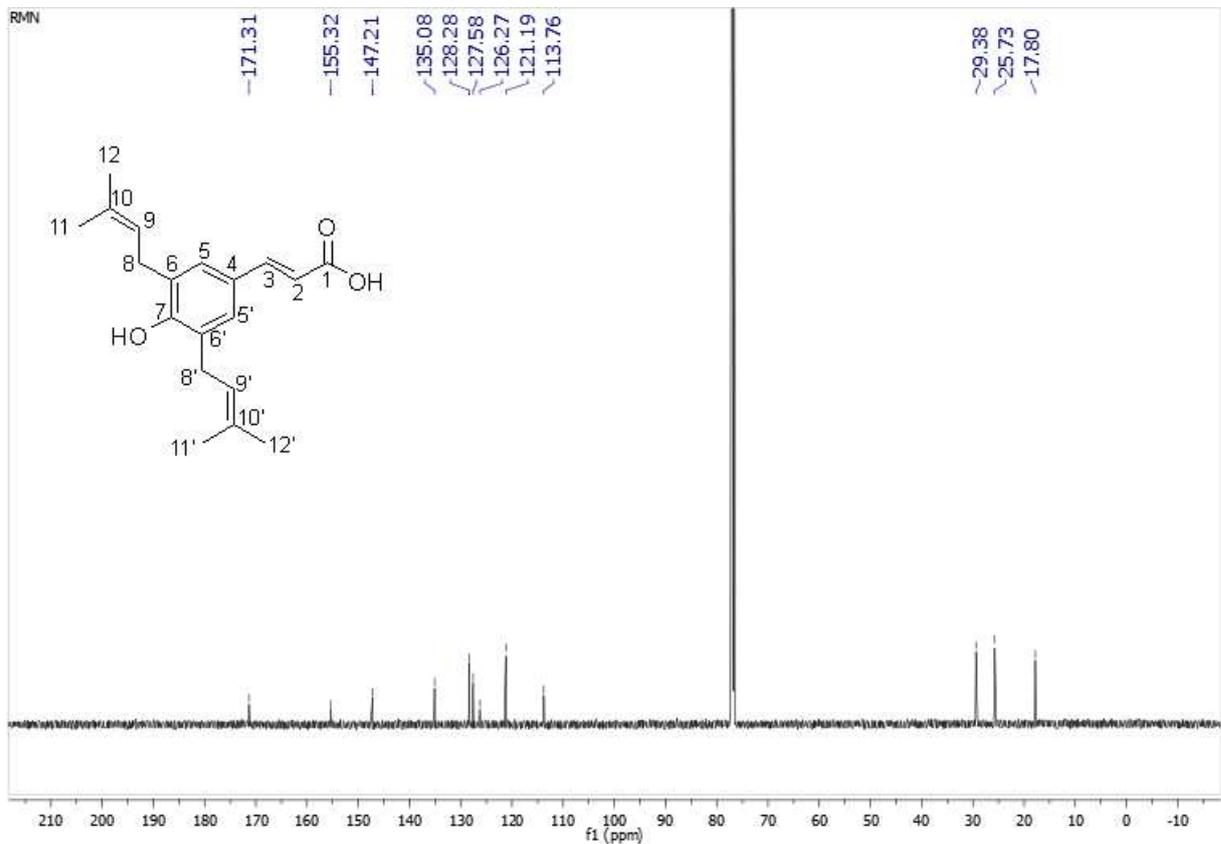
Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

Figura 26 – Expansão da região dos hidrogênios metilênicos H-8 e H-8' e olefínicos H-9 e H-9' do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da substância isolada



Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

Figura 27 – Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) da substância isolada



Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

Em relação ao espectro de RMN de ^{13}C (Figura 27), foi possível observar o sinal característico do carbono C-1, referente ao carbono carbonílico da carboxila em δ 171,3. Já os sinais atribuídos aos carbonos aromáticos e olefínicos foram observados entre δ 155,3 – 113,8. Ainda, os carbonos metilênico (C-8 e C-8') e metílicos (C-11, C-11', C-12 e C-12') tiveram seus sinais observados na região entre δ 29,5 – 17,9.

Após a análise dos dados obtidos e posterior comparação com os dados descritos por Park e colaboradores (2004) e Tani e colaboradores (2010), foi possível confirmar a identificação da substância isolada como artepilina C (Tabela 3).

Tabela 3 – Comparação dos dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) da substância isolada com os da literatura

RMN de ^1H - δ_{H} em ppm, número de hidrogênios, multiplicidade, J em Hz			
Atribuições	Substância isolada	Literatura (PARK et al., 2004) (CDCl_3 , 500 MHz)	Literatura (TANI et al., 2010) (CDCl_3 , 500 MHz)
H-3	7,69, 1H, d, $J = 15,9$	7,69, 1H, d, $J = 15,9$	7,71, 1H, d, $J = 16,0$
H-5 e H-5'	7,20, 2H, s	7,20, 2H, s	7,21, 2H, s
H-2	6,28, 1H, d, $J = 15,9$	6,29, 1H, d, $J = 15,9$	6,29, 1H, d, $J = 16,0$
H-9 e H-9'	5,31, 2H, m	5,31, 2H, t, $J = 7,2$	5,32, 2H, m
H-8 e H-8'	3,35, 4H, d, $J = 7,2$	3,35, 4H, d, $J = 7,2$	3,35, 4H, d, $J = 7,5$
H-11, H-11', H-12 e H-12'	1,79, 6H, s 1,78, 6H, s	1,79, 6H, s 1,78, 6H, s	1,80, 6H, s 1,78, 6H, s
RMN de ^{13}C - δ_{C} em ppm			
Substância isolada	Literatura (TANI et al., 2010) (CDCl_3 , 125 MHz)		
171,3	172,7		
155,3	155,4		
147,2	147,4		
135,1	135,2		
128,3	128,4		
127,6	127,7		
126,3	126,4		
121,2	121,3		
113,8	114,1		
29,4	29,5		
25,7	25,8		
17,8	17,9		

s = simpleto; d = duplete; t = tripleto; m = multipleteo.

Foi a primeira vez que a artepilina C foi isolada a partir de amostra de própolis verde partindo de uma extração seletiva ácido-base. Quando a substância foi isolada pela primeira vez, por Aga e colaboradores (1994), foi realizada extração da própolis com acetato de etila, sendo o extrato seco, posteriormente ressuspenso em MeOH e processado em colunas sequenciais de sílica e Sephadex. Mais tarde, a substância foi isolada algumas vezes a partir de extrato hexânico da própolis, seguido de algumas etapas cromatográficas (DE OLIVEIRA et al., 2014; MONTEIRO NETO et al., 2011; SOUSA et al., 2007b). O único relato de extratos ricos em artepilina C envolvendo extração básica foi o realizado por Souza e colaboradores (2007), que relataram a produção de extrato etanólico da própolis, com posterior diluição em água e partição líquido-líquido com hexano e diclorometano. Com a fração diclorometânica foram realizadas partições com soluções aquosas de carbonato de sódio e hidróxido de sódio, com posterior acidificação. A diferença do trabalho de Souza e colaboradores (2007) com o presente trabalho está na extração etanólica do trabalho citado, que pode levar a extração de várias substâncias que poderiam interferir e dificultar o processo de isolamento. No presente trabalho, a extração básica, foi realizada diretamente com a amostra de própolis, obtendo um extrato muito mais seletivo, e a substância artepilina C foi isolada a partir deste.

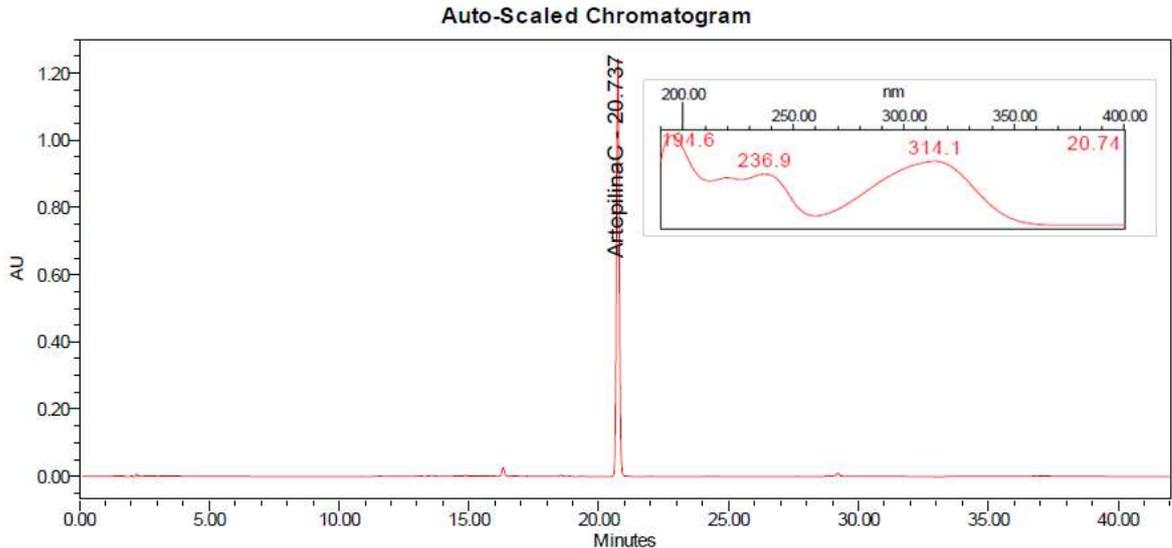
Vale ressaltar que as únicas empresas que comercializam o padrão de artepilina C são a “Wako Pure Chemical” (com 3 filiais, sendo estas no Japão, Estados Unidos e Alemanha) e a CheMall (localizada nos Estados Unidos). Além disso, na empresa “Wako Pure Chemical”, 5 mg de artepilina C custam, atualmente, US\$495 e na “CheMall”, 10 mg custam US\$1.150. O alto preço da substância torna importante a padronização de uma forma fácil de isolamento da mesma e, o fato de a maior fonte de artepilina C ser a própolis verde brasileira e o Brasil não possuir nenhuma empresa que produz e comercializa o padrão da substância torna o resultado encontrado no presente trabalho ainda mais importante.

5.3 DETERMINAÇÃO DA PUREZA DA SUBSTÂNCIA ISOLADA

Uma vez confirmada sua identificação, a artepilina C foi analisada novamente por CLAE, a fim de determinar-se a sua pureza, para que essa substância pudesse ser utilizada posteriormente como padrão de trabalho. Dessa forma, a substância foi analisada em comparação com o padrão primário (Wako Pure Chemical, 98,0 %)

conforme metodologia descrita. As Figuras 28 e 29 mostram os cromatogramas do padrão primário e da substância isolada obtidos nessa análise.

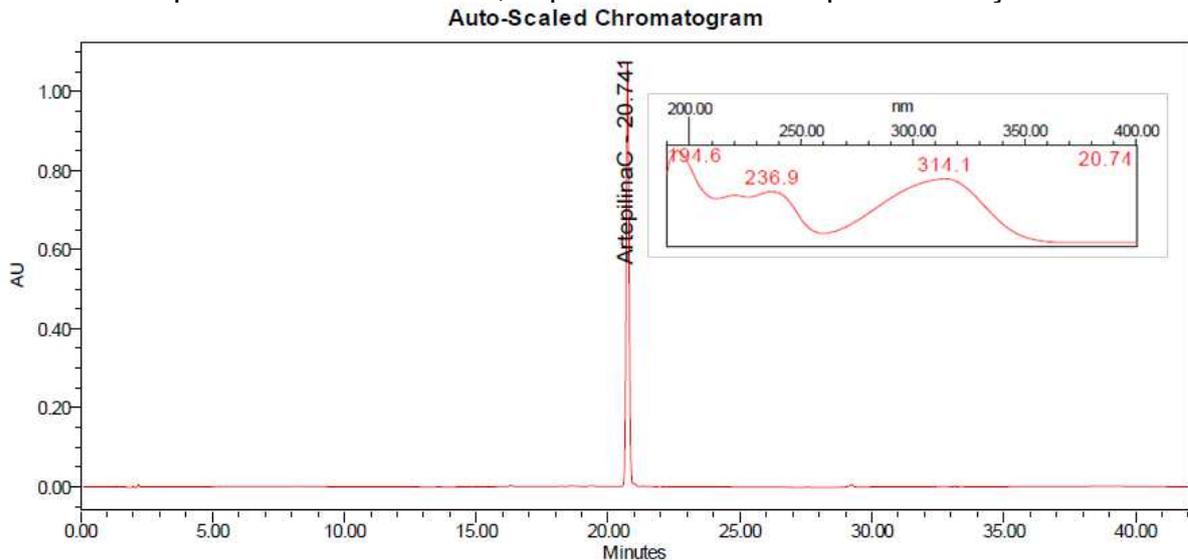
Figura 28 – Perfil cromatográfico do padrão de artepilina C (Wako Pure Chemical) para determinação de pureza em CLAE-DAD, espectro de UV e tempo de retenção



Eluente: 0-5 minutos: 30 % ACN; 5-30 minutos: gradiente linear até 100 % ACN; 30-32 minutos: gradiente linear até 30 % de ACN; 32-42 minutos: reequilíbrio da coluna. Detecção: 315 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

Figura 29 – Perfil cromatográfico da artepilina C isolada para determinação de pureza em CLAE-DAD, espectro de UV e tempo de retenção



Eluente: 0-5 minutos: 30 % ACN; 5-30 minutos: gradiente linear até 100 % ACN; 30-32 minutos: gradiente linear até 30 % de ACN; 32-42 minutos: reequilíbrio da coluna. Detecção: 315 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

Após a realização das injeções, comparando-se as áreas obtidas, a pureza da substância isolada foi determinada em 97,8 %. Esse valor está muito próximo da

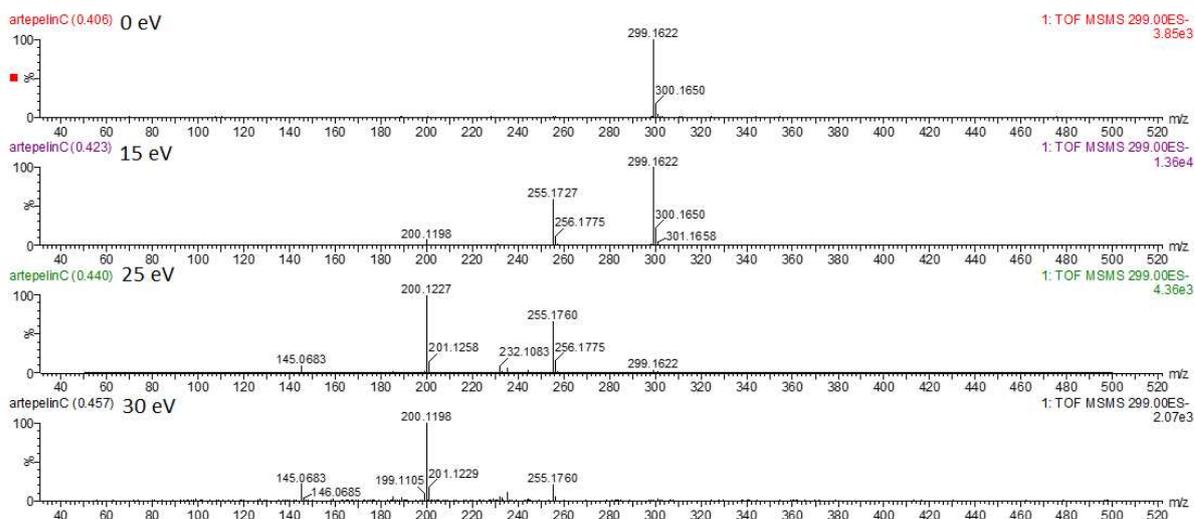
pureza das substâncias padrão encontradas disponíveis no mercado atualmente, já que no caso das duas empresas que realizam o comércio (“Wako Pure Chemical” e “CheMall”) a pureza é determinada em 98,0 %.

Assim, essa substância isolada, com o valor de pureza encontrado, foi utilizada como padrão de trabalho para a quantificação da artepilina C por CLUE-EM-Q-TOF, além de ser utilizada nas atividades biológicas em modelos animais descritas.

5.4 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO POR CLUE-EM-Q-TOF

A artepilina C isolada foi analisada por detector de espectrometria de massas em infusão direta. A Figura 30 mostra o espectro de massas obtido com as energias de colisão 0, 15, 25 e 30 eV, respectivamente.

