

4.03.02 - Farmácia / Farmacognosia
ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE MARCADORES QUÍMICOS DA PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS

João Victor Lessa de Oliveira^{1*}, José Marcos dos Santos Oliveira², Adilson Rodrigues Sabino³, Edson de Souza Bento⁴, Josealdo Tonholo⁴, Sâmia Andréia Souza da Silva⁵, Arthur Luy Tavares Ferreira Borges¹, Ticiano Gomes do Nascimento⁶

1. Estudante de iniciação científica da ESENFAR-UFAL.
2. Estudante de doutorado do IQB-UFAL.
3. Doutor do IQB-UFAL.
4. Professor do IQB-UFAL.
5. Professora da ESENFAR-UFAL.
6. ESENFAR-UFAL – Curso de farmácia / Orientador.

Resumo A própolis vermelha alagoana é um produto natural com potencial econômico e farmacêutico no desenvolvimento de bioprodutos com requisitos de qualidade e segurança estabelecidos pela ANVISA, fazendo-se necessário conhecer a composição química da mesma a fim de estabelecer metodologias para seu controle de qualidade garantindo segurança à população usuária da mesma. Com tal finalidade desenvolveram-se métodos de isolamento e purificação de substâncias (marcadores químicos) utilizando-se de técnicas de cromatografia em coluna clássica (CCC) espectrofotometria de ultravioleta visível (UV-vis) espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e técnicas de espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) de carbono (RMN¹³C) e de hidrogênio (RMN¹H) resultando no isolamento de dois marcadores: β-amirina e bolusanthol-D. Contribuindo, assim, com a padronização de extratos de própolis vermelha alagoana tal como fornecendo dados para futuros bioprodutos derivados da mesma.

Palavras-chave: terpenoides; flavonoides; opoterápico.

Apoio financeiro: CNPq/UFAL/FAPEAL.

Introdução:

A Política Nacional de Práticas Integrativas e complementares do Ministério da Saúde assim como os arranjos produtivos locais têm ganhado força pelas estratégias de desenvolvimento de novos bioprodutos (fitoterápicos/opoterápicos), que contribuem com a geração de emprego, renda, desenvolvimento sustentável e preservação do meio ambiente da região em que atuam. O desenvolvimento de tais bioprodutos ou de alimentos funcionais, com requisitos de segurança, eficácia e qualidade é necessário, pois os parâmetros de qualidade e rastreabilidade que podem variar em diferentes: espécies de plantas, épocas do ano, regiões e por isso precisam ser implementadas dentro de uma política de desenvolvimento de bioprodutos com qualidade assegurada, regulados pela Agência Nacional de vigilância Sanitária (ANVISA) em suas metodologias de controle de qualidade de produtos e padronização de fitoterápicos e opoterápicos de modo a garantir a qualidade desde a coleta até o controle de qualidade de produto final, passando por etapas intermediárias como: screening fito químico, teste de, determinação qualitativa e quantitativa de marcadores fito químicos, processamento, e estudo de estabilidade. Por isto é necessário desenvolver, padronizar e validar metodologias analíticas que estabeleçam as especificações de qualidade para futuros produtos da própolis vermelha (um produto natural, de características físicas resinosas e composição variável, coletada de várias espécies vegetais e que sofre adição de secreções da abelha, sendo classificada como opoterápico). A própolis vermelha alagoana distingue-se das demais (possuindo selo de indicação geográfica) por possuir os marcadores químicos: elemicina, isoelemicina, metil isoeugenol, metil eugenol, formononetina, bioquianina A, isoliquiritigenina, liquiritigenina, medicarpina, homopterocarpano, quercetina e vestitol (MENDONÇA et, al, 2015). Sendo sua origem botânica a *Dalbergia ecastophyllum*, uma espécie vegetal endêmica do litoral alagoano. Utilizou-se, portanto, metodologias de isolamento e a purificação de substâncias da própolis vermelha e desenvolveu-se métodos espectrofotométricos de caracterização estrutural com objetivo de fornecer dados químicos de extratos, fases e frações cromatográficas de própolis vermelha a fim de identificar novos marcadores da própolis vermelha alagoana, contribuindo com a padronização da qualidade da própolis vermelha alagoana.

