

**UFRRJ
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

TESE DE DOUTORADO

**ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE METABÓLITOS
ESPECIAIS DA PRÓPOLIS VERDE POR CROMATOGRAFIA
CONTRACORRENTE**

CRISTIANE CARDOSO DOS SANTOS

2025



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE METABÓLITOS
ESPECIAIS DA PRÓPOLIS VERDE POR CROMATOGRÁFIA
CONTRACORRENTE**

CRISTIANE CARDOSO DOS SANTOS

Sob a Orientação da Professora

Rosane Nora Castro

e Co-orientação da Professora

Gilda Guimarães Leitão

Tese submetida como requisito parcial para
obtenção do grau de **Doutora em Química**, no
Programa de Pós-Graduação em Química, Área
de Concentração em Química

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2025

Ficha catalográfica elaborada com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a)

S237i Santos, Cristiane Cardoso dos, 08031982
Isolamento e avaliação biológica de metabólitos
especiais da própolis verde por cromatografia
contracorrente / Cristiane santos. - Rio de
janeiro, 2025.
195 f.

Orientadora: Rosane Castro.
Coorientadora: Gilda Leitão.
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de pós-graduação em química,
2025.

1. covid-19. 2. atividade anti-câncer. 3.
artepilina C. 4. bacarina. 5. ácido anacárdico. I.
castro, Rosane, 24031965-, orient. II. leitão,
Gilda, 05071962-, coorient. III Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Programa de pós graduação
em química. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

CRISTIANE CARDOSO DOS SANTOS

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Química, no
Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração Química.

TESE APROVADA EM 10/02/2025

Rosane Nora Castro Dra. UFRRJ
(Orientadora)

Maria Raquel Figueiredo Dra. Fiocruz-RJ

Aurea Echevarria Aznar Neves Lima Dra. UFRRJ

Rodrigo Rodrigues de Oliveira Dr. UENF

Lucas Silva Abreu Dr. UFF



TERMO Nº 70/2025 - PPGQ (12.28.01.00.00.00.60)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 11/02/2025 15:12)

AUREA ECHEVARRIA AZNAR NEVES LIMA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DQO (11.39.00.23)

Matricula: ###71#9

(Assinado digitalmente em 12/02/2025 08:28)

ROSANE NORA CASTRO

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DQO (11.39.00.23)

Matricula: ###775#8

(Assinado digitalmente em 11/02/2025 13:33)

RODRIGO RODRIGUES DE OLIVEIRA

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.397-##

(Assinado digitalmente em 12/02/2025 10:11)

MARIA RAQUEL FIGUEIREDO

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.187-##

(Assinado digitalmente em 13/02/2025 11:54)

LUCAS SILVA ABREU

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.405-##

AGRADECIMENTOS

Tudo começou com um sonho antigo: retomar a vida acadêmica. Eu nunca imaginei que, ao voltar aos estudos, enfrentaria tantos desafios, especialmente com a pandemia de covid dando as caras! Foram dias corridos, tentando acompanhar as disciplinas *online*, enquanto gerenciava a barulheira dos filhos em casa, tentava me adaptar a mil programas diferentes pra conseguir acessar as aulas e lidava com uma internet que tinha um relacionamento conturbado com a estabilidade. Nessa, aprendi o que é a arte do malabarismo acadêmico!

Iniciei meu doutorado em 2021 com a expectativa de um percurso mais tranquilo. No entanto, como bem expressa a canção do Capital Inicial: “nem tudo é como a gente quer, nem tudo pode ser perfeito.” Foram quase quatro anos desafiadores, equilibrando a pandemia, as aulas, o trabalho, a maternidade e as demandas familiares, além das idas e vindas entre a Rural e a UFRJ. Contudo, sinto que Deus colocou as pessoas certas em minha jornada. O apoio incondicional da minha família, o carinho das minhas orientadoras e a ajuda diária dos amigos do laboratório foram fundamentais e fizeram toda a diferença. Por isso, expresso aqui meu sincero agradecimento:

Primeiro, a Deus, por nos proteger e dar saúde a mim e minha família nesse momento tão complicado. Aos meus pais, que se desdobraram para me ajudar com meus filhos e foram incríveis nesse processo. Ao meu marido, Marcelo, que ficava ali, paciente, ouvindo todas as minhas apresentações e palestras. Ele merece esse título de doutor junto comigo, com certeza! E, claro, aos meus filhos: Marcos, que sempre ajudava e cuidava do caçulinha Pedro quando eu não podia estar; e ao Pedro, que me fazia rir e me enchia com seus calorosos abraços nos momentos de cansaço.

Também não posso deixar de mencionar minhas orientadoras, Rosane Nora e Gilda Guimarães. Elas foram um apoio fundamental, sempre com carinho e atenção, ajudando a cada passo nessa jornada. E aos meus “vizinhos” queridos, professora Suzana Guimarães e professor Mario Geraldo bem como todos seus alunos, que sempre me salvaram com um material ou outro.

Meu agradecimento vai também para os amigos do laboratório LAQPNA e FitosCCC, especialmente Lucas Pires e Diégina, que sempre traziam soluções criativas e ideias valiosas. Ao Vinícius, pelas análises de RMN e pelos cafezinhos que deixavam meus dias mais leves!

E como não agradecer aos meus amigos e confidentes, Edvaldo e Jonatas Milato? Vocês foram essenciais para minha saúde emocional. Com conselhos sábios e uma disposição inabalável em me manter equilibrada, ajudaram a transformar essa jornada em algo realmente especial.

Por fim, às minhas incríveis ICs, Alicia (UFRJ) e Mariáh (UFRRJ), que fizeram toda a diferença, vocês brilharam em cada projeto e desafio e nos mostraram que o trabalho em equipe faz a mágica acontecer!