Figura 30 – Avaliação da infusão direta de artepilina C em detector Q-TOF utilizando energias de colisão de 0, 15, 25 e 30 eV



Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

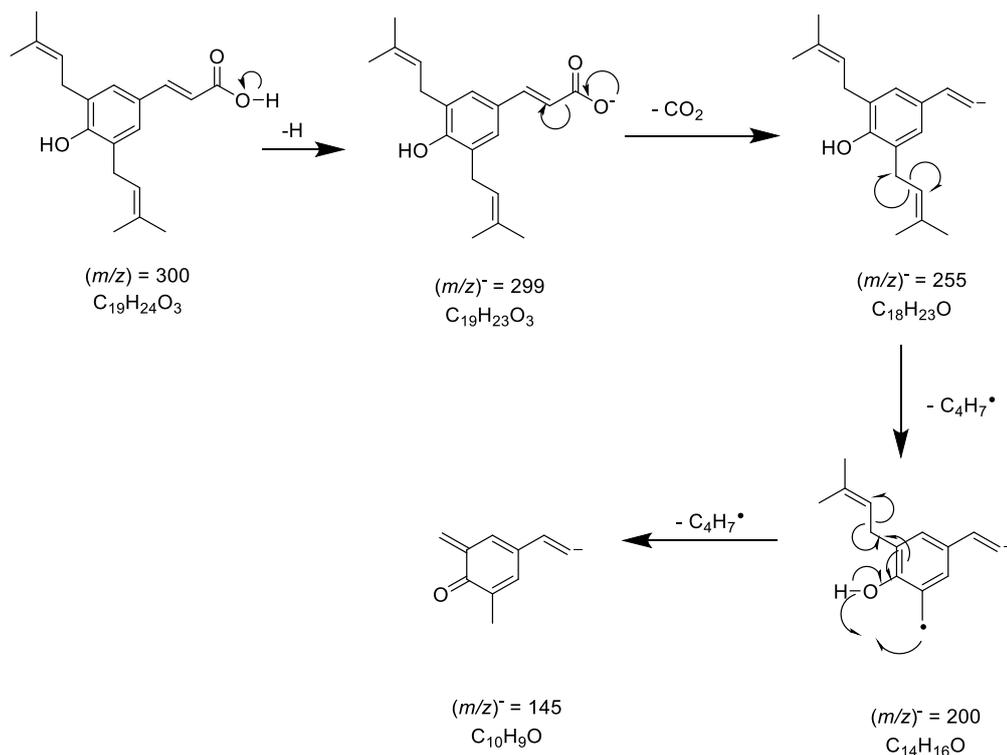
Com as análises de infusão direta da artepilina C isolada em detector Q-TOF foi possível observar que, quando não é utilizada energia de colisão para quebra da molécula, é observado seu íon pseudo-molecular em $m/z = 299,1622$, o que reforça a identificação da substância, uma vez que a massa exata da artepilina C ($C_{19}H_{24}O_3$) é 300,1725. Como a substância está sendo analisada no modo negativo, o íon pseudo-molecular é detectado, devido a perda de um hidrogênio $[M-H]^-$, sendo que a massa exata para ele ($C_{19}H_{23}O_3$) seria 299,1647. Foi possível determinar, observando os

espectros de massas com energias de colisão de 15, 25 e 30 eV, que os íons fragmentos mais importantes para esta molécula foram $m/z = 299$, $m/z = 255$, $m/z = 200$ e $m/z = 145$ e que, comparativamente, a energia de colisão de 25 eV é a ideal para a análise dessa substância, pois nessa condição todos os fragmentos mais importantes estão evidentes no espectro de massas, e o íon pseudo-molecular ($m/z = 299$) ainda não está totalmente consumido pela fragmentação da molécula, como aconteceria utilizando a energia de 30 eV.

Esses fragmentos também foram encontrados para a artepilina C em outros estudos que identificaram a substância em detector de espectrometria de massas (CARVALHO et al., 2011; GARDANA et al., 2007; ZHANG et al., 2017b). Além disso, um estudo recente que avaliou o metabolismo hepático da artepilina C *in vitro*, também realizou a análise da substância por detector Q-TOF em diferentes energias de colisão, selecionando a energia de 25 eV como a ideal (CARRÃO, 2015).

Observando o espectro de massas e com o auxílio do próprio *Software* MassLynx®, que sugere a fórmula molecular de cada fragmento, foi realizada uma proposta de fragmentação da molécula, confirmada pelo estudo de Carrão (2015), mostrada na Figura 31.

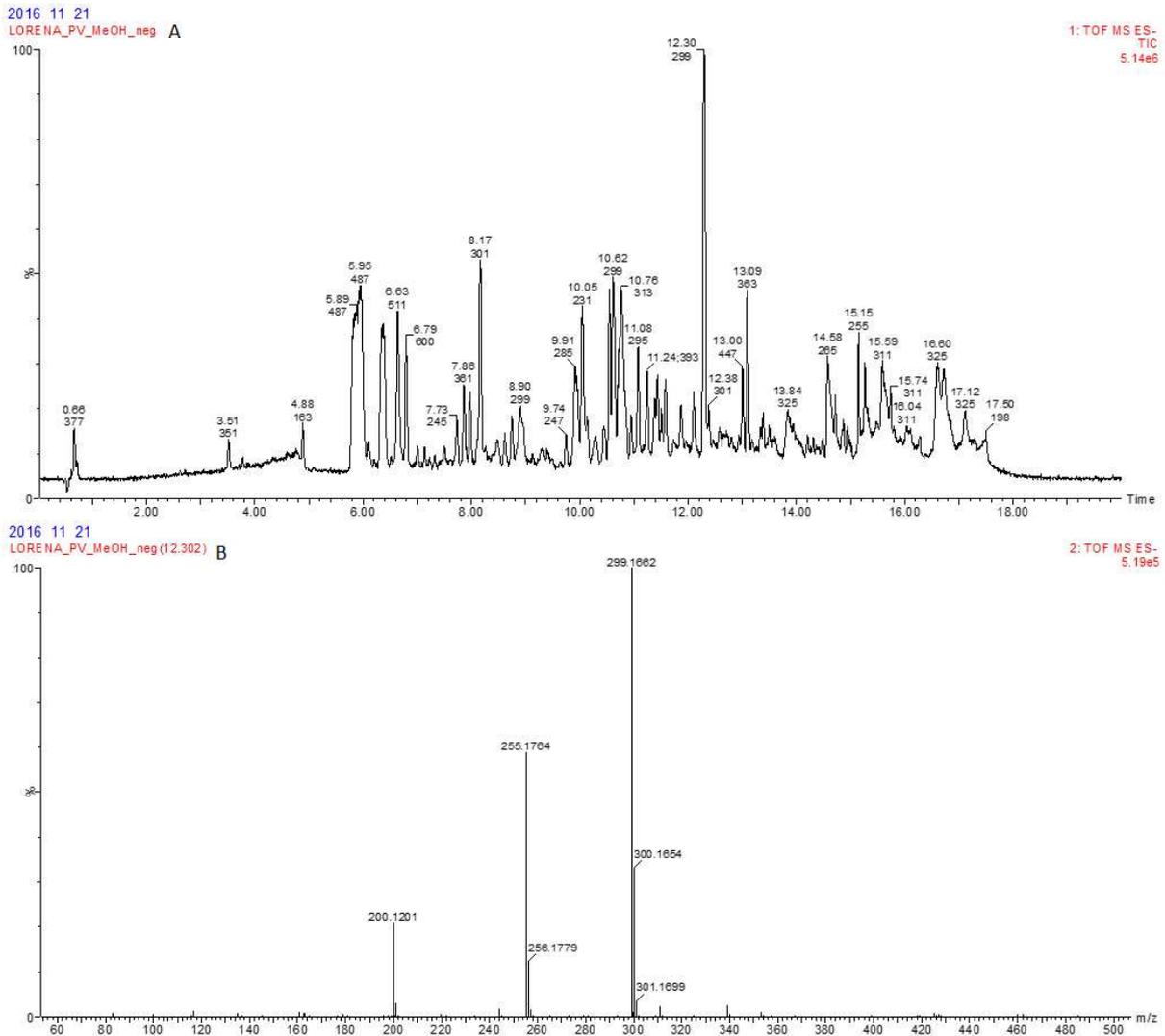
Figura 31 – Proposta de fragmentação da artepilina C



Fonte: Adaptado de CARRÃO, 2015.

Em seguida, a amostra de própolis verde foi analisada sequencialmente em 4 condições, de forma a desenvolver uma melhor metodologia analítica para quantificação da artepilina C por CLUE-EM-Q-TOF. As análises nessas condições estão demonstradas nas Figuras 32, 33, 35 e 36.

Figura 32 – Análise de amostra de própolis verde por CLUE-EM-Q-TOF na condição 1

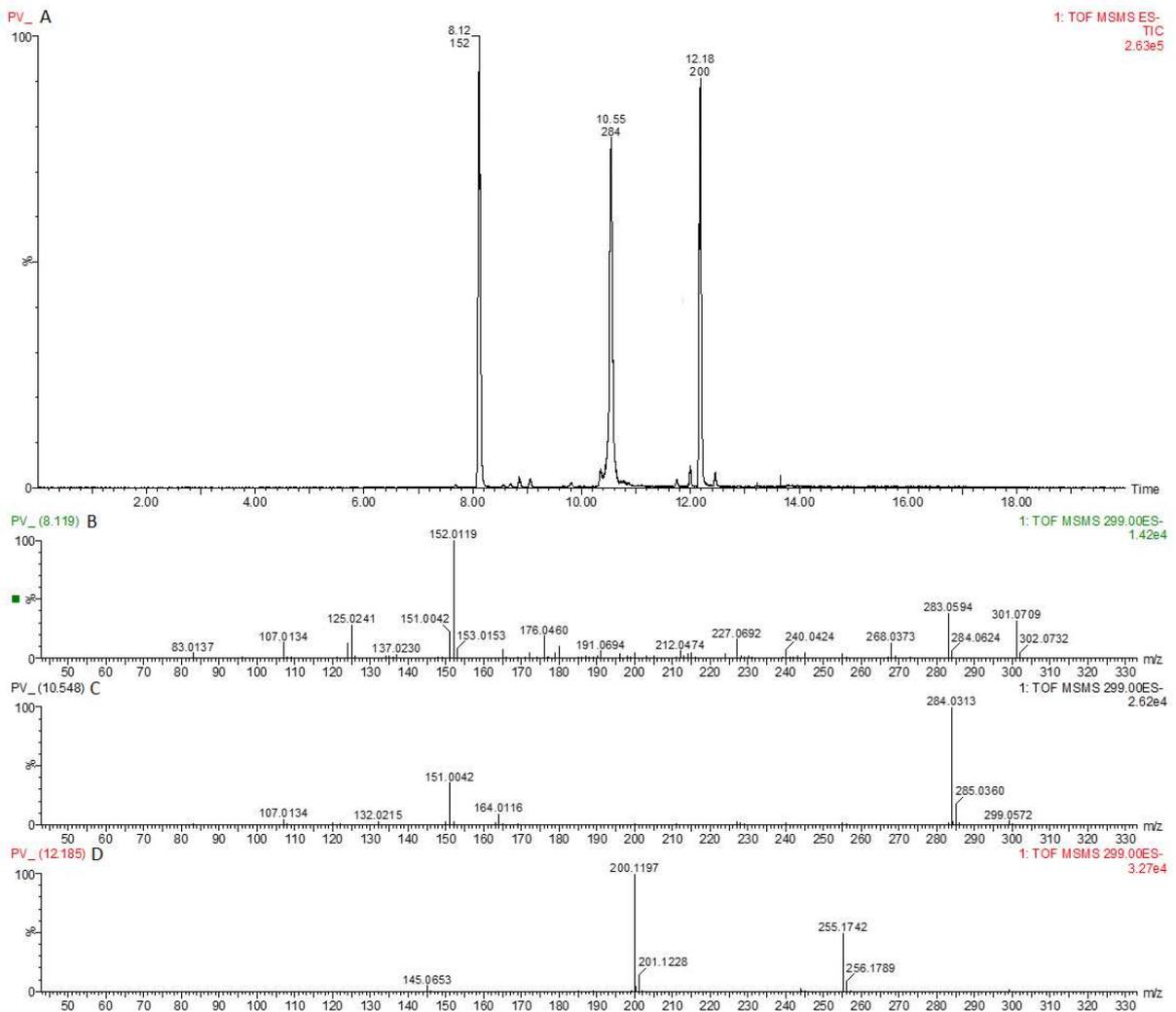


(A) Cromatograma (B) Espectro de massas do pico de tempo de retenção 12,30 min.
Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

A análise da amostra de própolis verde na condição 1, foi realizada no modo de aquisição EM^e. Nesse tipo de análise, não ocorre seleção de massa específica no primeiro quadrupolo do analisador de massas, sendo realizada uma varredura em uma faixa de m/z . Dessa forma, é possível realizar uma análise geral da amostra e detectar grande parte das substâncias presentes. Foi possível observar que no tempo

de retenção de 12,30 minutos, foi detectada uma substância com espectro de massas correspondente ao da artepilina C. Dessa forma, na condição de análise 2, o modo de aquisição selecionado foi o modo EM/EM, onde ocorre uma seleção de massa específica no quadrupolo (no caso m/z 299, que corresponde ao íon pseudo-molecular da artepilina C), sendo então possível visualizar, apenas as substâncias de interesse.

Figura 33 - Análise de amostra de própolis verde por CLUE-EM-Q-TOF na condição 2



(A) Cromatograma (B) Espectro de massas do pico de tempo de retenção 8,12 min (C) Espectro de massas do pico de tempo de retenção 10,55 min (D) Espectro de massas do pico de tempo de retenção 12,18 min.

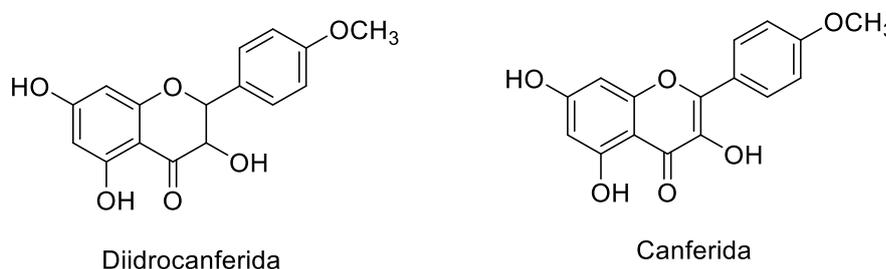
Fonte: elaborado pelo próprio autor, 2017.

Com a análise da amostra de própolis verde na condição 2, foi possível notar que ao selecionar a m/z 299 no primeiro quadrupolo, houve maior seletividade das substâncias detectadas, sendo que 3 substâncias foram detectadas majoritariamente. Analisando-se os espectros de massas, observa-se que a artepilina C corresponde ao

pico de tempo de retenção 12,18 minutos e que, além disso, com a fixação da energia de colisão em 25 eV (como já havia sido definido anteriormente), o espectro de massas apresentou-se como o da infusão direta da substância isolada nessa energia de colisão (Figura 30), com as m/z 299, 255, 200 e 145 evidentes, sendo a m/z 200 o pico base (m/z de maior intensidade).

Ao analisar os espectros de massas das outras duas substâncias em comparação com a literatura, pode-se sugerir que a substância eluída no tempo de retenção 8,12 minutos seja a diidrocanferida (fragmentos encontrados na literatura: m/z 301, 283, 268, 227, 152, 125) e que a substância eluída no tempo de retenção 10,55 minutos seja a canferida (fragmentos encontrados na literatura: m/z 299, 284, 200, 164, 151, 107). As estruturas químicas da diidrocanferida e da canferida estão mostradas na Figura 34 e essas substâncias também são encontradas frequentemente em amostras de própolis verde (CARVALHO et al., 2011; GARDANA et al., 2007; SAWAYA, 2006; ZHANG et al., 2017b).