Metodologia:

Para obtenção de extrato bruto hidroalcoólico de própolis vermelha alagoana do apiário primavera realizou-se maceração de 200g da mesma em 600 ml de solução hidroalcoólica (80% de etanol) concentrando-se o extrato bruto em evaporador rotativo, para o particionamento solubilizou-se 5,0 g do extrato hidroalcoólico em etanol absoluto, transferindo-o para funil de separação e adicionando-se 6 ml de água prosseguindo com adição de 80 ml de hexano, formando duas fases (hexânica e hidroalcoólica) repetindo-se o processo mais uma vez. As fases hexânicas foram concentradas em evaporador rotativo e realizou-se, por cromatografia em coluna clássica (CCC) em fase estacionária normal (sílica gel), o fracionamento de 1,60 g da fase hexânica de própolis vermelha em sistema binário de gradiente de concentração de solventes, partindo de 100% de hexano

até 100% de acetato de etila. As frações cromatográficas 20, 21 e 22 foram submetidas a CLAE analítico e CLAE semipreparativo, espectrofotometria de Infravermelho e ressonância magnética nuclear (RMN), utilizando-se as técnicas: RMN ^1H e RMN ^{13}C .

Para obtenção do extrato bruto etanólico da própolis vermelha alagoana do apiário cajueiro (Marechal Deodoro), realizou-se maceração de 98g da mesma em etanol, posteriormente concentrou-se o extrato bruto em evaporador rotativo. Para o particionamento solubilizou-se 20g de extrato bruto em 70 ml de solução hidroalcoólica (65% de etanol), adicionando tal solução ao funil de separação e adicionando hexano e acetato de etila, gerando duas fases que foram coletadas e concentradas separadamente. Realizou-se a cromatografia em coluna clássica (CCC) da fase hexânica em fase estacionária normal (sílica gel), pesando-se 2 g de fase hexânica e solubilizando-a em hexano, com sistema binário de gradiente de solventes: hexano /acetato de etila progredindo em 5% o volume de acetato de etila a cada 120 ml de solução do gradiente. Duas frações foram reunidas em um único frasco e diluídas em metanol, e seus precipitados lavados com acetona. Tais precipitados foram avaliados quanto ao grau de pureza e quanto ao perfil espectrofotométrico de ultravioleta visível (UV-Vis), por cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), em gradiente de solventes: acetonitrila/água, partindo de 100% de água até 100% de acetonitrila, foi também obtido o perfil espectrofotométrico Infravermelho com transformada de Fourier (FTIV) e os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN), utilizando-se as técnicas: RMN ^1H e RMN ^{13}C .

Resultados e Discussão:

A CCC proveniente da fase hexânica de própolis vermelha alagoana do apiário Primavera gerou as frações hexânicas dentre as quais as frações: 20 21 e 22 demonstraram, em CLAE a presença de pico majoritário no tempo de retenção (Tr) 21,1min (ocupando, o mesmo 51,27%; 44,38% e 31,95% da área do cromatograma de tais frações, respectivamente). O espectro de infravermelho da substância demonstrou a presença de bandas características, referentes às deformações axiais e angulares dos grupamentos químicos presentes nas moléculas deste composto. Denotou-se uma banda larga em 3400 cm^{-1} referente às deformações axiais das ligações O-H de grupamentos hidroxila, além de uma banda em 2928 cm^{-1} relacionada às deformações axiais das ligações C-H de carbonos alifáticos e outra em 2820 cm^{-1} relacionada às deformações axiais das ligações C-H, indicando a presença de metoxilas. O espectro evidenciou também a presença de duas bandas em 1595 e 1496, caracterizando deformações axiais das ligações C=C de aromático sem heteroátomo (TOLEDO et al., 2012). Por fim, o espectro apresentou uma banda em 1347 cm^{-1} que corresponde à deformação angular das ligações C-H de metoxila, além de duas bandas de baixa intensidade em 1148 e 1109 cm^{-1} que são relacionadas às deformações axiais das ligações C-C de carbonos alifáticos. A ausência de uma banda de alta intensidade na região entre 1730 e 1700 cm^{-1} torna evidente a ausência de uma carbonila cetônica, geralmente encontrada no carbono 4 de flavonoides (ZHANG et al., 2016), na estrutura química do composto.