Sem cada uma dessas pessoas maravilhosas, nada disso seria possível. Agradeço sinceramente a cada um de vocês, pois sem este apoio, eu me veria diante de páginas em branco e incertezas acerca das minhas capacidades científicas. Por isso, expresso minha profunda gratidão por cada apoio, crítica construtiva e momento de colaboração que vivenciamos. Obrigada!

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

RESUMO

DOS SANTOS, Cristiane Cardoso. **Isolamento e avaliação biológica de metabólitos especiais da própolis verde por cromatografia contracorrente: Seropédica, RJ. 2024. 195p** Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

A própolis verde, um produto apícola brasileiro amplamente reconhecido internacionalmente, destaca-se em pesquisas científicas devido às suas promissoras propriedades e benefícios medicinais, especialmente no combate ao SARS-CoV-2 e ao câncer. A importância da caracterização dos constituintes químicos bioativos presentes nessa resina elaborada pelas abelhas melíferas, não pode ser subestimada, pois sua composição química é notavelmente complexa, exigindo múltiplas etapas para o isolamento eficaz das principais substâncias. Neste contexto, a escolha de um procedimento de isolamento que diminua custos, longos períodos de execução e perdas significativas de amostra é crucial. A Cromatografia Contracorrente (CCC), uma técnica de partição líquido-líquido que se destaca por permitir a recuperação integral do analito sem a necessidade de suportes sólidos, surge como uma alternativa adequada. Desta forma, o presente estudo avaliou tanto o extrato hexânico (EHPV), quanto etanólico (EEPV) da própolis verde, com o objetivo de isolar, com maior grau de pureza, substâncias preniladas, em especial artepilina C, bacarina e culifolina. O fracionamento do EHPV envolveu dois procedimentos cromatográficos isocráticos distintos, um com modo de eluição normal e outro com eluição reversa utilizando hexano-etanol-água 4:3:1 (v/v) como sistema de solventes bifásico. Os resultados obtidos para o isolamento dos compostos no extrato hexânico mostraram-se distintos, com o modo de eluição normal promovendo maior seletividade para bacarina (89% de pureza em HPLC-PDA) e artepilina C (93% de pureza), enquanto no modo reverso o culifolina se destacou com 96% de pureza. Além disso, as substâncias isoladas foram testadas quanto à inibição da interação entre o domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína *spike* e o receptor da proteína ACE2 foi avaliada pelo imunoensaio LumitTM, revelando que bacarina e artepilina C exibiram significativas atividades inibitórias, com 51% e 67% de inibição, respectivamente, em concentrações de 10 µM. No que se refere ao fracionamento do EEPV, atenção específica foi dada a metodologia para o isolamento da artepilina C. Para tal, foi utilizado o sistema de solventes hexano-acetato de etila (8:2) e bicarbonato de sódio 4% aquoso (1:1) em modo de eluição reverso, resultando na obtenção da artepilina C com 82% de pureza. Estes fracionamentos foram monitorados por meio de *fingerprinting* em LCQTOF, estabelecendo um parâmetro eficaz para acompanhamento da separação. No âmbito do estudo fitoquímico de EEPV, substâncias como ácido anacárdico, capilartemisina, ácido *p*-cumárico, aromadendrina, betuletol e canferide, também foram isolados por cromatografia contracorrente multidimensional (MDCCC), alternado-se sistemas de solventes aquosos e não-aquosos e testados *in vitro* em câncer de mama (linhagens MCF-7 e MDA-MD-231). A bacarina apresentou resultados preliminares promissores sobre linhagens agressivas de câncer de mama (MDA). Deste modo, os resultados obtidos para o isolamento dos metabólitos especiais da própolis verde evidenciam o potencial da técnica de CCC, e oferecem novas perspectivas na área de produtos naturais para o isolamento de substâncias bioativas com altas purezas, para avaliação do seu potencial biológico.

Palavras-chave: COVID-19, atividade anti-câncer, artepilina C, bacarina, ácido anacárdico e betuletol

ABSTRACT

DOS SANTOS, Cristiane Cardoso. **Isolation and biological evaluation of special metabolites from green propolis by countercurrent chromatography: Seropédica, RJ. 2024. 195p** Thesis (PhD in Chemistry). Institute of Chemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Green propolis, a widely recognised Brazilian apicultural product, has been the focus of scientific research for its promising medicinal properties and benefits, particularly in the fight against SARS-CoV-2 and cancer. The importance of characterising the bioactive chemical constituents present in this resin produced by honeybees cannot be underestimated, as its chemical composition is remarkably complex, requiring several steps to effectively isolate the main substances. In this context, the choice of an isolation method that reduces costs, long execution times and significant sample losses is crucial. Countercurrent chromatography (CCC), a liquid-liquid partition technique characterised by full recovery of the analyte without the need for solid supports, is emerging as a suitable alternative. Thus, in the present study, both the hexane (HEGP) and ethanol (EEGP) extracts of green propolis were evaluated with the aim of isolating, with a higher degree of purity, prenylated substances, especially artemillin C, baccharin and culifolin. The fractionation of HEGP involved two different isocratic chromatographic procedures, one with normal elution mode and the other with reverse elution, using hexane-ethanol-water 4:3:1 (v/v) as a biphasic solvent system. The results obtained for the isolation of the compounds in the hexane extract were different, with the normal elution mode promoting greater selectivity for baccharin (89% purity) and artemillin C (93% purity), whereas in the reverse mode culifolin stood out with 96% purity. In addition, the isolated substances were tested for inhibition of the interaction between the receptor binding domain (RBD) of the spike protein and the ACE2 protein receptor, which was evaluated by the LumitTM immunoassay, showing that baccharin and artemillin C exhibited significant inhibitory activities, with 51% and 67% inhibition, respectively, at concentrations of 10 μ M. With regard to the fractionation of EEGP, particular attention was paid to the methodology for the isolation of artemillin C. For this purpose, the solvent system of hexane-ethyl acetate (8:2) and 4% aqueous sodium bicarbonate (1:1) was used in the reverse elution mode, resulting in artemillin C with 82% purity. These fractionations were monitored by LCQTOF fingerprinting, providing an effective parameter for monitoring the separation. As part of the phytochemical study, the ethanol extract of green propolis (EEGP), substances such as anacardic acid, capillartemisin, *p*-coumaric acid, aromadendrin, betuletol and kaempferide were also isolated using multidimensional countercurrent chromatography (MDCCC), alternating aqueous and non-aqueous solvent systems and tested *in vitro* in breast cancer (MCF-7 e MDA-MD-231). Baccharin showed promising preliminary results on aggressive breast cancer (MDA) strains. Thus, the results obtained for the isolation of specific metabolites from green propolis demonstrate the potential of the CCC technique and offer new perspectives in the field of natural products for the isolation of bioactive substances with high purity in order to evaluate their biological potential.