Figura 34 – Estruturas químicas da diidrocanferida e da canferida



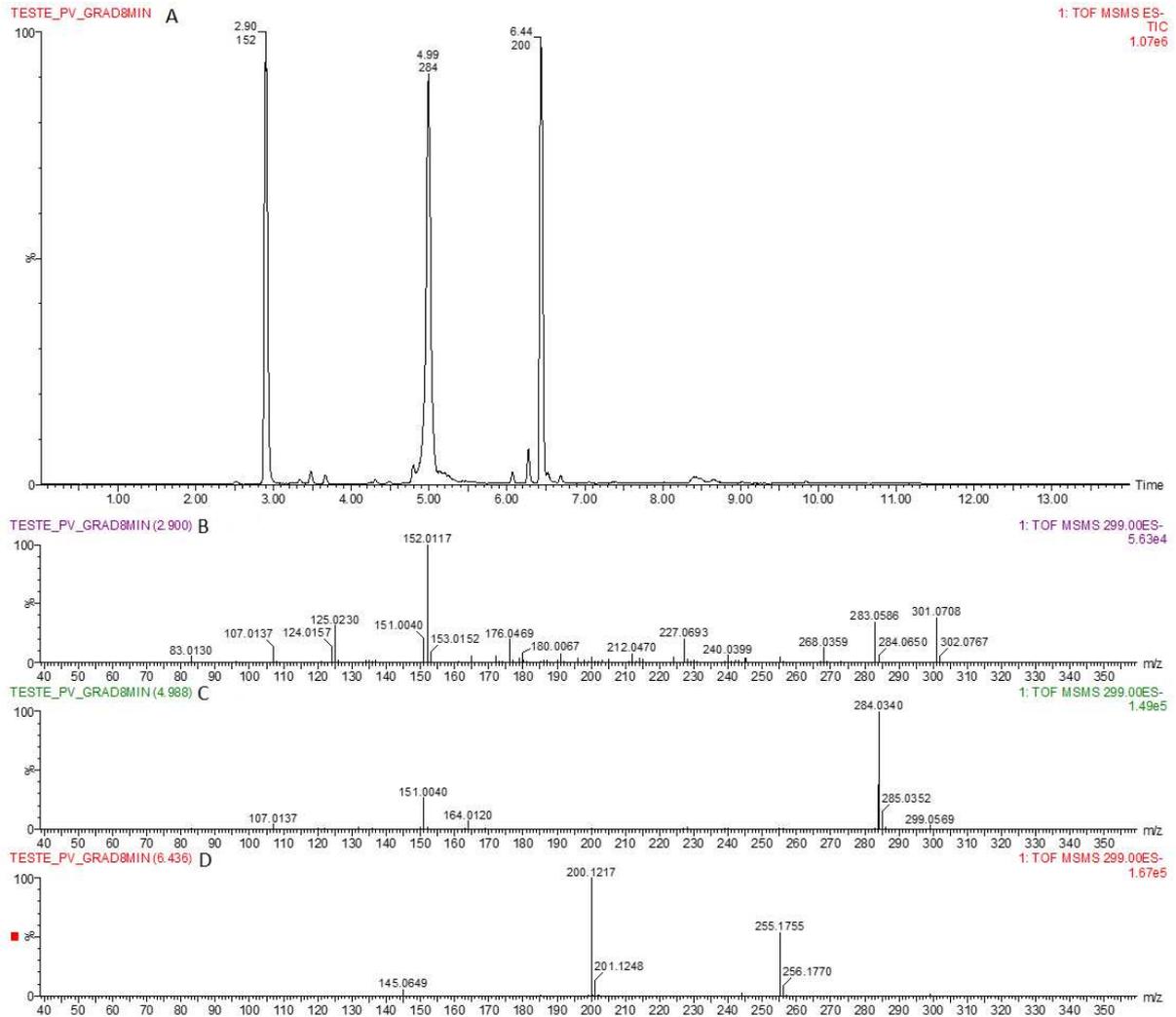
Fonte: Adaptado de BERRETA et al., 2017.

Como a primeira substância do cromatograma da condição 2 foi eluída no tempo de retenção de 8,12 minutos, o gradiente foi alterado, na tentativa de diminuir o tempo de análise e otimizar a metodologia. Dessa forma, como o gradiente na condição 2 se iniciava com apenas 5 % de MeOH e essa proporção aumentava até 98 % em 14 minutos, optou-se por aumentar a proporção inicial de MeOH, na tentativa de diminuir o tempo de retenção das substâncias detectadas. Esse foi então o ensaio realizado na condição 3.

A partir da análise do cromatograma da condição 3, foi possível observar que o objetivo de diminuir o tempo de análise foi alcançado, uma vez que a primeira substância (diidrocanferida) passou a eluir com tempo de retenção de 2,90 minutos e a artepilina C, com tempo de retenção de 6,4 minutos, sendo que as três substâncias

detectadas continuaram com boa resolução. Dessa forma, a partir dessa análise, as condições cromatográficas foram definidas como ideais.

Figura 35 - Análise de amostra de própolis verde por CLUE-EM-Q-TOF na condição 3

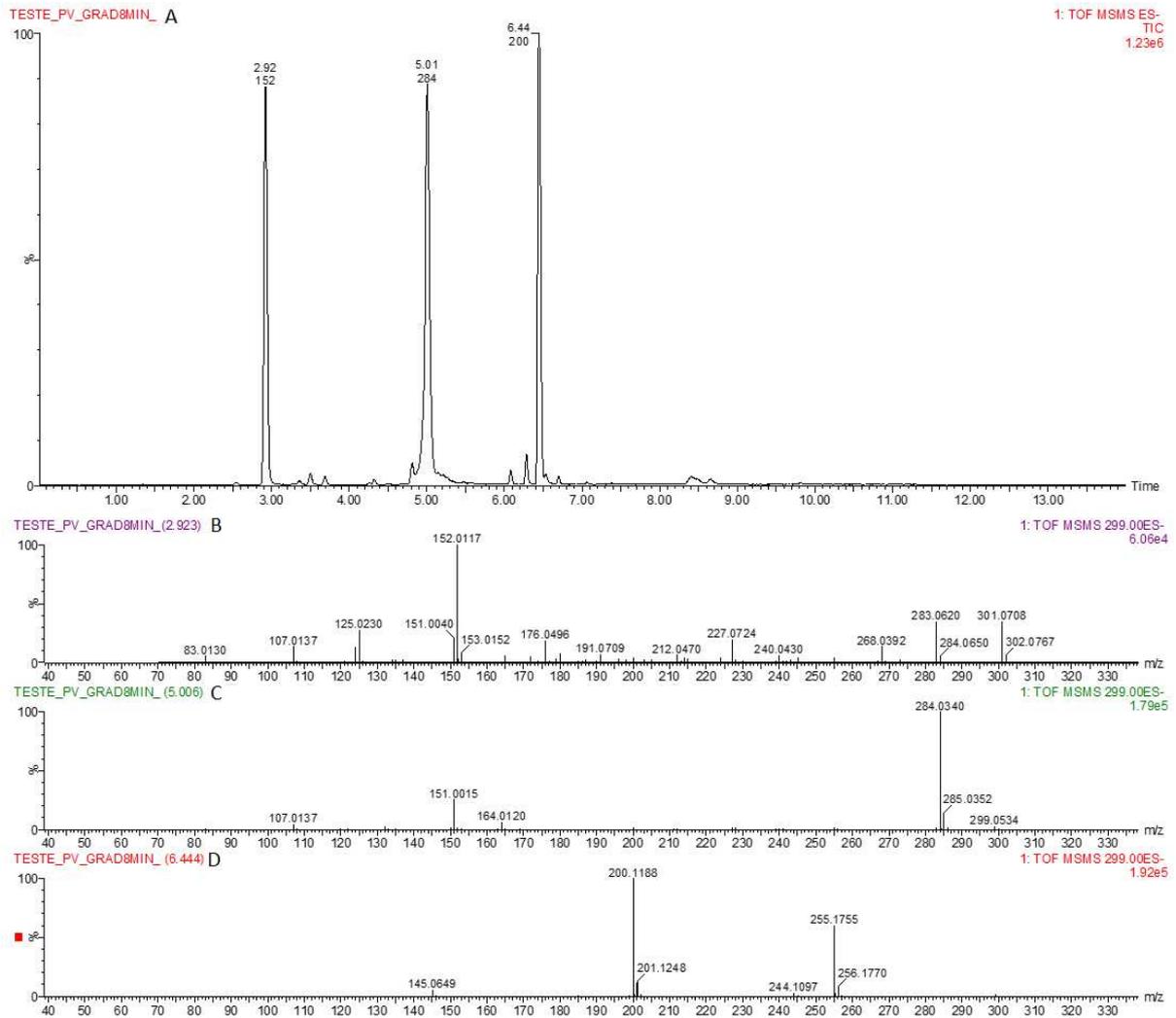


(A) Cromatograma (B) Espectro de massas do pico de tempo de retenção 2,90 min (C) Espectro de massas do pico de tempo de retenção 4,99 min (D) Espectro de massas do pico de tempo de retenção 6,44 min.

Fonte: elaborado pelo próprio autor, 2017.

Em seguida, optou-se por otimizar as condições do detector de espectrometria de massas, aumentando-se a temperatura da fonte de ionização e a temperatura de dessolvatação. Essa alteração pode influenciar o processo inicial de ionização da substância, podendo aumentar a detecção da mesma e esses valores são os valores limite recomendados pelas normas de utilização do equipamento para o fluxo de 0,4 mL/min utilizado na cromatografia líquida. Dessa forma, este foi o ensaio realizado na condição de análise 4.

Figura 36 - Análise de amostra de própolis verde por CLUE-EM-Q-TOF na condição 4

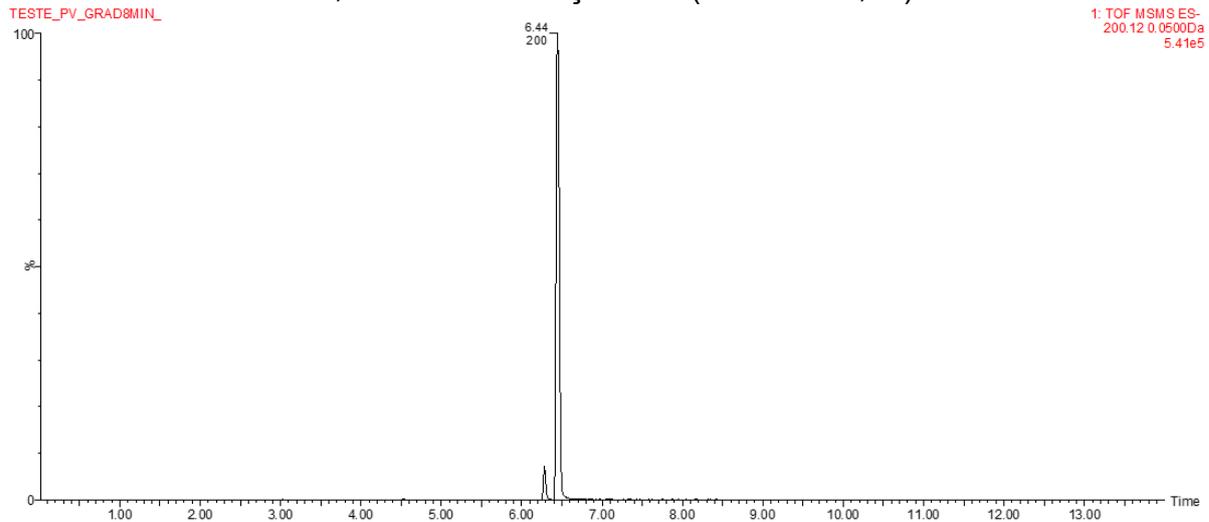


(A) Cromatograma (B) Espectro de massas do pico de tempo de retenção 2,92 min (C) Espectro de massas do pico de tempo de retenção 5,00 min (D) Espectro de massas do pico de tempo de retenção 6,44 min.

Fonte: elaborado pelo próprio autor, 2017.

Foi possível notar que a intensidade do sinal de detecção se elevou na condição 4 ($1,23 \times 10^6$) em relação à condição 3 ($1,07 \times 10^6$) e, dessa forma, as condições de análise foram definidas como ideais. Além disso, tendo em vista que no espectro de massas da artepilina C o pico base é o de m/z 200 (mais intenso e estável), optou-se por realizar a quantificação no modo SRM (“*selected reaction monitoring*”) com esse íon fragmento, deixando o método mais específico para a substância de interesse, uma vez que fazendo a seleção deste íon (mais especificamente em m/z 200,12), as demais substâncias não são observadas no cromatograma da amostra (Figura 37). Em seguida, o método de análise, seguindo as condições desenvolvidas, foi validado.

Figura 37 - Análise de amostra de própolis verde por CLUE-EM-Q-TOF na condição 4, realizando seleção m/z (299 \rightarrow 200,12)



Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

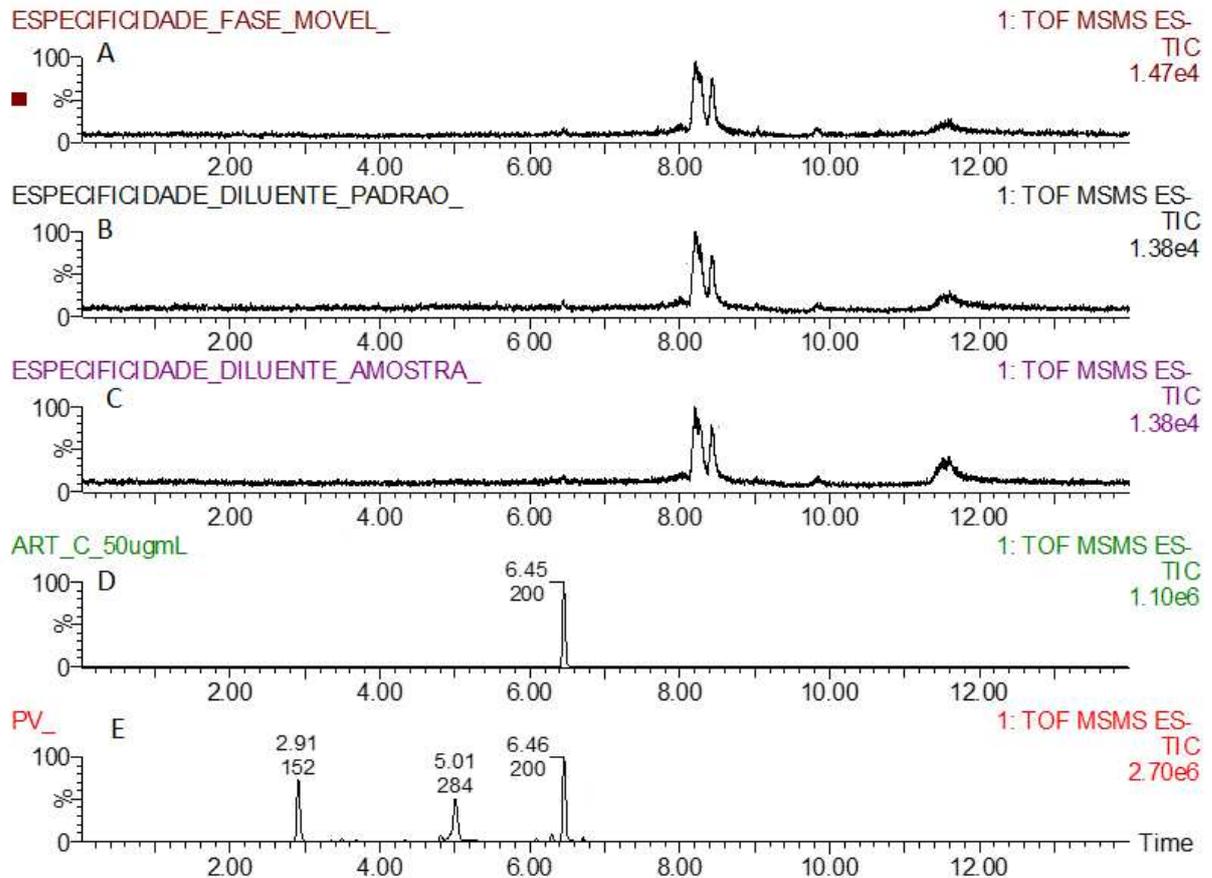
5.5 VALIDAÇÃO ANALÍTICA DE METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO POR CLUE-EM-Q-TOF

De acordo com as condições de análise definidas, o método de quantificação foi então validado, sendo realizados os seguintes testes:

- Especificidade:

Foram injetados os diluentes do padrão e da amostra e a fase móvel (condição inicial de análise), nas condições do método de quantificação, de forma a comparar os cromatogramas com os cromatogramas do padrão e da amostra, e assim foi possível confirmar que o método é específico para quantificar a artepilina C, nas condições propostas, uma vez que os cromatogramas dos diluentes e da fase móvel não apresentaram detecção de nenhum pico no tempo de retenção da artepilina C. A Figura 38 mostra essa comparação.