Os deslocamentos químicos de RMN de ^1H (**tabela 1 e Figura 1**) denotam os hidrogênios presentes na estrutura da substância como dois dubletos em δ 3,51 ppm ($J=2,37$ Hz) e δ 3,52 ppm ($J=3,40$ Hz), cada um equivalente a um hidrogênio, sendo esses dois hidrogênios localizados nas posições H-2a e H-3 do flavonóide Bolusanthol-D, respectivamente. O terceiro sinal, em δ 3,73 ppm, na forma de singlete equivalente a três hidrogênios, confirma a presença de uma única metoxila na estrutura, uma vez que os valores dos deslocamentos químicos para metilas são menores que δ 2,00 ppm e que sua integração equivale a três hidrogênios. O espectro de RMN de ^{13}C evidenciou os sinais referentes a 16 carbonos presentes no isoflavonóide Bolusanthol D, dentre eles, um de metoxila (δ 56,0 ppm), três carbonos sp^3 alifáticos (δ 67,7; δ 41,0 e 80,2 ppm) e 12 carbonos sp^2 aromáticos (δ 97,7; δ 104,2; δ 107,3; δ 110,8; δ 113,0; δ 121,0; δ 126,1; δ 133,3; δ 158,2; δ 160,2; δ 162,1 e δ 162,7 ppm).

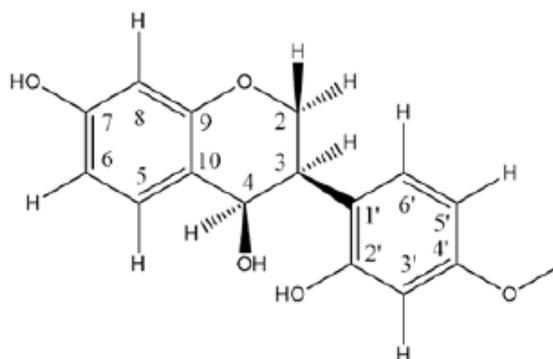
A CCC da fase hexânica da própolis vermelha alagoana proveniente do apiário cajueiro gerou 93 frações das quais a 21 e 22 foram selecionadas por fazerem parte de uma banda, demonstrando altas absorvâncias em 208 nm e 262 nm na espectrofotometria UV-vis e pureza de 100% em CLAE-UV-vis. A espectrofotometria de IV denotou estiramentos significativos em de: 3300, 20, aproximadamente 2960(1/cm), 2960(1/cm), 1640(1/cm), 1463, 97(1/cm), 1384, 89(1/cm), 1035, 77(1/cm), e em aproximadamente 820(1/cm), 659,66(1/cm), denotando a presença de grupos OH, C=C, CH₃, C=C, C-C-H, C-O e CH₂, respectivamente e a espectroscopia de RMN (RMN ^1H e RMN ^{13}C) denotaram grande semelhança entre os deslocamentos químicos do terpeno isolado e β -amirina (**Tabela 2 e Figura 2**), por possuir hidrogênios metílicos característicos de β -amirina (0.8163ppm, 0.8563 ppm, 0.8948 ppm, 0.9623 ppm, 0.9927 ppm, 1.0217 ppm, 1.1591 ppm, 1.2782 ppm, 1.5089 ppm), além de deslocamentos característicos de hidrogênios ligados ao carbono 12 e 3 de β -amirina (triplete em 5.19ppm e duplo dubleto em 3.22ppm, respectivamente).

Tabela 1. Deslocamentos químicos de RMN ¹³C e ¹H para o bolusanthol D.

Posição	δ ¹³ C	δ ¹ H - J (Hz)
2a	67.7, CH ₂	3.51, 1H, m
2b	-----	4.21, 1H, m
3	41.0, CH	3.52, 1H, m
4	80.2, CH	5.46, 1H, m,
5	133.3, CH	7.28, 1H, d, (8.41)
6	110.8, CH	6.49, 1H, dd, (2.23, 2.49)
7	160.2, C	-----
8	104.2, CH	6.30, 1H, d, (2.60)
9	158.2, C	-----
10	113.0, C	-----
1'	121.0, C	-----
2'	162.1, C	-----
3'	97.7, CH	6.38, 1H, d, (2.34)
4'	162.7, C	-----
5'	107.3, CH	6.44, 1H, dd, (2.23, 2.16)
6'	126.1, CH	7.16, 1H, d, (8.19)

Fonte: Elaborada pelos autores.