Key words: COVID-19, anti-cancer activity, artemillin C, baccharin, anacardic acid and betuletol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Relevos sobre apicultura no túmulo de Pabasa e do Templo de Karnak (EL-SEEDI <i>et al.</i> , 2022).....	2
Figura 2 -Abelhas com resina (à esquerda) e pólen (à direita) nas patas traseiras (BANKOVA <i>et al.</i> , 2016).....	3
Figura 3 -Representação ilustrativa dos locais onde são produzidas algumas própolis brasileiras, com a respectiva fórmula estrutural das principais substâncias e origens botânicas, quando conhecidas Adaptado de FRANCHIN <i>et al.</i> , 2024.....	4
Figura 4 -Flavonoides presentes na própolis sulista (VALENÇA <i>et al.</i> , 2021).....	5
Figura 5 -Benzofenona poliprenilada de própolis preta (SALATINO <i>et al.</i> , 2021).....	5
Figura 6 - Aspectos de quatro própolis brasileiras. Adaptado de MARCUCCI <i>et al.</i> , 2020.	6
Figura 7 -Abelha <i>Apis mellifera</i> coletando resina de <i>B. dracunculifolia</i> para a produção de própolis (TOMAZZOLI <i>et al.</i> , 2020).....	7
Figura 8 - Colaboração nacional e internacional na produção de publicações científicas sobre própolis verde na última década (https://www-webofscience-com.ez30.periodicos.capes.gov.br/). Própria autoria.....	8
Figura 9 - Modelo de mapeamento das principais tendências e lacunas na pesquisa sobre a própolis no Brasil. Própria autoria.....	9
Figura 10 -Mapa bibliométrico obtido pelo <i>software</i> VOSviewer versão 1.6.16 (https://www.vosviewer.com), usando “green propolis” como palavras-chave, registrado no banco de dados <i>web of sciense</i> no período de 2014 a 2025 (realizado em 8 de outubro de 2024).	10
Figura 11 -Substâncias predominantes na própolis verde brasileira	13
Figura 12 - Estrutura química de plicatina B ((<i>E</i>)-3-(4-hidroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)acrilato de metila).....	14
Figura 13 -Estruturas de esqueletos principais dos triterpenos pentacíclicos (BACHOŘÍK & URBAN, 2021).....	15
Figura 14 -Triterpenos do tipo cicloartano identificados em própolis de Teresina-PI. Substâncias: 1 - ácido isomangiferólico, 2 - ácido mangiferólico, 3 - ácido mangiferônico, 4 – 24-metileno- cicloartano-3 β ,26-diol, 5 - ácido ambólico e 6 -ácido ambônico (DA SILVA <i>et al.</i> , 2005).....	16
Figura 15 - Estrutura química do flavonoide AME presente no estudo (SIMÕES-AMBROSIO <i>et al.</i> , 2010).....	17
Figura 16 - Estruturas químicas dos flavonoides presentes no extrato etanólico de própolis testados em ratos hipertensos. 1 -diidrocanferide, 2 - isosakuranetina; 3 -canferide e 4 -betuletol. (MARUYAMA <i>et al.</i> , 2009).	18
Figura 17 -Lipídios fenólicos isolados/identificados no extrato metanólico da própolis produzida por <i>A. mellifera</i>	19
Figura 18 - Fluxograma dos mecanismos propostos da Bacarina contra tumores. Adaptado de CAMPO <i>et al.</i> , 2023.....	22
Figura 19 - Representação da distribuição das fases em uma coluna em espiral (ITO, 2005).	24
Figura 20 - Configuração genérica de equipamentos de CCC e possíveis parâmetros para ajustar em cada componente. Adaptado de VIEIRA <i>et al.</i> , 2015.....	25
Figura 21 -Modelo de mapeamento das principais tendências e lacunas na pesquisa sobre a própolis no Brasil. Própria autoria.....	26
Figura 22 -Mapa bibliométrico obtido pelo <i>software</i> VOSviewer versão 1.6.16 (https://www.vosviewer.com), usando “cromatografia contracorrente” como palavras-chave,	