Figura 38 – Cromatogramas de especificidade do método de quantificação da artepilina C por CLUE-EM-QTOF



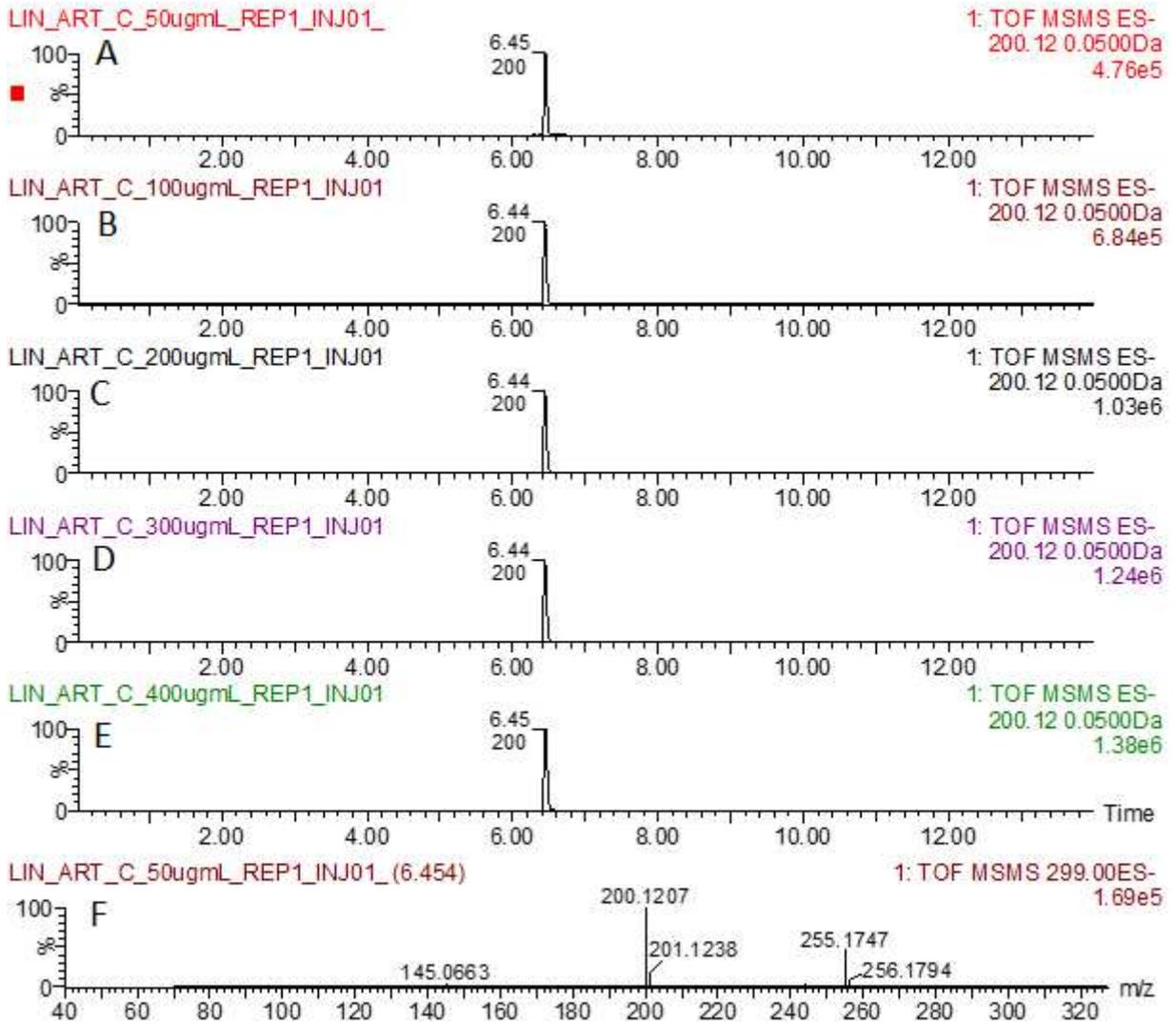
(A) Fase móvel (B) Diluente do padrão (C) Diluente da amostra (D) Artepilina C a 50 µg/mL (E) Amostra de própolis verde.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

- Linearidade

Para a linearidade, foram feitas as injeções da curva de calibração, com as soluções de artepilina C nas concentrações de 50, 100, 200, 300 e 400 µg/mL (com as concentrações corrigidas com a pureza da artepilina C, obtida anteriormente). A Figura 39 mostra os cromatogramas de uma das replicatas de cada concentração de artepilina C. A Figura 40 mostra a curva de calibração construída a partir dos dados obtidos pelas injeções realizadas, para a qual foi elaborada uma reta de regressão pelo método dos mínimos quadrados e realizada uma avaliação da linearidade pelos coeficientes de correlação (r) e determinação (r^2). Além disso, foi realizada uma análise dos resíduos e uma avaliação da igualdade de variâncias (pelo teste de Cochran).

Figura 39 – Cromatogramas de linearidade e espectro de massas da menor concentração do método de quantificação da artepilina C por CLUE-EM-Q-TOF

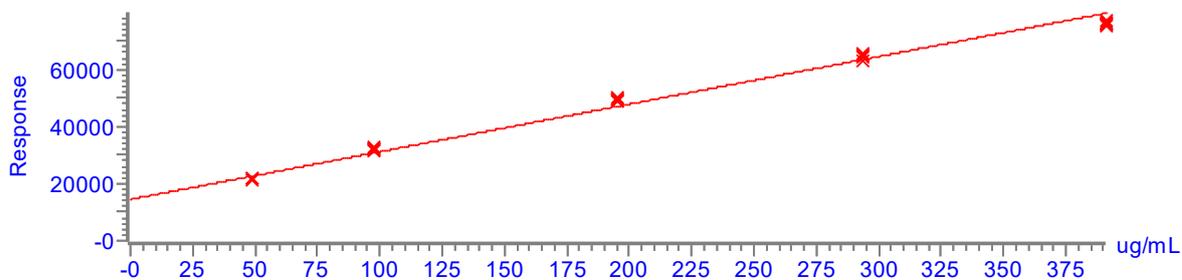


(A) Artepilina C a 50 µg/mL (B) Artepilina C a 100 µg/mL (C) Artepilina C a 200 µg/mL (D) Artepilina C a 300 µg/mL (E) Artepilina C a 400 µg/mL (F) Espectro de massas do pico de tempo de retenção 6.45 min.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

Figura 40 – Linearidade (curva de calibração) da artepilina C em método de quantificação da artepilina C por CLUE-EM-Q-TOF

Compound name: Artepilina C
 Correlation coefficient: $r = 0.995268$, $r^2 = 0.990559$
 Calibration curve: $166.956 * x + 14468.8$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

O gráfico da curva de calibração foi dado pelo próprio *Software* MassLynx e foram gerados os seguintes dados:

- Equação da reta: $y = 166,956 x + 14468,8$, sendo y a resposta e x a concentração de artepilina C em $\mu\text{g/mL}$;
- Inclinação da reta: 166,956;
- Intersecção com o eixo y : 14468,8
- Coeficiente de correlação (r) = 0,995268;
- Coeficiente de determinação (r^2) = 0,990559
- Avaliação dos resíduos: Soma residual dos quadrados mínimos: 146,99, sendo que os pontos no gráfico de resíduos estão aleatoriamente distribuídos ao redor do eixo x , não apresentando nenhum comportamento ou tendência funcional.
- Avaliação da igualdade de variâncias: pelo teste de Cochran, o $C_{\text{calculado}} = 0,648$, sendo menor que o $C_{\text{crítico}} = 0,684$, o que significa que os erros nos valores de y são constantes, ou seja, são homocedásticos, fazendo com que todos os pontos tenham peso igual quando a inclinação e a intersecção são calculadas.

Dessa forma, pode-se considerar que o método analítico desenvolvido apresenta caráter linear.

- Intervalo: O intervalo de trabalho foi definido pelos limites inferior e superior da linearidade, sendo portanto 48,90 a 391,20 $\mu\text{g/mL}$, devido às correções realizadas pela pureza da substância.

Esse intervalo de análise está próximo ao intervalo utilizado nas validações realizadas por Sousa e colaboradores (2007b) e Sousa e colaboradores (2009), que utilizaram uma faixa de trabalho para a artepilina C entre 50 e 533,33 $\mu\text{g/mL}$. Outros

pesquisadores, utilizaram tanto faixas de concentrações mais altas, quanto mais baixas. Nobushi e colaboradores (2012) utilizaram uma faixa linear de trabalho para a artepilina C entre 0,75 e 2.500 µg/mL, enquanto Matsuda e Almeida-Muradian (2008) utilizaram concentrações entre 0,05 e 15,00 µg/mL. Todos os estudos citados, validaram a quantificação da substância utilizando a técnica de CLAE-DAD. No presente estudo, optou-se por uma faixa de concentração intermediária entre os estudos de referência, levando em consideração a sensibilidade da técnica utilizada (CLUE-EM), que tende a ser maior, porém também considerando o volume de injeção muito baixo (1 µL).

- Precisão:

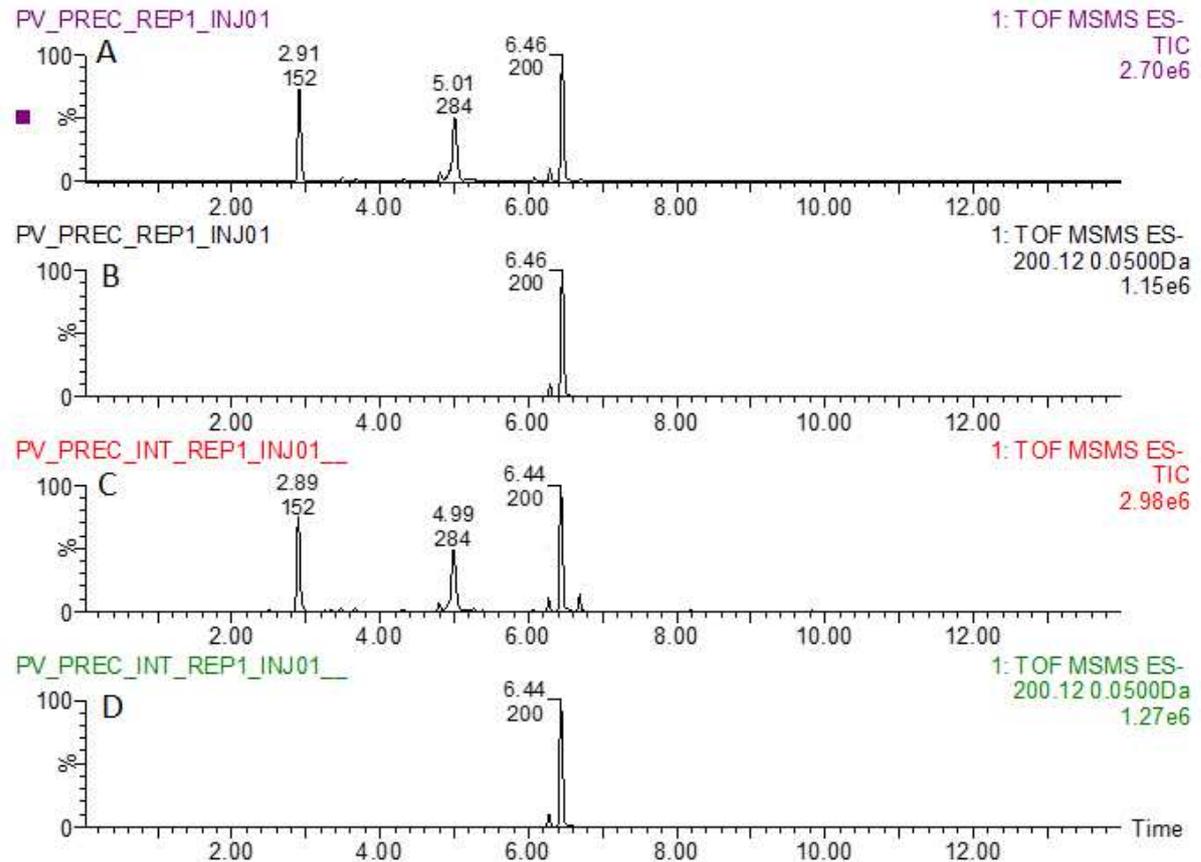
Foram realizadas precisão por repetibilidade e precisão intermediária. A reprodutibilidade não foi realizada por não haver disponibilidade de outro laboratório com um equipamento com as mesmas especificações para realização da análise. Os resultados obtidos para a precisão por repetibilidade e precisão intermediária estão mostrados na tabela 4.

Tabela 4 - Resultados da precisão em método de quantificação da artepilina C por CLUE-EM-Q-TOF

Precisão por repetibilidade (PR)			Precisão intermediária (PI)		
Amostra	Resultado em µg/mL	% Artepilina C em Própolis verde	Amostra	Resultado em µg/mL	% Artepilina C em Própolis verde
1	249,87	6,25	1	266,51	6,66
2	257,02	6,43	2	269,53	6,74
3	259,13	6,48	3	262,41	6,56
4	255,11	6,38	4	264,21	6,61
5	248,94	6,22	5	269,94	6,75
6	247,71	6,19	6	273,34	6,83
Média	252,96	6,32	Média	267,66	6,69
DPR	1,9 %	1,9 %	DPR	1,5 %	1,5 %
Média PR x PI µg/mL				260,31 µg/mL	
Média PR x PI % Artepilina C em Própolis verde				6,51	
DPR PR x PI				3,4 %	

A Figura 41 mostra cromatogramas de uma das replicatas de cada precisão, sendo um deles do cromatograma inicial (m/z 299) e o outro do modo SRM, com a seleção da m/z de maior intensidade do espectro de massas da artepilina C nas condições desenvolvidas no método analítico (m/z 299 \rightarrow 200,12).

Figura 41 – Cromatogramas de precisão por repetibilidade e precisão intermediária do método de quantificação da artepilina C por CLUE-EM-Q-TOF



(A) Precisão por repetibilidade m/z 299; (B) Precisão por repetibilidade m/z 299 \rightarrow 200,12; (C) Precisão intermediária m/z 299; (D) Precisão intermediária m/z 299 \rightarrow 200,12.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

Foi possível observar que, dentro de uma análise diária, realizada por um mesmo analista e no mesmo dia, a precisão teve um desvio padrão relativo baixo, menor que 2 %. Em análise realizada em dia diferente e por analista diferente (precisão intermediária), a precisão teve desvio padrão relativo ainda baixo, de 3,4 % em relação a análise do dia anterior, o que significa que podemos considerar o método desenvolvido preciso. Sousa e colaboradores (2007b) e Sousa e colaboradores (2009) também avaliaram a precisão por repetibilidade dos métodos validados para a quantificação de artepilina C por CLAE-DAD, obtendo desvios de 3,51 % e 1,04 %, respectivamente.

respectivamente. Já Nobushi e colaboradores (2012) avaliaram a precisão por repetibilidade e a precisão intermediária, porém cada uma delas em três concentrações diferentes, obtendo desvios de 1,28 % a 5,60 % (repetibilidade) e 1,95 % a 6,75 % (intermediária). Dessa forma, o presente estudo apresentou desvios menores que a maioria dos relatados para a substância.

Além disso, o resultado obtido a partir da quantificação da artepilina C em própolis verde pela técnica desenvolvida pode ser comparado com resultados encontrados em literatura com utilização de outras metodologias de quantificação dessa substância. Matsuda e Almeida-Muradian (2008), por exemplo, desenvolveram e validaram metodologia de quantificação dessa substância por CLAE-UV e obtiveram, em amostras de própolis de Minas Gerais, quantidades de artepilina C variando entre 5,68 % e 10,20 %, estando portanto a quantidade de artepilina C encontrada na amostra analisada pela metodologia desenvolvida no presente trabalho (média de 6,51 %), dentro da quantidade em geral encontrada para amostras de própolis verde.

- Limites de detecção e quantificação:

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados conforme equações demonstradas anteriormente e os valores encontrados foram 10,79 µg/mL para LD e 32,70 µg/mL para LQ.

Dos estudos citados que realizaram validação de quantificação da substância (porém por CLAE-DAD), os únicos que determinaram os limites de detecção e quantificação foram os realizados por Matsuda e Almeida-Muradian (2008) e Nobushi e colaboradores (2012). Estes estudos, encontraram valores bem mais baixos para esses limites do que os encontrados no presente estudo, porém vale ressaltar que os limites inferiores dos intervalos de concentrações utilizados nestes estudos eram também bem mais baixos, o que torna a comparação dificultada.

- Exatidão:

A exatidão corresponde à recuperação da quantidade de padrão adicionada em uma amostra. A amostra não contaminada com padrão demonstrou concentração média de 82,7 µg/mL e amostras nessa mesma concentração foram contaminadas com padrão em três concentrações diferentes, de forma a obter as amostras de

concentrações mínima, média e máxima. A tabela 5 mostra as recuperações determinadas para as amostras da exatidão.