Figura 1. Estrutura química do Bolusanthol D.



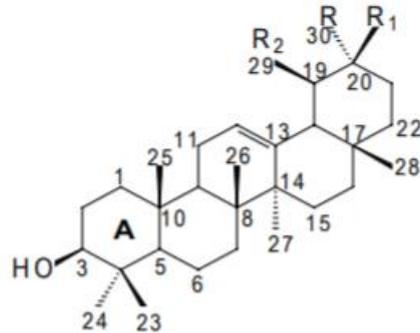
Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 2. Comparação de deslocamentos químicos em RMN¹³C de β -amirina e do terpeno isolado e dados de RMN¹H do terpeno isolado

Posição(C)	δ ¹³ C de β -amirina	δ ¹³ C isolado	δ ¹ H isolado
1	38.7	40,025	1.4950
2	27.3	27,4666	4.1572; 4.1041
3	79.0	79,2635	5.1935; 5.1844
4	38.8	39,0029	-
5	55.3	55,4053	4.0717
6	18.5	18,6054	0.9787
7	32.8	32,8857	0.9483
8	38.8	38,8181	-
9	47.7	47,8674	3.2514
10	37.6	37,3672	-
11	23.6	23,7572	3.1873
12	121.8	121,9531	5.2026
13	145.1	145,4248	-
14	41.8	41,9533	-
15	26.2	26,3828	2.0537
16	27.0	27,1664	1.007
17	32.5	32,7186	-
18	47.4	47,4627	2.1520
19	46.9	47,0587	1.9122
20	31.1	31,3092	-
21	34.8	34,9619	1.1451
22	37.2	37,179	1.8720
23	28.2	28,3197	1.2642
24	15.5	15,7194	0.9483
25	15.6	15,8034	0.8023
26	16.9	17,032	0.9787
27	26.0	26,2156	1.0070
28	28.4	28,6219	0.8423
29	33.3	33,558	0.8808
30	23.7	23,9147	0.8808

Fonte: Elaborada pelos autores.

Figura 2. Estrutura química da 3β-hidroxiolean-12-eno (β-amirina)



Onde: R = R₁ = CH₃, R₂ = H 3β-hidroxiolean-12-eno (β-amirina) (ROBERT M. SILVERSTEIN, FRANCIS X. WEBSTER, 2005).

Fonte: adaptado de BANDEIRA et al., 2007.

Conclusões

Diante do exposto no presente trabalho conclui-se que as metodologias analíticas para o isolamento e purificação de marcadores químicos da própolis vermelha alagoana são eficazes em termos de extração, particionamento, fracionamento, isolamento e purificação, pois demonstram o isolamento dos marcadores: β-amirina e Bolusanthol D, contribuindo, com a padronização de extratos e derivados de extratos da própolis vermelha alagoana e, conseqüentemente, com o desenvolvimento estratégico de bioprodutos derivados da mesma.

Referências bibliográficas

- BANDEIRA, P. N. et al. Obtenção de derivados da mistura triterpenoídica α- e β-amirina. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 2, p. 204–208, 2007.
- Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>> Acesso em 8 de março de 2018.
- PAVIA, D. et al. **Introdução à espectroscopia**. [s.l.: s.n.].
- MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. C-13 NMR-SPECTRA OF PENTACYCLIC TRITERPENOIDS - A COMPILATION AND SOME SALIENT FEATURES. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517–1575, 1994.
- MARLUCE OLIVEIRA DIAS, L. H. E A. C. P. SEPARAÇÃO SEMIPREPARATIVA DE α E β-AMIRINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA. **Química nova**, v. 34, n. 20, p. 704–706, 2011.
- TOLEDO T. A. DE et al. Characterization of flavonoid 3-Methoxyquercetin performed by FT-IR and FT-Raman spectroscopies and DFT calculations. **Journal of Molecular Structure**. Cuiabá, v. 1029, p. 22-27, 2012.
- ROBERT M. SILVERSTEIN, FRANCIS X. WEBSTER, D. J. K. **Spectrometric identification of organic compounds**. [s.l.: s.n.].