registrado no banco de dados <i>web of sciense</i> no período de 2014 a 2025 (realizado em 8 de outubro de 2024).....	27
Figura 23 -Distribuição mundial de publicações sobre cromatografia contracorrente na última década (2014 a 2024). Figura criada com https://www.mapchart.net	28
Figura 24 -Triterpenos isolados da própolis da Arábia Saudita (JERZ <i>et al.</i> , 2014)	29
Figura 25 -Substâncias isoladas da própolis vermelha (LOPES <i>et al.</i> , 2024).....	30
Figura 26 - Equipamentos utilizados no fracionamento da própolis verde. 1: P.C. Inc.; 2a: Quattro HT-Prep, fechado e 2b: Quattro HT-Prep aberto equipado com as colunas.....	37
Figura 27 -Teste de partição em tubo de ensaio. Adaptado da apostila CCC2024 Pre-Conference Short Course	38
Figura 28 -Resultados de CCD da seleção do sistema de solvente pelo teste de partição em tubo de ensaio para o fracionamento HSCCC do extrato hexânico de própolis verde (EHPV). Substâncias: (1): artepilina C, (2): bacarina, (3): culifolina e a (4 e 5) mistura de triterpenos ácidos ambônico e mangiferônico. Sistemas de solvente testados onde (S) significa fase superior e (I) significa fase inferior: (1) hexano-etanol-água 2:2:1, (2) hexano-metanol-água 2:2:1, (3) hexano-etanol-água 4:3:1, (4) hexano-metanol-água 4:3:1, (5) hexano-etanol-água 5:4:1, (6) hexano-metanol-água 5:4:1, (7) hexano-acetato de etila-metanol-água 1:1:1:1. A placa de CCD foi eluída com o sistema de solvente hexano:acetona (7:3, v/v) seguido de visualização sob luz UV (254 nm).....	38
Figura 29 - Modo de operação do equipamento	39
Figura 30 - Estruturas das substâncias isoladas da própolis verde brasileira. (1) artepilina C; (2) bacarina; (3) culifolina; (4) ácido ambônico; (5) ácido mangiferônico.	42
Figura 31 -Testes de partição de tubos de ensaio com EHPV para sistemas de solventes 1 a 6: (1) hexano-etanol-água 2:2:1, (2) hexano-metanol-água 2:2:1, (3) hexano-etanol-água 4:3:1, (4) hexano-metanol-água 4:3:1, (5) hexano-etanol-água 5:4:1, (6) hexano-metanol-água 5:4:1, (7) hexano-acetato de etila-metanol-água 1:1:1:1.	43
Figura 32 - Substâncias: 1: artepilina C, 2: bacarina, 3: culifolina, mistura triterpênica de 4: ácidos ambônico e 5: mangiferônico. (A) e (B) Resultados de CCD de CCC1 visualizados sob luz UV ($\lambda = 254$ nm). (C) Resultados de CCD de CCC2 visualizados sob luz UV ($\lambda = 254$ nm). (D) Resultados de CCD de CCC3 visualizados sob luz UV ($\lambda = 254$ nm). (E) Resultados de CCD de CCC4 pulverizado com reagente vanilina-sulfúrica. (F) Resultados de CCD de CCC5 visualizados sob luz UV ($\lambda = 254$ nm).	45
Figura 33 - Cromatograma de ions totais (TIC) por GC-MS, expandido na região de 29-37 min, para análise de artepilina C (vermelho) e da bacarina (verde) mostrando a presença dos ácidos mangiferônicos e ambônico (Tr de 35,87 - 36,21 min).	47
Figura 34 -Isolamento de (1) artepilina C, (2) mistura de triterpenos, (3) bacarina e (4) culifolina no fracionamento de própolis verde por CCC.	48
Figura 35 -Perfil Cromatográfico em CLAE-DAD (280 nm) das substâncias identificadas no fracionamento de EHPV em Cromatografia Contracorrente.....	49
Figura 36 -Ilustração da metodologia aplicada na extração seletiva em 4 etapas. Etapa 1: o extrato etanólico foi fracionado por HSCCC com o sistema de solvente selecionado (CCC1 a CCC3). Os derivados de ácidos fenólicos presentes em EEPV estão na forma neutra quando entram em contato com a fase estacionário orgânica mas são ionizados à medida que entram em conta com a fase móvel aquosa básica. Etapa 2: As frações recolhidas com a fase móvel aquosa básica são neutralizadas com o ácido. Etapa 3: as frações neutralizadas são extraídas com acetato de etila e os ácidos fenólicos são recuperados na fase orgânica. Etapa 4: as frações são analisadas por CCD e/ou HPLC.....	58
Figura 37 -Estrutura das principais substâncias presentes no extrato etanólico de própolis verde (EEPV).....	60
Figura 38 -Perfil cromatográfico por HPLC-PDA(280 nm) de EEPV.	60