Tabela 5 - Resultados da exatidão em método de quantificação da artepilina C por CLUE-EM-Q-TOF

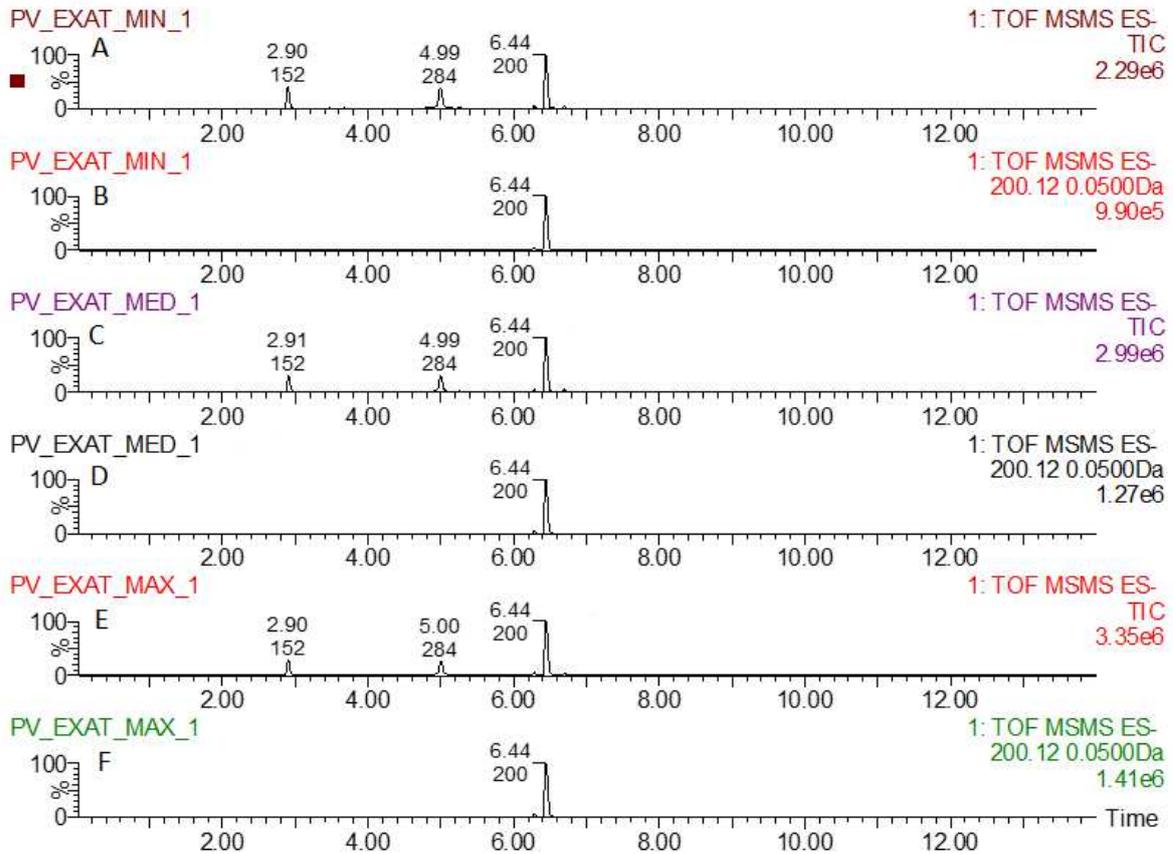
Amostra	Concentração teórica	Concentração Calculada	Recuperação (%)	Recuperação Média (%)
Mínima 1	97,80 µg/mL	98,90 µg/mL	101,12	
Mínima 2	97,80 µg/mL	100,70 µg/mL	102,97	103,95
Mínima 3	97,80 µg/mL	105,40 µg/mL	107,77	
Média 1	195,60 µg/mL	198,20 µg/mL	101,32	
Média 2	195,60 µg/mL	203,62 µg/mL	104,10	102,49
Média 3	195,60 µg/mL	199,62 µg/mL	102,06	
Máxima 1	293,40 µg/mL	268,11 µg/mL	91,38	
Máxima 2	293,40 µg/mL	272,50 µg/mL	92,88	92,57
Máxima 3	293,40 µg/mL	274,21 µg/mL	93,46	

Dos estudos anteriores de validação de quantificação da artepilina C, apenas o realizado por Matsuda e Almeida-Muradian (2008) avaliou a exatidão na quantificação de artepilina C, obtendo uma faixa de recuperação entre 98 e 102 %. Das concentrações avaliadas, apenas a concentração máxima teve uma recuperação um pouco mais distante da faixa de recuperação encontrada no artigo em referência.

Na legislação brasileira vigente (BRASIL, 2003) não existe uma especificação para os valores de recuperação ideais para considerar um método exato, porém vários artigos foram encontrados em literatura considerando a faixa encontrada (92,57 a 103,95 % de recuperação) como satisfatória (BEI; AN, 2015; GAJBHIYE et al., 2016; SOUSA et al., 2007b; SOUSA et al.; 2009).

A Figura 42 mostra cromatogramas de uma das replicatas de cada uma das amostras (mínima, média e máxima) analisadas na exatidão, sendo um deles do cromatograma inicial (m/z 299) e o outro do cromatograma com a seleção da m/z 299 → 200,12.

Figura 42 – Cromatogramas de exatidão do método de quantificação da artepilina C por CLUE-EM-Q-TOF



(A) Amostra mínima m/z 299; (B) Amostra mínima m/z 299 \rightarrow 200,12; (C) Amostra média m/z 299; (D) Amostra média m/z 299 \rightarrow 200,12; (E) Amostra máxima m/z 299; (F) Amostra máxima m/z 299 \rightarrow 200,12.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

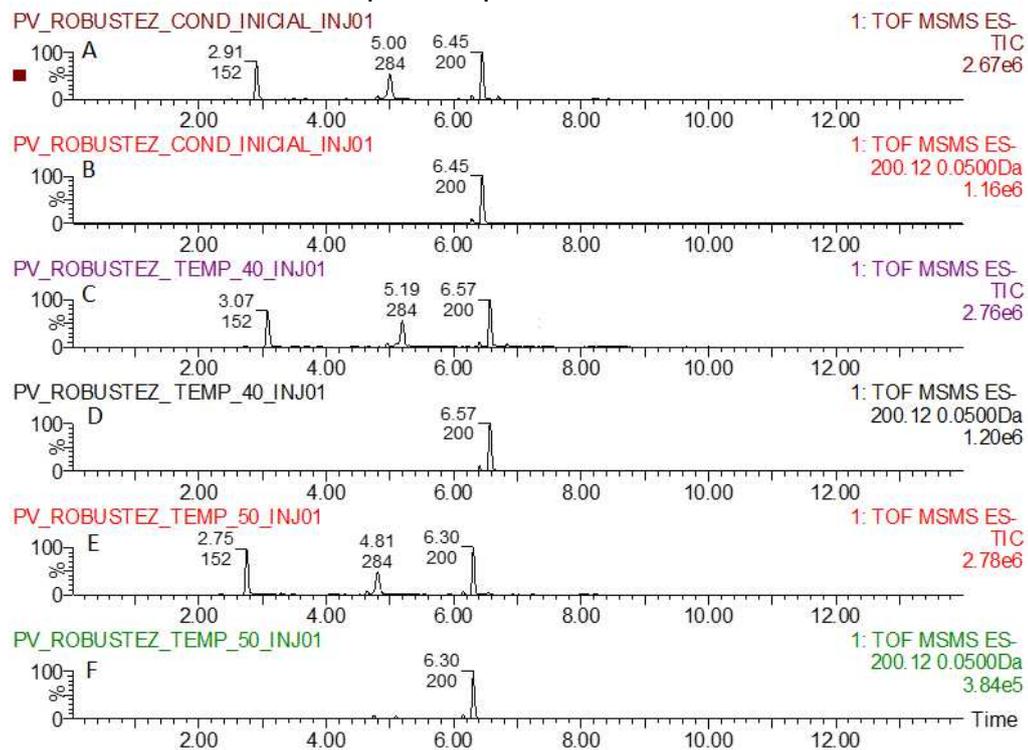
- **Robustez**

A robustez foi avaliada, de forma a determinar se o método desenvolvido resiste a pequenas variações em alguns parâmetros. Como já descrito, foi realizada uma análise inicial, com a qual foram comparados os resultados das variações. A Tabela 6 mostra os resultados dos desvios nas quantificações de artepilina C na amostra com as variações realizadas, a Figura 43 mostra a comparação dos cromatogramas da condição inicial de análise com as análises de variação na temperatura da coluna e a Figura 44 mostra a comparação com as análises de variação de fluxo. Para cada amostra foram mostrados dois cromatogramas, sendo um deles o cromatograma inicial m/z 299 e o outro com a seleção da m/z 299 \rightarrow 200,12.

Tabela 6 – Resultados da robustez de método de quantificação da artepilina C por CLUE-EM-Q-TOF

Condição	Resultado em µg/mL	% Artepilina C em própolis verde	DPR (%) em relação a condição inicial
Condição inicial	271,99	6,80	-
Temperatura da coluna: 40 °C	274,52	6,86	0,65
Temperatura da coluna: 50 °C	277,24	6,93	1,35
Fluxo: 0,3 mL/min	278,79	6,97	1,75
Fluxo: 0,5 mL/min	271,35	6,78	0,17

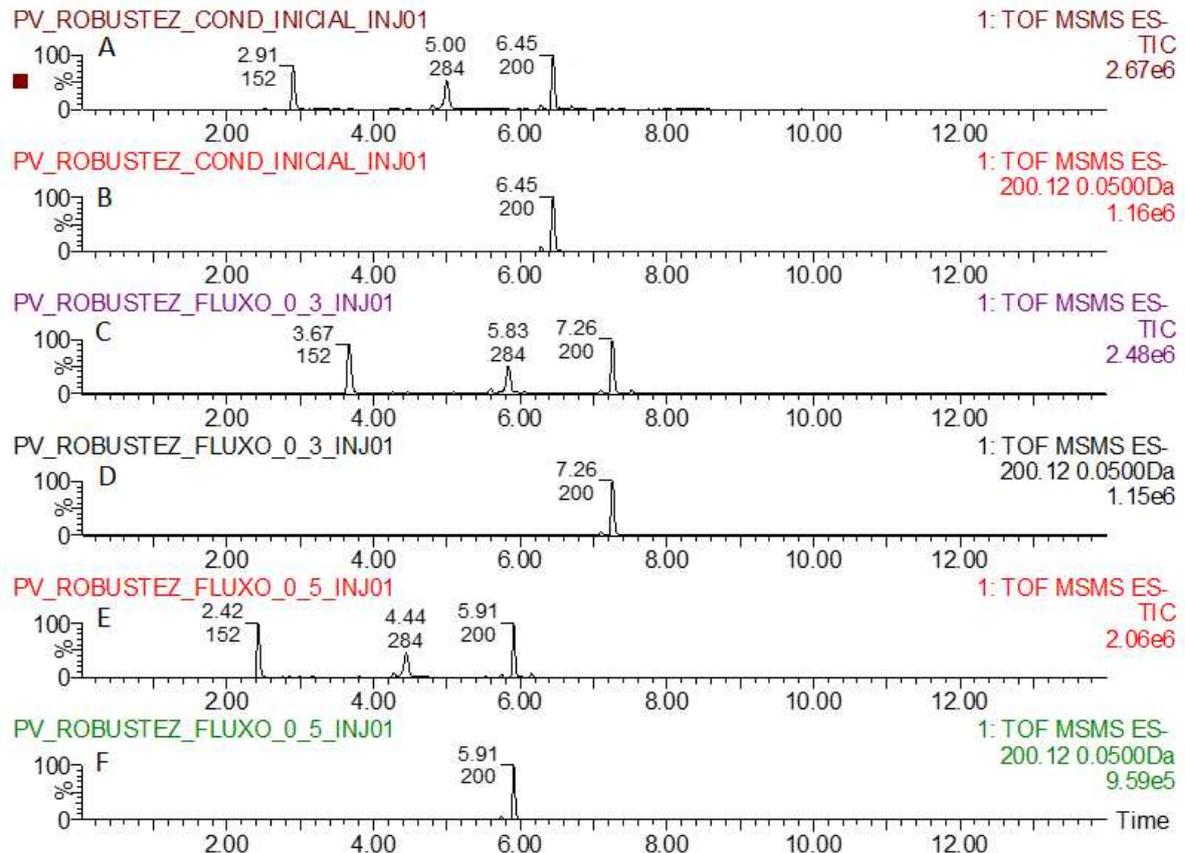
Figura 43 - Cromatogramas de robustez de temperatura do método de quantificação da artepilina C por CLUE-EM-Q-TOF



(A) Condição inicial (45 °C) m/z 299; (B) Condição inicial (45 °C) m/z 299 → 200,12; (C) Alteração de temperatura da coluna para 40 °C m/z 299; (D) Alteração de temperatura da coluna para 40 °C m/z 299 → 200,12; (E) Alteração de temperatura da coluna para 50 °C m/z 299; (F) Alteração de temperatura da coluna para 50 °C m/z 299 → 200,12;

Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

Figura 44 - Cromatogramas de robustez de fluxo do método de quantificação da artepilina C por CLUE-EM-Q-TOF



(A) Condição inicial (0,4 mL/min) m/z 299; (B) Condição inicial (0,4 mL/min) m/z 299 → 200,12; (C) Alteração de fluxo para 0,3 mL/min m/z 299; (D) Alteração de fluxo para 0,3 mL/min m/z 299 → 200,12; (E) Alteração de fluxo para 0,5 mL/min m/z 299; (F) Alteração de fluxo para 0,5 mL/min m/z 299 → 200,12;

Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

Foi possível perceber que, como esperado, ao realizar alterações na temperatura da coluna e no fluxo da fase móvel, ocorreram variações no tempo de retenção da artepilina C (observado nas Figuras 43 e 44), porém sem desvios significativos (<2,0 %, valor de desvio encontrado na precisão por repetibilidade) na quantificação da substância, o que mostrou robustez do método frente a estas variações. Dessa forma, o método foi considerado robusto para as variações avaliadas. Em outros estudos que validaram a quantificação da artepilina C, a robustez do método de quantificação não foi avaliada.

Após avaliação de todos os parâmetros, o método de quantificação da artepilina C por CLUE-EM-Q-TOF foi considerado validado. É importante ressaltar as vantagens desse método em relação aos demais métodos já descritos na literatura para quantificação dessa substância. Todos os métodos descritos utilizaram CLAE, o que

faz com que os volumes de injeção e de fluxo de fase móvel sejam bem maiores do que os utilizados em CLUE. Para todos os métodos em comparação, foram utilizados fluxos de fase móvel de 1,0 mL/min ou mais e volumes de injeção de pelo menos 10 μ L, enquanto no método desenvolvido no presente estudo o fluxo de fase móvel utilizado foi de 0,4 mL/min e volume de injeção de 1 μ L, o que contribui muito para a diminuição no gasto na fase móvel utilizada na análise. Além disso, outros métodos de validação utilizaram detectores DAD, enquanto o presente estudo utilizou detecção por espectrometria de massas, possibilitando seleção de massa específica relacionada a artepilina C e, portanto, eliminando a detecção de várias substâncias interferentes presentes na própolis verde (MATSUDA; ALMEIDA-MURADIAN, 2008; NOBUSHI et al., 2012; SOUSA et al., 2007b; SOUSA et al., 2009).

Ao utilizar CLUE, o tempo de análise diminui e ocorre melhoria na eficiência de separação das substâncias, em relação à CLAE. Além disso, no caso do presente estudo, devido a utilização do detector de espectrometria de massas e seleção de massa específica, foi possível alterar o gradiente de eluição de fase móvel, diminuindo ainda mais o tempo de retenção da artepilina C e conseqüentemente o tempo de análise. Em métodos descritos na literatura que quantificam a artepilina C por CLAE-DAD, os tempos de retenção da substância variaram entre 15 minutos e 54 minutos, sendo bem mais altos que o tempo de retenção encontrado no método desenvolvido no presente estudo, que foi 6,44 minutos, caracterizando mais uma vantagem do método desenvolvido e contribuindo novamente para a diminuição no gasto de fase móvel (MATSUDA; ALMEIDA-MURADIAN, 2008; NOBUSHI et al., 2012; SOUSA et al., 2007b; SOUSA et al., 2009).

Outra característica importante do método desenvolvido, foi o fato de um detector de espectrometria de massas com analisador do tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF) ter sido utilizado com a finalidade de quantificação. Esse tipo de analisador, em geral, é recomendado para análises de identificação de substâncias, sendo que para quantificação o analisador do tipo triplo-quadrupolo geralmente apresenta melhores respostas. Entretanto, atualmente, vários estudos têm mostrado a utilização de equipamentos Q-TOF para quantificação (MORIN, MESS, GAROFOLO, 2013; XIE et al., 2012).