Figura 39 -Perfil cromatográfico (CCD de CCC1 pulverizado com reagente vanilina- sulfúrica) das frações reunidas obtidas no fracionamento de EEPV por HSCCC com o sistema de solventes hexano-acetato de etila (1:1) – sol. aquosa de Na ₂ CO ₃ 5% (CCC1). A seta vermelha indica as frações contendo a substancia-alvo 1, artepilina C.	61
Figura 40 -Perfil cromatográfico por HPLC-PDA (280 nm) das frações 20-26 do fracionamento CCC1 mostrando um pico com tempos de retenção de 25,154 min correspondentes à artepilina C, 1.	62
Figura 41 -Composto: artepilina C, 1. Resultados da CCD de CCC2 pulverizado com reagente vanilina- sulfúrica. Linha vermelha: frações contendo ácido <i>p</i> -cumarico e outros prenilados, Linha amarela: frações contendo prenilados e flavonoide. Linha verde: artepilina C e linha azul: frações contendo flavonoides, culifolina e triterpenos pentacíclicos.	63
Figura 42 - Perfil cromatográfico por HPLC-PDA(280 nm) das frações reunidas em CCC2. Estruturas das substâncias: artepilina C,1, bacarina, 2, drupanina, 3, e ácido <i>p</i> -cumárico, 4, e culifolina, 5.	64
Figura 43 - Perfil cromatográfico por HPLC-PDA(280 nm) das frações reunidas em CCC3. Estruturas das substâncias: artepilina C,1, bacarina, 2, drupanina, 3, e culifolina, 5.	65
Figura 44 -Estruturas químicas de algumas substâncias detectadas no EEPV por LC-MS/MS.	74
Figura 45 -Diagrama de Venn de análises pareadas pelo MPP (versão 15.5). (Azul) íons identificados para EEPV; (vermelho) íons identificados para fração 40-55 (CCC3); (Roxo) íons compartilhados entre ambas amostras.	75
Figura 46 -Gráfico de entidades em termos de abundância em massas (Da) <i>versus</i> tempo de retenção (minutos) produzidos em MPP (versão 15.5). (Azul) íons identificados para EEPV; (vermelho) íons identificados para fração 40-55 (CCC3).	76
Figura 47 -CCD da seleção do SS pelo teste de partição em tubo de ensaio para o fracionamento de EEPV por CCC1. Sistemas de solventes testados onde (S) significa fase superior e (I) significa fase inferior e a numeração de acordo com a Tabela 8. (ART) artepilina.	82
Figura 48 -Ilustração do estudo fitoquímico de EEPV.	83
Figura 49 -CCD da seleção do SS pelo teste de partição em tubo de ensaio para o fracionamento HSCCC de EEPV. Sistemas de solventes testados onde (S) significa fase superior e (I) significa fase inferior e numeração de acordo com a Tabela 10. (ANAC) mistura de ácidos anacárdicos.	84
Figura 50 - Perfil cromatográfico por HPLC-PDA (280 nm) em fase reversa do EEPV. Substâncias: 1: artepilina C, 2: bacarina, 3: culifolina, 4: ácido <i>para</i> -cumárico, 5: drupanina, 6: capilartemisina A/B, 7: aromadendrina-4-metil éter, 8: isosakuranetina, 9: betuletol, 10: canferide, 11: mistura triterpênica dos ácidos ambônico e mangiferônico e 12 a 15:derivados de ácido anacárdico	87
Figura 51 - (A-C) Visualização dos resultados do fracionamento CCC1.1 por CCD (gel de sílica F254). (A). CCD visualizada sob luz UV ($\lambda = 254$ nm). (B) CCD visualizada sob luz UV ($\lambda = 365$ nm). (C) Placas pulverizadas com reagente vanilina-sulfúrica.	88
Figura 52 - (A-D) Visualização dos resultados do fracionamento CCC1.2 por CCD (gel de sílica F ₂₅₄). Placas pulverizadas com reagente vanilina-sulfúrica. (E). CCD visualizada sob luz UV ($\lambda = 254$ nm). (F) CCD visualizada sob luz UV ($\lambda = 365$ nm). Substâncias: 1: artepilina C, 2: bacarina, 3: culifolina, 4: ácido <i>para</i> -cumárico, 5: drupanina, 6: capilartemisina A/B, 7: aromadendrina-4-metil éter, 8: isosakuranetina, 9: betuletol, 10: canferide, 11: mistura triterpênica de ácidos ambônico e mangiferônico e 12 a 15: derivados de ácido anacárdico..	90
Figura 53 - Estruturas das substâncias isoladas de EEPV por CCC com o sistema de solvente bifásico HEEWat. Substâncias 1: artepilina C, 2: bacarina, 3: culifolina, 4: ácido <i>para</i> -cumárico, 5:drupanina, 6:capilartemisina A, 6a:capilartemisina B 7:aromadendrina-4-metil éter, 8: isosakuranetina, 9:betuletol, 10:canferide, mistura triterpênica de 11: ácido ambônico	

e 11a : ácido mangiferônico e derivados de ácidos anacárdicos: 12 : ácidos anacárdicos 15:1; 13 : ácidos anacárdicos 17:1; 14 : ácidos anacárdicos 19:1 e 15 : ácidos anacárdicos 19:0.....	91
Figura 54 -Perfil Cromatográfico por HPLC-PDA (280nm) em fase reversa da drupanina....	93
Figura 55 -Betuletol isolado da combinação das técnicas cromatográficas: HSCCC e GPC ..	95
Figura 56 -Resultados de CCD de CCC2 pulverizado com reagente vanilina-sulfúrica.	97
Figura 57 -Isolamento do ácido anacárdico 19:1. A- amostra injetada em CCC2; B- frações reunidas do CC2 e C- Ácido anacárdico purificado em cromatografia de permeação em gel. 97	97
Figura 58 -Resultados de CCD de ácido anacárdico purificado visualizados sob luz UV ($\lambda = 254$ nm) e luz UV ($\lambda = 365$ nm).	98
Figura 59 -Proposta de fragmentação do ácido anacárdico purificado	98
Figura 60 -Estruturas químicas dos ácidos anacárdicos presentes em EEPV	99
Figura 61 -Perfil GC-MS obtido por impacto de elétrons para ceras (vermelho), ácido anacárdico (verde), mistura triterpênica dos ácidos ambônicos e mangiferônicos (azul), extrato hexânico de própolis verde (marrom) e extrato etanólico de própolis verde (preto).	100
Figura 62 - Teste das substâncias isoladas da própolis verde com inibição nas linhagens de células de câncer de mama. As linhagens MCF-7 (A) e MDA-MB-231 (B) foram tratadas com 100 $\mu\text{g/mL}$ de cada substância isolada da própolis verde por 72h e analisadas por MTT. Análise estatística em relação ao controle * $p < 0,05$). $n=3$. Substâncias: Controle (control), extrato hexânico de própolis verde (HEGP), extrato etanólico de própolis verde (EEGP). Betuletol, canferide, ácido anacárdico 17:1 (ANAC 17:1), ácido anacárdico 19:1 (ANAC 19:1), culifolina, bacarina (baccharin), atr epilina C, mistura triterpênica dos ácidos ambônicos e mangiferônicos (triterpene), drupanina, aromadendrina metil éter (AME), capillatersina (CAP A/B) e ácido p-cumárico.	101

LISTA TABELAS

Tabela 1. Coeficiente de partição (<i>K</i>) e fator de separação (α) dos biomarcadores artepilina C, 1, e bacarina, 2, no extrato hexânico de própolis verde (EHPV) calculados para o modo de eluição em fase normal.....	42
Tabela 2. . Parâmetros analíticos para fracionamentos EHPV CCC1 a CCC5 por HSCCC com o sistema solvente hexano – etanol - água 4:3:1 (v/v).....	44
Tabela 3. Pureza por HPLC-PDA de substâncias preniladas artepilina C, 1, bacarina, 2, e culifolina, 3, obtidos de EHPV após fracionamentos CCC.....	46
Tabela 4. Taxas de inibição (em porcentagem) da formação do complexo RBD:ACE2 por extratos de própolis verde (250µg.mL ⁻¹) e seus biomarcadores (10µM) avaliados pelo imunoensaio Lumit™.....	49
Tabela 5. Sistemas de solventes testados pelo teste de partição em tubo de ensaio para o fracionamento de EEPV por HSCCC.....	57
Tabela 6. Coeficiente de partição (<i>K</i>) da artepilina C, 1, no extrato etanólico de própolis verde (EEPV) calculado para o modo reverso de eluição.....	57
Tabela 7. Parâmetros analíticos para fracionamentos de EEPV por HSCCC.....	58
Tabela 8. Perfil químico do EEPV fracionado por CCC e analisado por LC-MS /MS com ESI (modo positivo e negativo) e APCI (modo negativo e positivo).....	68
Tabela 9. Sistemas de solvente testados para o fracionamento do extrato etanólico de própolis verde por HSCCC (CCC1).....	82
Tabela 10. Sistemas de solvente testados para o fracionamento das frações apolares por HSCCC (CCC2).....	83
Tabela 11. Parâmetros analíticos para fracionamentos de EEPV (CCC1) em modo de eluição normal em HTprep (coluna 112mL) com fluxo 2mL.min ⁻¹ e recolhimento de 4mL por tubo	84
Tabela 12. Parâmetros analíticos para fracionamentos das frações apolares obtidas de CCC1 (CCC2) em modo de eluição normal no equipamento HTprep (coluna 112mL) com fluxo 2mL.min ⁻¹ e recolhimento de 4mL por tubo.....	85

LISTAS DE ABREVIACÕES, SIGLAS OU SÍMBOLOS

ACE2: *Angiotensin-converting enzyme 2* (em português, enzima conversora de angiotensina 2)
ACN: Acetonitrila
AcOEt: Acetato de etila
ACS: *American Chemical Society*
AKR1C3: *Aldo-Keto Reductase Family 1* (em português, aldo-ceto redutase)
AME: *Aromadendrin-4'-methyl ether* (em português, Éter metílico da aromadendrina)
APCI: *Atmospheric pressure chemical ionization* (em português, ionização química à pressão atmosférica)
CAPE: *Caffeic acid phenethyl ester* (em português, éster fenetílico do ácido cafeico)
CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCC: *Countercurrent chromatography* (em português, cromatografia contracorrente de alta velocidade)
CCD: cromatografia de camada delgada ou fina
CI₅₀: Concentração inibitória média
CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPC: *Centrifugal partition chromatography* (em português, cromatografia de partição centrífuga)
CPC: *Centrifugal Partition Chromatography* (em português, cromatografia de partição centrífuga)
CPG: Cromatografia de permeação em gel
DSC: *Differential Scanning Calorimetry* (em português, Calorimetria Exploratória Diferencial)
EEPv: Extrato etanólico de própolis verde
EHPv: Extrato hexânico de própolis verde
ESI: *Electrospray ionization* (em português, ionização por electrospray)
FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FE: Fase estacionária
FI: Fase Inferior
FM: Fase móvel
FS: Fase Superior
GC-MS: *Gas chromatography-mass spectrometry* (em português, cromatografia gasosa-espectrometria de massa)
GUESS: generally useful estimation of solvent systems
HEEWat: sistemas de solventes quaternários hexano-acetato de etila-etanol-água
HEMWat: sistemas de solventes quaternários hexano-acetato de etila-metanol-água
HPLC-PDA: *High performance liquid chromatography with diode-array detection* (em português, cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos)
HSCCC: *High speed countercurrent chromatography* (em português, cromatografia contracorrente de alta velocidade)
IA: inteligência artificial
IE: *electron ionization* (em português, Impacto por elétrons/electron ionization)
K: Coeficiente de distribuição ou partição
LCMS: *Liquid chromatography-mass spectrometry* (em português, cromatografia líquida-espectrometria de massas)
m/z: Razão massa-carga
MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCF-7: *Michigan Cancer Foundation-7* (em português, fundação de cancer de Michigan)
MDCCC: *Multidimensional countercurrent chromatography* (em português, cromatografia contracorrente multidimensional)