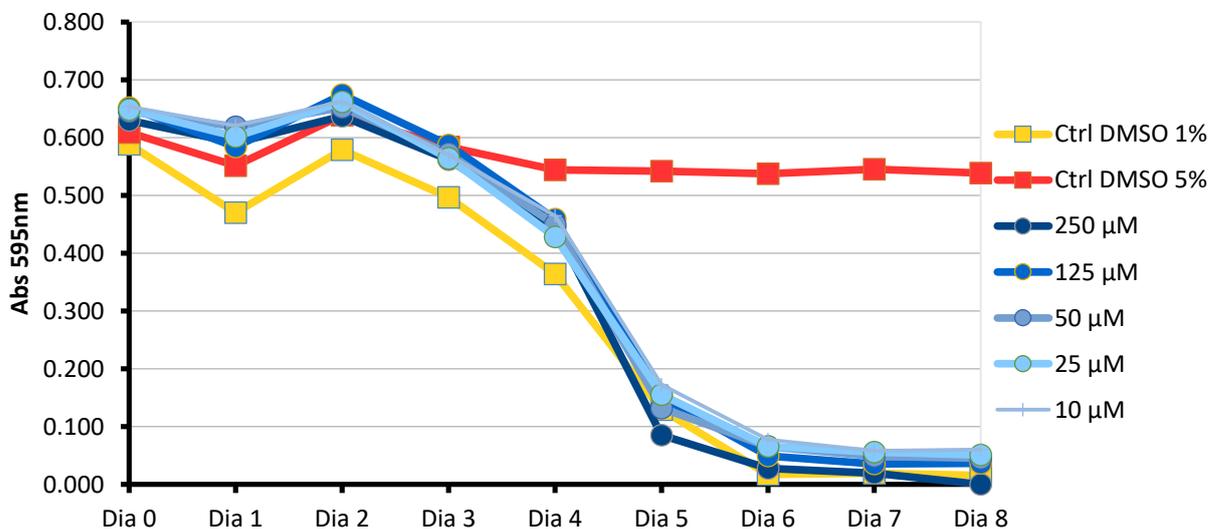
5.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS EM MODELOS ANIMAIS

5.6.1 *Caenorhabditis elegans*

5.6.1.1 Ensaio de toxicidade

O ensaio de toxicidade em *C. elegans* foi baseado no princípio de que esses animais, após eclodirem dos ovos, irão consumir o alimento que é disponibilizado, a bactéria OP50. Sendo assim, quando o composto é tóxico a *C. elegans*, a bactéria não é consumida, sendo mantidas as absorbâncias dos poços em altos níveis. Em contrapartida, quando o composto não é tóxico ao animal, a bactéria é consumida pelo animal, fazendo com que as absorbâncias dos poços diminuam. A bactéria utilizada como alimento dos animais foi inativada, de forma que a substância testada não pudesse exercer influência no alimento do animal (GARCIA et al., 2007; MEYER et al., 2010). A Figura 45 mostra o gráfico dos resultados do ensaio de toxicidade de artepilina C em *C. elegans*, nas concentrações de 250, 125, 50, 25 e μM .

Figura 45 – Toxicidade de artepilina C em *Caenorhabditis elegans*



Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

A partir da análise da Figura 45, foi possível observar que o DMSO 5% atuou como um controle positivo de toxicidade, uma vez que as absorbâncias para este tratamento permanecem em níveis altos, mostrando que o tratamento foi tóxico aos animais, fazendo com que eles não consumissem a bactéria. Já o controle DMSO 1% e a artepilina C (em todas as concentrações testadas) não demonstraram toxicidade

aos animais, já que a partir do quarto dia as absorvâncias começaram a diminuir, indicando que o animal estaria consumindo a bactéria.

Em estudo *in vitro* já citado anteriormente, realizado por Paulino e colaboradores (2008), no qual foi descrita a atividade anti-inflamatória da artepilina C, foram avaliadas células de macrófagos do tipo RAW 264.7 frente ao tratamento com essa substância nas concentrações de 3, 10 e 100 μM , sendo que não ocorreu interferência na viabilidade celular em nenhuma das concentrações avaliadas. Em estudo mais recente, a substância também não interferiu na viabilidade celular de macrófagos nas concentrações de 25, 50 e 100 μM (SZLISZKA et al., 2013). Em estudo relacionado ao efeito imunossupressor da artepilina C utilizando células de sangue periférico (PBMC) e células renais não cancerosas (HK-2) também foi comprovado o efeito não tóxico da substância nas concentrações de 10, 50 e 100 μM (CHEUNG et al., 2011). Esses resultados, realizados em estudos celulares *in vitro*, estão de acordo com o resultado de toxicidade da substância encontrado em *C. elegans*, uma vez que a substância não foi tóxica ao organismo em concentrações variando de 10 a 250 μM .

5.6.1.2 Ensaio de Longevidade

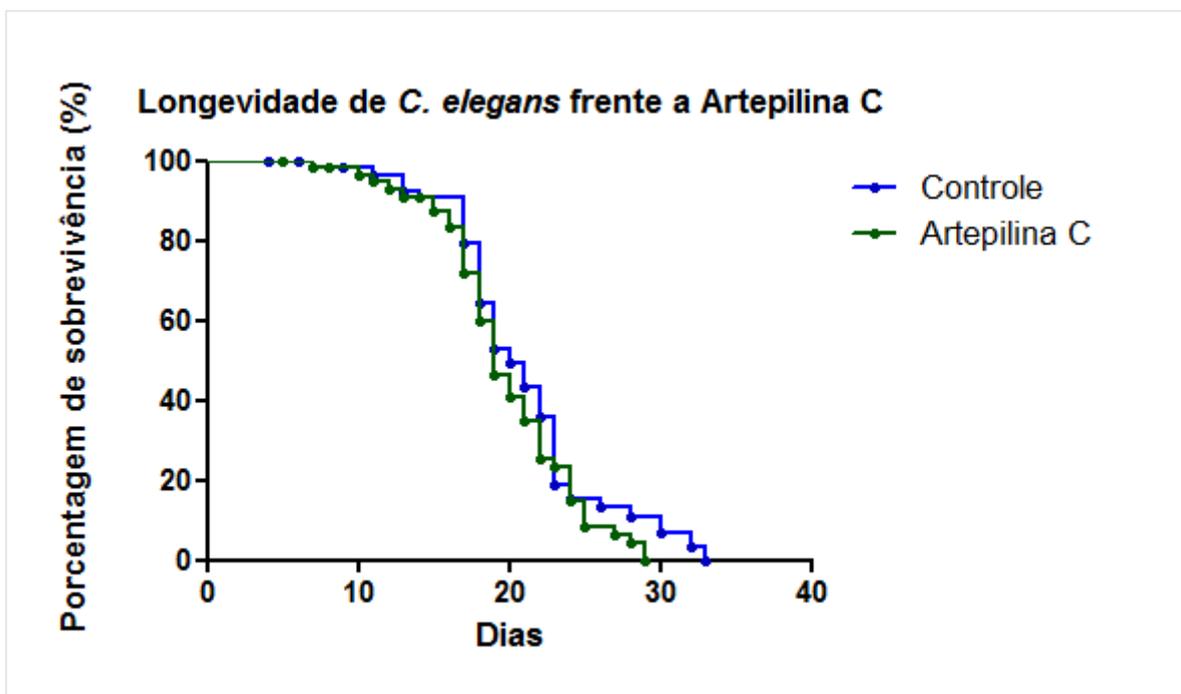
A partir do ensaio de toxicidade em *C. elegans*, foi definida concentração para ensaio de longevidade, a fim de avaliar a atividade antienvelhecimento da substância. Uma vez que nenhuma das concentrações avaliadas mostrou-se tóxica ao animal, optou-se por utilizar uma concentração intermediária entre as avaliadas anteriormente. Essa concentração foi determinada sendo 125 μM . A partir dessa definição, foram preparadas soluções de bactéria OP50 com artepilina C (e DMSO 0,5 %, para auxílio na solubilização da substância) de forma a obter essa concentração final, e essas soluções foram acrescentadas às placas com meio de cultura NGM, onde foram colocados os animais *C. elegans*.

Ao final de 33 dias, foi finalizado o ensaio de longevidade, que teve seus dados analisados no programa GraphPad Prism 5, sendo obtido o gráfico de sobrevivência mostrado a seguir (Figura 46). O tratamento com artepilina C, na concentração avaliada, não foi significativamente diferente em relação ao controle, que consistiu de alimentação normal dos nematoides, com bactéria OP50 (adicionada de 0,5 % de DMSO, quantidade utilizada na solubilização de artepilina C). Esse

resultado poderia sugerir que a artepilina C não apresenta efeito antienvhecimento, na concentração avaliada.

Porém, esse resultado pode ter sido influenciado pela exposição prolongada dos animais ao tratamento com o composto, já que sua toxicidade frente aos animais é um ensaio de período curto. Uma vez que o ensaio de longevidade persistiu por mais de 30 dias, o acúmulo de artepilina C pode ter causado efeito negativo na longevidade dos animais.

Figura 46 – Longevidade de *Caenorhabditis elegans* frente a artepilina C



Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

O modelo animal *C. elegans* tem sido utilizado atualmente para avaliar o efeito antienvhecimento de várias substâncias, que já apresentam indícios dessa atividade. Estudo recente avaliou o efeito de sesquiterpenos isolados das sementes de *Celastrus monospermus* Roxb. no tempo de vida desses nematoides, uma vez que sementes de várias plantas do gênero já foram utilizadas na China e na Índia para melhorar a memória, sendo que óleo essencial de sementes de *Celastrus paniculatum* Willd. era conhecido como “elixir da vida” na Índia. Os resultados mostraram que todos os sesquiterpenos avaliados prolongaram a vida de *C. elegans*, mostrando aumentos de 15 a 38 % (GAO et al., 2016). Carretero, Gomez-Amaro e Petrascheck (2015) realizaram uma revisão de literatura relacionada a classes farmacológicas que

geralmente promovem um aumento no tempo de vida de *C. elegans* e citam muitas substâncias naturais ou extratos vegetais como agentes ativos para essa atividade, como o resveratrol, curcumina, quercetina e extratos de *Ginkgo biloba*, além de sugerirem uma possível relação da atividade antioxidante com esse efeito.

A atividade antioxidante tem sido frequentemente relacionada com a atividade antienvhecimento, uma vez que esse processo está intimamente ligado ao acúmulo de espécies reativas do oxigênio (EROs), que podem levar a danos no DNA, peroxidação lipídica e oxidação de proteínas (GONZÁLEZ, 2009; SU; WINK, 2015). Dessa forma, não é possível descartar que a artemilina C possa ter efeito antienvhecimento positivo, uma vez que vários estudos evidenciam seu efeito antioxidante (IZUTA et al., 2009; SHIMIZU et al., 2004; SZLISZKA et al., 2013).

Além disso, o efeito neuroprotetor da própolis verde já foi descrito em células ganglionares da retina com privação de oxigênio e glicose, apresentando efeito positivo na neuroproteção com provável mecanismo de normalização das expressões de antioxidantes. Neste estudo, realizado por Nakajima e colaboradores (2009), a artemilina C e o ácido cumárico foram apontados como parcialmente responsáveis pelo efeito neuroprotetor, sendo a artemilina C avaliada nas concentrações de 0,1 e 1 μ M, concentrações muito menores que a avaliada na longevidade de *C. elegans* no presente estudo. Em estudo mais recente, Ni e colaboradores (2017) relataram pesquisa em andamento que mostrou melhoria de funções cognitivas de pessoas idosas tratadas com extrato etanólico da própolis verde e mostraram a ação desse extrato na redução de EROs utilizando células de neuroblastoma humano, sugerindo a utilização da própolis verde na prevenção da deficiência cognitiva em doença de *Alzheimer*, uma doença neurodegenerativa intimamente relacionada ao estresse oxidativo e ao processo de envelhecimento. Dessa forma, pode-se sugerir que outras concentrações de artemilina C poderiam mostrar efeito antienvhecimento positivo em modelo *C. elegans*.

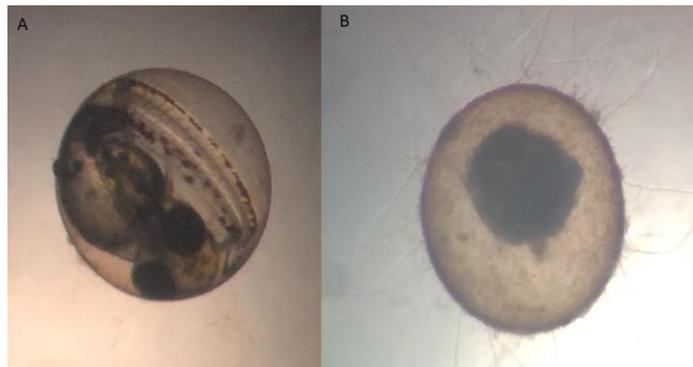
Cabe ressaltar que é a primeira vez que o efeito da artemilina C é avaliado em *C. elegans*. Até o momento, o único estudo encontrado relacionando artemilina C e *C. elegans* investigou os efeitos da deficiência de PAK-1 na reprodução, expressão de um gene específico e vida útil do animal e utilizou a artemilina C como inibidor de PAK-1. PAK-1 está relacionada com transformação maligna, doenças inflamatórias, doenças infecciosas, e doenças/distúrbios neuronais, como a doença de *Alzheimer*. Dessa forma, não foi avaliada diretamente a ação da artemilina C no animal, mas

somente usada como inibidor da PAK-1, que era o foco do estudo (YANASE; LUO; MARUTA, 2013).

5.6.2 Zebrafish

Em relação ao ensaio de toxicidade da artepilina C em embriões de Zebrafish, inicialmente foi avaliada a porcentagem de embriões vivos (% de sobrevivência) após a exposição à substância, ao longo do tempo de desenvolvimento. A Figura 47 mostra dois embriões de Zebrafish, visualizados em microscópio 48 horas pós fertilização (hpf), sendo um deles vivo e um deles morto. A Tabela 7 mostra os resultados para as primeiras 48hpf, para os controles (água e DMSO a 0,1 %) e para todas as concentrações de artepilina C testadas. A análise estatística foi realizada pelo teste Tukey.

Figura 47 – Embriões de Zebrafish, visualizados em microscópio 48hpf



(A) Embrião de Zebrafish 48hpf vivo normal; (B) Embrião de Zebrafish 48hpf morto. Aumento de 4x.
Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

Tabela 7 – Porcentagem (%) de embriões vivos após a exposição a artepilina C, ao longo do tempo de desenvolvimento

Concentração	0h	24h*	48h*
0 (H ₂ O)	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a
0 (DMSO 0,1 %)	100.00 ^a	89.47 ^b	84.21 ^b
10 µM	100.00 ^a	94.74 ^b	84.21 ^b
50 µM	100.00 ^a	0.00 ^c	0.00 ^c
125 µM	100.00 ^a	0.00 ^c	0.00 ^c
250 µM	100.00 ^a	0.00 ^c	0.00 ^c

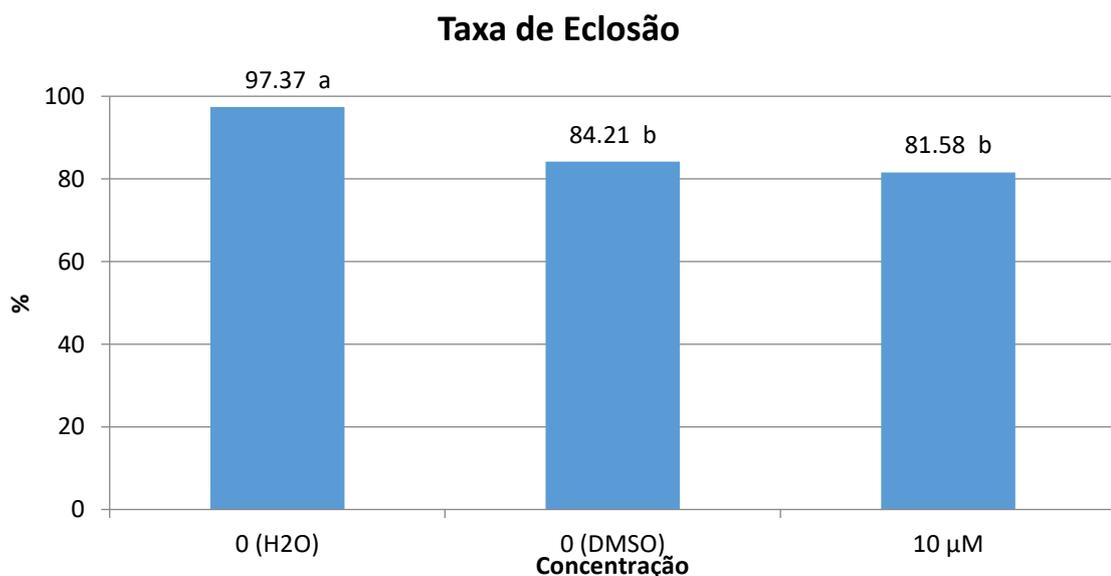
a,b, c – diferem entre si nas colunas pelo teste de Tukey ; * Diferem entre os tempos pelo teste de Tukey.

Foi possível perceber que no tratamento controle com água, todos os embriões permaneceram vivos nas primeiras 48hpf. No tratamento controle com 0,1 % de

DMSO (porcentagem de DMSO presente em todas as concentrações de artepilina C), ocorreu pequena queda na taxa de sobrevivência dos embriões a partir das primeiras 24hpf (estatisticamente diferente do grupo controle, utilizando água) e esse tratamento foi estatisticamente igual ao tratamento com artepilina C a 10 μ M. Isso significa que a artepilina C (10 μ M) não foi capaz de promover queda na porcentagem de sobrevivência dos embriões de Zebrafish. Porém, todas as demais concentrações utilizadas de artepilina C (50, 125 e 250 μ M), apresentaram letalidade aos embriões, levando estes a taxa de 0,00 % de sobrevivência já nas primeiras 24hpf. Entre os tempos de 24 e 48hpf, não houve diferença significativa.