MIT: Tecnologia de impressão molecular (em português, tecnologia de impressão molecular)
MPLC: *Medium pressure liquid chromatography* (em português, cromatografia líquida de média pressão)
Mpro: *Main proteases* (em português, protease principal)
MS: *mass spectrometry* (em português, Espectrômetro de Massas/Espectrometria de massas)
NIST: *National Institute of Standards and Technology* (em português, Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia)
NSFC: *National Natural Science Foundation of China* (em português, Fundação Nacional de Ciências Naturais da China)
PPAR γ : Ligantes sintéticos do receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma abreviado
PVB: própolis verde brasileira
QTOF: *Quadrupole time-of-flight* (em português, espectrômetro de massa de tempo de voo quadrupolo)
RBD: *Receptor-binding domain* (em português, domínio de ligação ao receptor)
RMN: Ressonância magnética nuclear
RNA: *Ribonucleic acid* (em português, ácido ribonucleico)
rpm: Rotação por minuto
Sf: *Stationary phase retention* (em português, retenção de fase estacionária)
SS: Sistema de solvente
SUF: *Scale-up factor* (em português, fator de aumento de escala)
TGA: *Thermal Gravimetric Analysis* (em português, análise termogravimétrica)
TIC: *Total ion chromatogram* (em português, cromatograma de ions totais)
 t_R : Tempo de retenção
UV: Ultravioleta
 V_c : Volume da Coluna
VLC: *Vacuum liquid chromatography* (em português, cromatografia líquida a vácuo)
 δ : Deslocamento químico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	2
2.1. Os quatorze tipos de própolis brasileira.....	2
2.2. A Própolis verde.....	6
2.3. Composição química da própolis verde	12
2.3.1. As ceras	12
2.3.2. Derivados Cinâmicos	13
2.3.3. Os Triterpenos.....	15
2.3.4. Os Flavonoides	17
2.3.5. Os Lipídeos fenólicos e derivados	18
2.4. Atividade antiviral contra SARS-CoV2.....	20
2.5. Atividade Anticâncer	21
2.6. A cromatografia contracorrente (CCC)	23
2.6.1. Fracionamento da própolis brasileira por CCC.....	28
3. OBJETIVOS	31
3.1. Objetivo geral.....	31
3.2. Objetivos específicos	31
4. CAPÍTULO I - ISOLAMENTO POR CROMATOGRAFIA CONTRACORRENTE DE BIOMARCADORES DE PRÓPOLIS VERDE: POTENCIAIS BLOQUEADORES DE INTERAÇÃO RBD e ACE2 do SARS-COV-2.	33
4.1. Introdução	35
4.2. Materiais e métodos	36
4.2.1. Solventes e Reagentes.....	36
4.2.2. Preparação de extratos brutos de própolis verde.....	36
4.2.3. Equipamento de cromatografia contracorrente de alta velocidade.....	36
4.2.4. Seleção de sistema de solvente bifásico para fracionamentos de HSCCC.....	37
4.2.5. Procedimento de separação por HSCCC	39
4.2.6. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).....	40
4.2.7. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	40
4.2.8. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	40
4.2.9. Ensaios de interação SARS-CoV-2 RBD e ACE2.....	40
4.2.10. Ensaio de citotoxicidade Vero E6	41
4.3. Resultados e Discussão	41
4.3.1. Separação de biomarcadores de própolis por HSCCC	41
4.3.2. Inibição da formação do complexo RBD:ACE2 por extratos de própolis verde brasileira e seus biomarcadores isolados	49
4.4. Conclusões	50
5. CAPÍTULO II - ISOLAMENTO SELETIVO DE ARTEPILINA C DA PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA POR CROMATOGRAFIA CONTRACORRENTE	52
5.1. Introdução	54
5.2. Materiais e métodos	56
5.2.1. Solventes e Reagentes.....	56
5.2.2. Preparação dos extratos brutos	56

5.2.3. Aparelho de cromatografia em contracorrente de alta velocidade.....	56
5.2.4. Seleção do sistema de solvente para fracionamento por HSCCC	56
5.2.5. Procedimento de separação por HSCCC	57
5.2.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	59
5.2.7. Análise por LC-ESI-MS/MS	59
5.2.8. Análise quimiométrica usando o mass profiler profissional (MPP).....	59
5.3. Resultados e Discussão	59
5.3.1. Extração seletiva da artemilina C por HSCCC com um sistema de solventes composto por solvente orgânico-solução aquosa de Na ₂ CO ₃ a 5%.....	60
5.3.2. Extração seletiva da artemilina C por HSCCC com um sistema de solventes composto por solvente orgânico-solução de NaHCO ₃ a 4%	62
5.3.3. Perfil cromatográfico (<i>fingerprint</i>) por LC-MSMS dos metabólitos presentes na fração do EEPV por HSCCC.....	65
5.4. Conclusões	76
6. CAPÍTULO III – EMPREGO DA CROMATOGRAFIA CONTRA CORRENTE MULTIDIMENSIONAL NO ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA	78
6.1. Introdução	80
6.2. Materiais e métodos	81
6.2.1. Solventes e Reagentes.....	81
6.2.2. Preparação dos extratos brutos da própolis verde	81
6.2.3. Equipamento de cromatografia contracorrente de alta velocidade.....	81
6.2.4. Seleção do sistema de solvente para fracionamento por HSCCC	81
6.2.5. Procedimento de separação por HSCCC	84
6.2.6. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-PDA).....	85
6.2.7. Análise LC-ESI-MS/MS	85
6.2.8. Cromatografia de permeação em gel (CPG).....	86
6.2.9. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)	86
6.2.10. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	86
6.2.11. Ensaio de viabilidade celular por redução de MTT dos extratos de própolis brasileira e substâncias isoladas dos fracionamentos em CCC	86
6.3. Resultados e Discussão	87
6.3.1. Separação dos metabólitos especiais do extrato etanólico de própolis por CCC1 com sistemas aquosos.....	87
6.3.2. Isolamento, purificação e identificação dos fenilpropanoides das frações obtidas em CCC1 ...	92
6.3.3. Separação, isolamento e identificação de flavonoides das frações obtidas em CCC1	94
6.3.4. Separação, isolamento e identificação substâncias apolares das frações reunidas por CCC2 multidimensional	96
6.4. Conclusões	102
7. CONCLUSÕES FINAIS.....	103
8. REFERÊNCIAS.....	105
8. APÊNDICES.....	137

1. INTRODUÇÃO GERAL

Para garantir uma melhor compreensão do conteúdo apresentado, esta tese está organizada em seções que facilitam sua análise e consulta. Ela inclui uma revisão geral do tema, três capítulos que discutem metodologias e resultados, uma conclusão geral e um apêndice organizado em consonância com os capítulos. Essa estrutura permite que o leitor aprecie detalhadamente os assuntos tratados. A conclusão final, apresentada no item 7, sintetiza as principais reflexões e implicações provenientes dos capítulos, oferecendo uma visão abrangente e integrada do estudo realizado.

A pesquisa realizada foi estruturada de três formas: isolamento de metabolitos especiais da própolis verde, artepilina C e bacarina, conhecidos como biomarcadores, presentes nos extratos hexânico por cromatografia contra corrente (**Capítulo I**); isolamento seletivo da artepilina C do extrato etanólico por CCC usando solução básica (**Capítulo II**), e o estudo químico da própolis verde com isolamento de substâncias por cromatografia contracorrente multidimensional, alternado-se sistemas de solventes aquosos e não-aquosos e modos de eluição (**Capítulo III**). Além disso, avaliou-se o efeito das principais substâncias isoladas quanto à inibição da interação entre o domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína *spike* e o receptor da proteína ACE2 foi avaliada pelo imunoenensaio Lumit™ (**Capítulo I**), e também foram realizados um estudo bioguiado das frações obtidas por CCC em modelos de câncer de mama (**Capítulo III**).