Além da % de sobrevivência, foi avaliada a taxa de eclosão dos embriões vivos, e este resultado está demonstrado na Figura 48, na qual é possível observar, novamente, a diferença estatística entre o tratamento controle com água (taxa de eclosão de 97,37 %) e o tratamento controle com 0,1 % de DMSO (taxa de eclosão de 84,21 %). Novamente, o controle com DMSO foi estatisticamente igual ao tratamento com artepilina C na concentração de 10 μ M (taxa de eclosão de 81,58 %) e as demais concentrações de artepilina C, tiveram taxas de eclosão de 0,00 %, já que foram letais para o embrião. A Figura 49 mostra um embrião de Zebrafish eclodido 48hpf, sem alterações morfológicas.

Figura 48 – Taxa de eclosão de embriões de Zebrafish frente ao tratamento com artepilina C



a, b, c – diferem entre si pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

Figura 49 – Zebrafish eclodido vivo 48hpf

Aumento de 4x.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

Após essa avaliação, as larvas eclodidas foram avaliadas nas próximas horas (72, 96 e 120 hpf). A Tabela 8 mostra a % de larvas vivas, após a exposição a artepilina C, ao longo do tempo de desenvolvimento. Nesta tabela estão mostrados apenas os controles (água e 0,1 % de DMSO) e a artepilina C na concentração de 10 μ M, já que as demais concentrações testadas foram letais para o Zebrafish já na fase de embriões, não sendo obtidas larvas para estes tratamentos.

Tabela 8 – Porcentagem (%) de larvas de Zebrafish vivas, após a exposição a artepilina C, ao longo do tempo de desenvolvimento

Concentração	72h	96h	120h
0 (H ₂ O)	94.74 ^a	94.74 ^a	94.74 ^a
0 (DMSO 0,1 %)	84.21 ^b	84.21 ^b	84.21 ^b
10	84.21 ^b	84.21 ^b	84.21 ^b

a, b – letras diferem entre si nas colunas pelo teste de Tukey.

Foi possível observar, novamente, que apenas houve diferença significativa entre o controle com água e o controle com 0,1 % de DMSO, sendo que este último foi estatisticamente igual ao tratamento com artepilina C a 10 μ M, sendo observada uma taxa de sobrevivência das larvas superior a 84 %.

Além da % de sobrevivência das larvas, foram avaliadas alterações morfológicas relacionadas a possíveis efeitos teratogênicos da substância. Essa avaliação está mostrada na Tabela 9.

Tabela 9 – Porcentagem (%) de alterações morfológicas nas larvas de Zebrafish, após exposição a artepilina C, ao longo do tempo de desenvolvimento

Concentração	Lordose			Calda quebrada		
	72h	96h	120h	72h	96h	120h
0 (H ₂ O)	0.00	0.00	5.26	0.00	0.00	0.00
0 (DMSO 0,1 %)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	5.26	0.00	0.00	0.00	0.00

Não foi observada diferença estatística significativa para os parâmetros de defeitos das larvas. Isso indica que, os tratamentos utilizados, em que não ocorreu letalidade dos embriões e nos quais foram obtidas taxas significativas de sobrevivência de larvas, não promoveram alterações morfológicas significativas a estas.

As concentrações de artepilina C testadas nos embriões de Zebrafish foram as mesmas testadas na toxicidade em *C. elegans* e, embora nenhuma delas tenha sido tóxica para os nematoides, apenas a menor concentração (10 µM) não apresentou toxicidade aos embriões de Zebrafish. Esse resultado pode ter sido influenciado pela própria sensibilidade do animal, uma vez que no caso de Zebrafish, o ensaio de toxicidade faz uma correlação com estágios iniciais do desenvolvimento embrionário. Essa maior sensibilidade pode ser notada pelo próprio controle com DMSO, já que em *C. elegans* a concentração de 1 % não é tóxica aos animais e, em contrapartida, não é recomendada em ensaios com embriões de Zebrafish. Para este ensaio, a concentração recomendada de DMSO é de no máximo 0,01 %, sendo que concentrações maiores que 0,1 % poderia ocorrer influência na disponibilidade da substância dentro do embrião (KAIS et al., 2013). No ensaio realizado, a concentração de DMSO utilizada foi 0,1 %, para facilitar a solubilização da artepilina C e por isso foi realizado um controle com solução de DMSO a 0,1 %.

Conforme descrito por Carrão e colaboradores (2017), existem patentes relacionadas às atividades biológicas da artepilina C referentes a sua atividade antitumoral e como agente de controle de apoptose. Diante da possível utilização da substância como medicamento, é importante a realização de ensaios que possam comprovar a segurança de sua utilização. O modelo animal Zebrafish tem sido cada dia mais utilizado com essa finalidade e apresenta muitas vantagens em relação aos modelos tradicionais de toxicologia que utilizam mamíferos, principalmente quando se

trata dos estágios iniciais da vida humana, devido a transparência dos embriões e desenvolvimento fora da mãe (HE et al., 2014).

Crawford, Esguerra e Witte (2008) realizaram uma revisão a respeito da pesquisa de substâncias utilizando Zebrafish. Nessa revisão, foram relatadas pesquisas que utilizaram embriões de Zebrafish para determinar a embriotoxicidade ou a teratogenicidade de produtos naturais consumidos por seres humanos, incluindo flavonoides, Δ -9-tetrahydrocannabinol (o principal constituinte psicoativo da maconha) e arecolina (o principal alcaloide encontrado em nozes de areca).

Não existem estudos na literatura referentes à toxicidade da artemisina C em estágios iniciais do desenvolvimento humano e os resultados encontrados no presente estudo sugerem a necessidade de estudos mais aprofundados relacionados a esse assunto. Além disso, a concentração ideal da substância a ser utilizada para possíveis tratamentos deve ser estudada, uma vez que concentrações que não haviam apresentado toxicidade em estudos celulares *in vitro* anteriores e que não apresentaram toxicidade em nematoides *C. elegans*, mostraram sugestiva embriotoxicidade, quando avaliadas em embriões de Zebrafish.

6 CONCLUSÃO

No presente trabalho, a artepilina C foi isolada de amostras de própolis verde por meio de extração ácido-base e posterior purificação em CLAE semipreparativa. Esta metodologia foi realizada com sucesso e demonstrou eficiência na obtenção de padrão com elevado grau de pureza.

A artepilina C obtida foi utilizada como padrão para desenvolvimento e validação de metodologia de quantificação da artepilina C por CLUE-EM-Q-TOF. A metodologia se mostrou específica, linear, precisa e exata, além de robusta nas condições avaliadas. Esta técnica apresentou inúmeras vantagens em relação às previamente utilizadas, como diminuição no tempo de análise e seletividade da substância de interesse.

Os estudos de toxicidade e longevidade frente a *C. elegans* demonstraram que a artepilina C não possui toxicidade a este nematoide nas concentrações de 250, 125, 50, 25 e 10 μM . Quanto à longevidade e potencial atividade antienvhecimento da substância, não foi observado aumento no tempo de vida dos nematoides quando a artepilina C foi avaliada na concentração de 125 μM , apesar da atividade antioxidante previamente relatada.

Já os estudos de toxicidade em embriões de Zebrafish sugerem possível embriotoxicidade da artepilina C quando utilizada nas concentrações de 250, 125 e 50 μM . Tendo em vista a importância medicinal e comercial da própolis verde e o fato da artepilina C ser a principal substância encontrada nesta própolis, bem como o potencial da substância como fármaco, os dados descritos neste trabalho reforçam a necessidade de realização de estudos adicionais de embriotoxicidade *in vivo* com essas amostras.

REFERÊNCIAS

ABAD, M. J.; BERMEJO, P. *Baccharis* (Compositae): a review update. **Archive for Organic Chemistry**, v, 7, p. 76-96, 2007.

AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M.; NAKAJIMA, S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in brazilian propolis. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, n. 5, p. 945-946, 1994.

AZEVEDO, J. C. S. **Características bioativas, funcionais e efeito protetor do resíduo desidratado de camu-camu (*Myrciaria dubia* H. B. K. (McVaugh)) sobre doenças degenerativas utilizando modelos *in vivo* *C. elegans***. 2015. 127 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

BARTH, O. M.; FREITAS, A. S.; MATSUDA, A. H.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Botanical origin and Artepillin-C content of brazilian propolis samples. **Grana**, v. 52, n. 2, p. 129-135, 2013.

BEI, D.; AN, G. Quantification of 5,7-dimethoxyflavone in mouse plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and its application to a pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**, v. 978, p. 11-17, 2015.

BERRETA, A. A.; ARRUDA, C.; MIGUEL, F. G.; BAPTISTA, N.; NASCIMENTO, A. P.; MARQUELE-OLIVEIRA, F.; HORI, J. I.; BARUD, H. S.; DAMASO, B.; RAMOS, C.; FERREIRA, R.; BASTOS, J. K. Functional properties of brazilian propolis: from chemical composition until the Market. **Superfood and functional food – an overview of their processing and utilization**, p. 55-98, 2017.

BRASIL. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Brasília, DF, 23 jan. 2001. Seção 1, p. 18-23.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**, Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL, Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 24, de 14 de junho de 2011. **Dispõe sobre o registro de medicamentos específicos**, 2011.

BRASIL, Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n° 166, de 24 de julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências**, 2017.

BRASIL, Resolução RE. 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos**, 2003.

BUGEL, S. M.; TANGUAY, R. L.; PLANCHART, A. Zebrafish: a marvel of high-throughput biology for 21st century toxicology. **Current Environmental Health Reports**, v. 1, p. 341-352, 2014.

CANTU, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 669-675, 2008.

CARRÃO, D. B. **Estudo de metabolismo in vitro do componente majoritário da própolis verde brasileira, artepelin C, empregando microsomas hepáticos**. 2015. 118 f. Dissertação (mestrado em ciências), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

CARRÃO, D. B.; DE ALBUQUERQUE, N. C. P.; MARQUES, L. M. M.; CROTTI, A. E. M.; PILON, A. C.; BOLZANI, V. D. S.; BERRETA, A. A.; DE OLIVEIRA, A. R. M. *In vitro* metabolismo of artemisinin C by rat and human liver microsomes. **Planta Medica**, v. 83, n. 8, p. 737-745, 2017.

CARRETERO, M.; GOMEZ-AMARO, R. L.; PETRASCHECK, M. Pharmacological classes that extend lifespan of *Caenorhabditis elegans*. **Frontiers in Genetics**, v. 6, p. 1-6, 2015.

CARVALHO, A. A.; FINGER, D.; MACHADO, C. S.; SCHMIDT, E. M.; DA COSTA, P. M.; ALVES, A. P. N. N.; MORAIS, T. M. F.; QUEIROZ, M. G. R.; QUINAIA, S. P.; ROSA, M. R.; DOS SANTOS, J. M. T.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N.; TORRES, Y. R. *In vivo* antitumoral activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1239-1245, 2011.

CHAN, G. C.-F.; CHEUNG, K.-W.; SZE, D. M.-Y. The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 44, p. 262-273, 2013.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de

massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CHEMICALIZE. **[Sem título]**. Disponível em:
<<https://chemicalize.com/#/calculation>>. Acesso em: 16 jan. 2017.

CHEUNG, K.-W.; SZE, D. M.-Y.; CHAN, W. K.; DENG, R.-X.; TU, W.; CHAN, G. C.-F. Brazilian green propolis and its constituent, Artepillin C inhibits allogeneic activated human CD4T cells expansion and activation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.138, p. 463-471, 2011.

CRAWFORD, A. D.; ESGUERRA, C. V.; WITTE, P. A. M. Fishing for drugs from nature: Zebrafish as a technology platform for natural product discovery. **Planta Médica**, v. 74, p. 624-632, 2008.

CORREA, W. R.; LÓPEZ, B. G.-C.; DO PRADO, S. C.; CUNHA, I. B. S.; SAWAYA, A. C. H. F.; SALVADOR, M. J. ESI-MS fingerprinting of residues of green propolis, and evaluation of their antioxidante and antimicrobial activities. **Journal of Apicultural Research**, v. 55, n. 1, p. 1-7, 2016.

CORSI, A. K.; WIGHTMAN, B.; CHALFIE, M. A transparente window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 200, n. 2, p. 387-407, 2015.

DA SILVA FILHO, A. A.; BUENO, P. C. P.; GREGÓRIO, L. E.; SILVA, M. L. A.; ALBUQUERQUE, S.; BASTOS, J. K. *In-vitro* trypanocidal activity evaluation of crude extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 9, p. 1195-1199, 2004.

DA SILVA FILHO, A. A.; Fitoquímica da *Baccharis dracunculifolia*. In: SFORCIN, J. M.; SOUSA, J. P. B.; DA SILVA FILHO, A. A.; BASTOS, J. K.; BÚFALO, M. C.; TONUCCI, L. R. S. ***Baccharis dracunculifolia***: Uma das principais fontes vegetais da própolis brasileira. São Paulo: Editora Unesp, 2012.

DE OLIVEIRA, P. F.; LIMA, I. M. S.; MONTEIRO NETO, M. A. B.; BASTOS, J. K.; DA SILVA FILHO, A. A.; TAVARES, D. C. Evaluation of genotoxicity and antigenotoxicity of artepillin C in V79 cells by the comet and micronucleus assays. **Nutrition and Cancer**, v. 65, n. 7, p. 1098-1103, 2013.

DE OLIVEIRA, P. F.; LIMA, I. M. S.; MUNARI, C. C.; BASTOS, J. K.; DA SILVA FILHO, A. A.; TAVARES, D. C. Comparative evaluation of anti-proliferative effects of

brazilian green propolis, its main source *Baccharis dracunculifolia*, and their major constituents artepillin C and baccharin. **Planta Medica**, v. 80, n. 6, p. 490-492, 2014.

FDA (Food and Drug Administration) – **Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics: Guidance for Industry**. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), 2015.

FÉLIX, M.-A.; BRAENDLE, C. The natural history of *Caenorhabditis elegans*. **Current Biology**, v. 20, n. 22, p. 965-969, 2010.

FERNANDES-SILVA, C. C.; SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; BREYER, E. D. H.; NEGRI, G. Chemical profiling of six samples of brazilian propolis. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 237-240, 2013.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 171-178, 2006.

GAJBHIYE, N. A.; MAKASANA, J.; DHANANI, T.; SARAVANAN, R. Development and validation of LC-ESI-MS/MS methods for simultaneous determination of four coumarin derivatives and an alkaloid from root and stem bark of *Aegle marmelos* Correa. **Acta Chromatographica**, v. 28, p. 473-488, 2016.

GAO, L.; ZHANG, R.; LAN, J.; NING, R.; WU, D.; CHEN, D.; ZHAO, W. β -dihydroagarofuran-type sesquiterpenes from the seeds of *Celastrus monospermus* and their lifespan-extending effects on the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 12, p. 3039-3046, 2016.

GARCIA, S. M.; CASANUEVA, M. O.; SILVA, M. C.; AMARAL, M. D.; MORIMOTO, R. I. Neuronal signaling modulates protein homeostasis in *Caenorhabditis elegans* post-synaptic muscle cells. **Genes & Development**, v. 21, p. 3006-3016, 2007.

GARDANA, C.; SCAGLIANTI, M.; PIETTA, P.; SIMONETTI, P. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 390-399, 2007.

GONZÁLEZ, J. P.; FARNES, O. C.; VASCONCELOS, A. T. R.; PÉREZ, A. G. Conservation of key members in the course of the evolution of the insulin signaling pathway. **Biosystems**, v. 95, n. 1, p. 7-16, 2009.

GOSETTI, F.; MAZZUCCO, E.; ZAMPIERI, D.; GENNARO, M. C. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3929-3937, 2010.

HE, J.-H.; GAO, J.-M.; HUANG, C.-J.; LI, C.-Q. Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 42, p. 35-42, 2014.

HEIMBERGER, J.; CADE, H. C.; PADGETT, J.; SITTARAMANE, V.; SHAIKH, A. Total synthesis of Herbarin A and B, determination of their antioxidant properties and toxicity in zebrafish embryo model. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, p. 1192-1195, 2015.

HERNÁNDEZ, Y. L.; YERO, D.; PINOS-RODRIGUEZ, J. M.; GIBERT, I. Animals devoid of pulmonar system as infection models in the study of lung bacterial pathogens. **Frontier in Microbiology**, v. 6, p. 1-19, 2015.

HOCAYEN, P. A. S.; GRASSIOLLI, S.; LEITE, N. C.; POCHAPSKI, M. T.; PEREIRA, R. A.; SILVA, L. A.; SNACK, A. L.; MICHEL, R. G.; KAGIMURA, F. Y.; CUNHA, M. A. A.; MALFATTI, C. R. M. *Baccharis dracunculifolia* metanol extract enhances glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic islets of monosodium glutamate induced-obesity model rats. **Pharmaceutical Biology**, p. 1-9, 2015.

ICH (International Conference on Harmonization of Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use), ICH Harmonized Tripartite Guideline. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)**, 2005.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial); **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos – DOQ-CGCRE-008, Revisão 04 – Julho, 2011.**

IZUTA, H.; NARAHARA, Y.; SHIMAZAWA, M.; MISHIMA, S.; KONDO, S.; HARA, H. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity of bee products and their constituents determined by ESR. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 12, p. 1947-1951, 2009.

JORGE, R.; FURTADO, N. A. J. C.; SOUSA, J. P. B.; DA SILVA FILHO, A. A.; GREGÓRIO JUNIOR, L. E.; MARTINS, C. H. G.; SOARES, A. E. E.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A. Brazilian propolis: seasonal variation of the prenylated p-coumaric acids and antimicrobial activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 12, p. 889-893, 2008.

KAIS, B.; SCHNEIDER, K. E.; KEITER, S.; HENN, K.; ACKERMANN, C.; BRAUNBECK, T. DMSO modifies the permeability of the zebrafish (*Danio rerio*) chorion-implications for the fish embryo test (FET). **Aquatic Toxicology**, v. 140, p. 229-238, 2013.

KALETTA, T.; HENGARTNET, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 5, p. 387-399, 2006.

KAMPKÖTTER, A.; PIELARSKI, T.; ROHRIG, R.; TIMPEL, C.; CHOVOLOU, Y.; WÄTJEN, W.; KAHL, R. The Ginkgo biloba extract EGb761 reduces stress sensitivity, ROS accumulation and expression of catalase and glutathione S-transferase 4 in *Caenorhabditis elegans*. **Pharmacological Research**, v. 55, p. 139-147, 2007.

KAMPKÖTTER, A.; TIMPEL, C.; ZURAWSKI, R. F.; RUHL, S.; CHOVOLOU, Y.; PROKSCH, P.; WÄTJEN, W. Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetina. **CBP - Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 149, p. 314-323, 2008.

KUMAZAWA, S.; YONEDA, M.; SHIBATA, I.; KANAEDA, J.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Direct evidence for the plant origin of brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 6, p. 740-742, 2003.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente "compatíveis"? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LEE, H. Pharmaceutical application of liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS). **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, p. 1161-1202, 2005.

LEE, J. H.; CHOI, J. Y.; PARK, H.; YOON, C.-Y.; PARK, S.-K.; BAEK, S. Y.; CHO, S. Development and validation of Q-TOF/MS method for the rapid and simultaneous quantification of three aconitum alkaloids in food. **Analytical Methods**, v. 7, p. 7733-7740, 2015.

LEITÃO, D. P. S.; DA SILVA FILHO, A. A.; POLIZELO, A. C. M.; BASTOS, J. K.; SPADARO, A. C. C. Comparative evaluation of *in-vitro* effects of brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of

Streptococcus mutans. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 11, p. 1834-1839, 2004.

LI, S.; SHEN, C.; GUO, W.; ZHANG, X.; LIU, S.; LIANG, F.; XU, Z.; PEI, Z.; SONG, H.; QIU, L.; LIN, Y.; PAN, J. Synthesis and neuroprotective action of xyloketal derivatives in Parkinson's disease models. **Marine drugs**, v. 11, p. 5159-5189, 2013.

LIMA, J. J. F. As plantas na história da dor. **Revista da Sociedade Portuguesa de Anestesiologia**, v. 22, n. 4, p. 126-133, 2013.

LU, Z.-G.; LI, M.-H.; WANG, J.-S.; WEI, D.-D.; LIU, Q.-W.; KONG, L.-Y. Developmental toxicity and neurotoxicity of two matrine-type alkaloids, matrine and sophocarpine, in zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae. **Reproductive Toxicology**, v. 47, p. 33-41, 2014.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; NETO, P. J. R. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 447-454, 2008.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 197-207, 2012.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v. 19, n. 5, p. 529-536, 1996.

MARQUIAFÁVEL, F. S.; NASCIMENTO, A. P.; BARUD, H. S.; MARQUELE-OLIVEIRA, F.; FREITAS, L. A. P.; BASTOS, J. K.; BERRETTA, A. A. Development and characterization of a novel standardized propolis dry extract obtained by factorial design with high artepillin C content. **Journal of Pharmaceutical Technology & Drug Research**, v. 4, n. 1, p. 1-13, 2015.

MATSUDA, A. H.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Validated method for the quantification of artepillin C in brazilian propolis. **Phytochemical Analysis**, v. 19, p. 179-183, 2008.

MELO, A. A. M.; MATSUDA, A. H.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Identidade e qualidade da própolis proveniente de quatro regiões do Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 540-548, 2012.

MEYER, J. N.; LORD, C. A.; YANG, X. Y.; TURNER, E. A.; BADIREDDY, A. R.; MARINAKOS, S. M.; CHILKOTI, A.; WIESNER, M. R.; AUFFAN, M. Intracellular uptake and associated toxicity of silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. **Aquatic Toxicology**, v. 100, p. 140-150, 2010.

MONTEIRO NETO, M. A. B.; LIMA, I. M. S.; FURTADO, R. A.; BASTOS, J. K.; DA SILVA FILHO, A. A.; TAVARES, D. C. Antigenotoxicity of artemillin C *in vivo* evaluated by the micronucleus and comet assays. **Journal of Applied Toxicology**, v. 31, p. 714-719, 2011.

MORIN, L.-P.; MESS, J.-N.; GAROFOLO, F. Large-molecule quantification: sensitivity and selectivity head-to-head comparison of triple quadrupole with Q-TOF. **Bioanalysis**, v. 5, n. 10, p. 1181-1193, 2013.

NAKAJIMAM, Y.; SHIMAZAWA, M.; MISHIMA, S.; HARA, H. Neuroprotective effects of brazilian green propolis and its main constituents against oxygen-glucose deprivation stress, with a gene-expression analysis. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 1431-1438, 2009.

NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R.; MORAIS, S. A. L.; PILÓ-VELOSO, D.; REIS, D. C. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-Campo (*Baccharis dracunculifolia*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 379-386, 2008.

NI, J.; WU, Z.; MENG, J.; ZHU, A.; ZHONG, X.; WU, S.; NAKANISHI, H. The neuroprotective effects of Brazilian green propolis on neurodegenerative damage in human neuronal SH-SY5Y cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1-13, 2017.

NOBUSHI, Y.; OIKAWA, N.; OKAZAKI, Y.; TSUTSUMI, S.; PARK, Y. K.; KUROKAWA, M.; YASUKAWA, K. Determination of artemillin C in brazilian propolis by HPLC with photodiode array detector. **Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences**, v. 2, p. 127-131, 2012.

OECD (Organization for economic cooperation and development) - OECD Guidelines for the testing of chemicals, **Fish embryo acute toxicity (FET) test**, Guideline 236, 2013.

OLIVEIRA, V. B.; YAMADA, L. T.; FAGG, C. W.; BRANDÃO, M. G. L. Native foods from brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, p. 170-179, 2012.

ODA, H.; NAKAGAWA, T.; MARUYAMA, K.; DONO, Y.; KATSURAGI, H.; SATO, S. Effect of brazilian green propolis on oral pathogens and human periodontal fibroblasts. **Journal of Oral Biosciences**, v. 58, n. 2, p. 50-54, 2016.

ORTEGA, N.; ROMERO, M.-P.; MACIÀ, A.; REGUANT, J.; ANGLÈS, N.; MORELLÓ, J.-R.; MOTILVA, M.-J. Comparative study of UPLC-MS/MS and HPLC-MS/MS to determine procyanidins and alkaloids in cocoa samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 298-305, 2010.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; MOURA, F. F. Evaluation of brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybee Science**, v. 21, p. 85-90, 2000.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2502-2506, 2002.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; AGUIAR, C. L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 997-1003, 2002.

PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1100-1103, 2004.

PAULA, J. T.; AGUIAR, A. C.; SOUSA, I. M. O. MAGALHÃES, P. M.; FOGGIO, M. A.; CABRAL, F. A. Scale-up study of supercritical fluid extraction process for *Baccharis dracunculifolia*. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 219-225, 2016.

PAULINO, N.; ABREU, S. R. L.; UTO, Y.; KOYAMA, D.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; DIRSCH, V. M.; VOLLMAR, A. M.; SCREMIN, A.; BRETZ, W. A. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, v. 58, p. 296-301, 2008.

PAULINO, N.; BARBOSA, A. P.; PAULINO, A.; S.; MARCUCCI, M. C. Hepatoprotective effect of green propolis is related with antioxidante action *in vivo*

and *in vitro*. **Oxidants and Antioxidants in Medical Science**, v. 3, n. 1, p. 43-50, 2014.

PEDRAZZI, V.; LEITE, M. F.; TAVARES, R. C.; SATO, S.; NASCIMENTO, G. C.; ISSA, J. P. M. Herbal mouthwash containing extracts of *Baccharis dracunculifolia* as agente for the control of biofilm: clinical evaluation in humans. **The Scientific World Journal**, 2015.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO NETO, F. R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

PEREIRA, C. A.; COSTA, A. C. B. P.; LIPORONI, P. C. S.; REGO, M. A.; JORGE, A. O. C. Antibacterial activity of *Baccharis dracunculifolia* in planktonic cultures and biofilms of *Streptococcus mutans*. **Journal of Infection and Public Health**, v. 9, n. 3, p. 324-330, 2016.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

RESENDE, F. A.; MUNARI, C. C.; MONTEIRO NETO, M. A. B.; TAVARES, D. C.; BASTOS, J. K.; DA SILVA FILHO, A. A.; VARANDA, E. A. Comparative studies of the (anti) mutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* and artemisinin C by the bacterial reverse mutation test. **Molecules**, v. 17, p. 2335-2350, 2012.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIGHI, A. A. **Extratos brutos e constituintes de própolis brasileiras: avaliação dos efeitos nos carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus microplus* e *Amblyomma cajennense***. 2013. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

RODRIGUEZ-ALLER, M.; GURNY, R.; VEUTHEY, J.-L.; GUILLARME, D. Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: constraints and possible applications. **Journal of chromatography A.**, v. 1292, p. 2-18, 2013.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005.

SAWAYA, A. C. H. F. **Análise da composição química de própolis brasileira por espectrometria de massas**. 2006. 103 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

SCHNEIDER, A. C. R.; DOS SANTOS, J. L.; PORAWSKI, M.; SCHAEFER, P. G.; MAURER, R. L.; MATTE, U.; SILVEIRA, T. R. Implementação de um novo modelo de experimentação animal – *Zebrafish*. **Revista HCPA**, v. 29, p. 100-103, 2009.

SFORCIN, J. M.; SOUSA, J. P. B.; DA SILVA FILHO, A. A.; BASTOS, J. K.; BÚFALO, M. C.; TONUCCI, L. R. S. **Baccharis dracunculifolia**: Uma das principais fontes vegetais da própolis brasileira. São Paulo: Editora Unesp, 2012.

SHIMIZU, K.; ASHIDA, H.; MATSUURA, Y.; KANAZAWA, K. Antioxidative bioavailability of artemisinin in brazilian propolis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 424, p. 181-188, 2004.

SHRIVASTAVA, A.; GUPTA, V. B. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. **Chronicles of young scientists**, v. 2, n. 1, p. 21- 25, 2011.

SILVEIRA, T. R.; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. *Zebrafish*: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 2, p. 4-5, 2012.

SOUSA, J. P. B.; FURTADO, N. A. J. C.; JORGE, R.; SOARES, A. E. E.; BASTOS, J. K. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 85-93, 2007a.

SOUSA, J. P. B.; BUENO, P. C. P.; GREGÓRIO, L. E.; DA SILVA FILHO, A. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SOUSA, M. L.; BASTOS, J. K. A reliable quantitative method for the analysis of phenolic compounds in brazilian propolis by reverse phase high performance liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 2656-2665, 2007b.

SOUSA, J. P. B.; DA SILVA FILHO, A. A.; BUENO, P. C. P.; GREGORIO, L. E.; FURTADO, N. A. J. C.; JORGE, R. F.; BASTOS, J. K. A validated reverse-phase HPLC analytical method for the quantification of phenolic compounds in *Baccharis dracunculifolia*. **Phytochemical Analysis**, v. 20, p. 24-32, 2009.

SOUZA, R. M.; SOUZA, M. C.; PATITUCCI, M. L.; SILVA, J. F. M. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities and characterization of bioactive components of two brazilian propolis samples using a pK_a-guided fractionation. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 62, p. 801-807, 2007.

SU, S.; WINK, M. Natural lignans from *Arctium lappa* as antiaging agents in *Caenorhabditis elegans*. **Phytochemistry**, v. 117, p. 340-350, 2015.

SZLISZKA, E.; MERTAS, A.; CZUBA, Z. P.; KROL, W. Inhibition of inflammatory response by artemillin C in activated RAW264.7 macrophages. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

SZLISZKA, E.; ZYDOWICZ, G.; MIZGALA, E.; KROL, W. Artemillin C (3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid) sensitizes LNCaP prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. **International Journal of Oncology**, v. 41, p. 818-828, 2012.

TANI, H.; HASUMI, K.; TATEFUJI, T.; HASHIMOTO, K.; KOSHINO, H.; TAKAHASHI, S. Inhibitory activity of brazilian green propolis components and their derivatives on the release of cys-leukotrienes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 151-157, 2010.

TAVARES, L. C.; LEMOS, T. L. G.; ARRIAGA, A. M. C.; SANTIAGO, G. M. P.; BRAZ-FILHO, R. Estudo químico de uma amostra de própolis verde de Passa Quatro, Minas Gerais, Brasil. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2051-2054, 2010.

TEIXEIRA, E. W.; MESSAGE, D.; MEIRA, R. M. S. A.; SALATINO, A. Indicadores da origem botânica da própolis: importância e perspectivas. **Boletim de Indústria Animal**, v. 60, n. 1, p. 83-106, 2003.

TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MEIRA, R. M. S. A.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 85-92, 2005.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M. C.; MIORIN, P. L.; PASIN, F. R.; TSVETKOVA, I. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, n. 2, p. 249-254, 2006.

VARSHNEY, L. R.; CHEN, B. L.; PANIAGUA, E.; HALL, D. H.; CHKLOVSKII, D. B. Structural properties of *Caenorhabditis elegans* neuronal network. **Plos Computational Biology**, v. 7, n. 2, p. 1-21, 2011.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VOISINI, C.; VARMA, H.; WALKER, N.; BATES, E. A.; STOCKWELL B. R.; HART, A. C. Identification of potential therapeutic drugs for huntington's disease using *Caenorhabditis elegans*. **PLos one**, v. 2, n. 6, p. 1-8, 2007.

VU, D. H.; KOSTER, R. A.; BOLHUIS, M. S.; GREIJ DANUS, B.; ALTENA, R. V.; NGUYEN, D. H.; BROUWERS, J. R. B. J.; UGES, D. R. A.; ALFFENAAR, J. W. C. Simultaneous determination of rifampicin, clarithromycin and their metabolites in dried blood spots using LC-MS/MS. **Talanta**, v. 121, p. 9-17, 2014.

XIE, C.; ZHONG, D.; YU, K.; CHEN, X.; Recent advances in metabolite identification and quantitative bioanalysis by LC-Q-TOF MS. **Bioanalysis**, v. 4, n. 8, p. 937-959, 2012.

YANASE, S.; LUO, Y.; MARUTA, H. *PAK1*-deficiency/down-regulation reduces brood size, activates *HSP16.2* gene and extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v. 7, n. 1, p. 29-35, 2013.

WU, N.; BRADLEY, A. C.; WELCH, C. J.; ZHANG, L. Effect of extra-column volume practical chromatographic parameters of sub-2- μ m particle-packed columns in ultra-high pressure liquid chromatography. **Journal of separation science**, v. 35, n. 16, p. 2018-2025, 2012.

ZDERO, C.; BOHLMANN, F. Systematics and evolution within the Compositae, seen with the eyes of a chemist. **Plant systematics and evolution**, v. 171, n. 1-4, p. 1-14, 1990.

ZHANG, C.; SHEN, X.; CHEN, J.; JIANG, X.; WANG, K.; HU, F. Artepillin C, is it a good marker for quality control of Brazilian green propolis?. **Natural Product Research**, v. 31, n. 20, p. 2441-2444, 2017a.

ZHANG, C.; SHEN, X.; CHEN, J.; JIANG, X.; HU, F. Identification of free radical scavengers from Brazilian green propolis using off-line HPLC-DPPH assay and LC-MS. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 7, p. 1602-1607, 2017b.

ZHAO, L.; PU, L.; WEI, J.; LI, J.; WU, J.; XIN, Z.; GAO, W.; GUO, C. Brazilian green propolis improves antioxidant function in patients with type 2 diabetes mellitus. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 5, p. 498-506, 2016.

ZOU, Y.; ZHANG, Y.; HAN, L.; HE, Q.; HOU, H.; HAN, J.; WANG, X.; LI, C.; CEN, J.; LIU, K. Oxidative stress-mediated developmental toxicity induced by isoniazide in zebrafish embryos and larvae. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, p. 842-852, 2017.