Cabe destacar que a escolha de iniciar o isolamento dos biomarcadores no extrato hexânico da própolis foi decidido em função da menor complexidade deste extrato, que apresenta um perfil químico mais limitado em substâncias fenólicas em comparação ao extrato etanólico, quando avaliados por HPLC-PDA e CCD. Embora no trabalho apresentado por Pires & Castro (2023) o teor do biomarcador, artepilina C, não tenha sido, significativamente diferente, no extrato hexânico ou etanólico. Então, no **Capítulo I**, será discutido o desenvolvimento da metodologia de CCC para o isolamento e a purificação da artepilina C e bacarina no extrato hexânico da própolis verde.

No **Capítulo II**, são evidenciados os desafios do trabalho com o extrato etanólico, uma vez que os sistemas de solventes para CCC anteriormente testados, precisaram ter uma otimização da metodologia devido à complexidade deste extrato mais polar, rico em substâncias fenólicas. Diante disso, foi implementada uma estratégia de extração seletiva utilizando solução básica (NaHCO_3) na tentativa de isolar a artepilina C em uma única etapa. O acompanhamento da separação foi feito cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fotodiodo (HPLC-PDA) com monitoramento *off-line* por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de tempo de voo (LCMS-QTOF).

No **Capítulo III**, são mostrados e discutidos os resultados do estudo fitoquímico do extrato etanólico da própolis verde por cromatografia contracorrente multidimensional utilizando sistemas aquosos e não aquosos para o isolamento de outras substâncias presentes nesta matriz apícola complexa. Assim, a inovação e a metodologia abordada neste trabalho contribui significativamente para o desenvolvimentos das pesquisa na área de produtos naturais e cromatografia contracorrente, em especial, para as pesquisas sobre a própolis brasileira

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Os quatorzes tipos de própolis brasileira

A própolis possui uma longa história de utilização pelo ser humano que remonta à antiguidade. Evidências históricas revelam que os egípcios faziam uso desse produto apícola em processos de mumificação, aproveitando suas notórias propriedades conservantes e antimicrobianas (HALVACI *et al.*, 2023). Aristóteles e Plínio reconheceram as propriedades medicinais da própolis, e Hipócrates, considerado o pai da medicina moderna, foi utilizado para curar feridas e úlceras (ACITO *et al.*, 2025).

No Brasil, a primeira publicação significativa sobre a própolis ocorreu em 1984, destacando um estudo comparativo entre o efeito da própolis e antibióticos na inibição de *Staphylococcus aureus*. Os resultados demonstraram que a própolis brasileira tinha uma atividade superior à de diversos antibióticos testados. Desde então, a própolis começou a ser amplamente pesquisada, especialmente, por suas propriedades biológicas, incluindo atividades antimicrobianas e antioxidantes que a consolidou como um produto relevante tanto na apicultura quanto na fitoterapia brasileira (PEREIRA *et al.*, 2022).

A *Apis mellifera*, ou abelha-europeia, é a principal responsável pela produção de própolis. Com uma história que se estende por mais de 4.500 anos e registros de apicultura desde o Egito Antigo (**Figura 1**), essas abelhas se destacam na apicultura moderna e na produção agrícola, especialmente devido à sua adaptação a diversos ambientes e ao desenvolvimento de várias raças (EL-SEEDI *et al.*, 2022).



Figura 1-Relevos sobre apicultura no túmulo de Pabasa e do Templo de Karnak (EL-SEEDI *et al.*, 2022).

A apicultura no Brasil começou na primeira metade do século XIX com a introdução das abelhas da espécie *A. mellifera* na região Sul, realizadas por Pe. Antônio Carneiro, que as trouxe de Portugal. As populações de abelhas no Brasil antes de 1950, predominantemente de origem europeia, sofreram significativas mudanças a partir de 1956 com a introdução das abelhas africanas (*A. mellifera scutellata*) no sudeste do país. Este evento desencadeou um processo de africanização, resultado da fuga acidental de abelhas rainhas africanas, que afetou as colônias locais nas regiões sul, sudeste, centro-oeste e nordeste. Desde então, a apicultura brasileira evoluiu, dando origem a

populações híbridas de abelhas africanizadas, que se adaptaram bem ao clima e às condições locais (PARK *et al.*, 2002; PIRES, 2019).

As abelhas do gênero *Apis* (**Figura 2**) desempenham um papel crucial na produção de própolis, mel e cera, especialmente no Brasil, onde contribuem significativamente para a economia global, estimando-se que esse valor ultrapasse £ 100 bilhões anualmente, principalmente por meio da polinização e produção de mel (VISICK *et al.*, 2023). As abelhas, ao viverem em colônias organizadas e por terem funções específicas, desempenham um papel crucial na coleta de resinas de fontes vegetais, essenciais para a composição e qualidade da própolis. O Brasil, com sua diversidade de biomas, propicia uma variedade de fontes botânicas que resultam em uma riqueza química singular na própolis, amplamente reconhecida em âmbito internacional. A vasta literatura a esse respeito ressalta não apenas seu valor econômico, mas também seu potencial biológico (BANKOVA *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2024).



Figura 2-Abelhas com resina (à esquerda) e pólen (à direita) nas patas traseiras (BANKOVA *et al.*, 2016).

A importância de aprofundar o conhecimento a respeito da própolis brasileira produzida por essas abelhas ganhou destaque durante a primeira onda da pandemia de SARS-CoV-2. Evidências clínicas indicaram que o extrato padronizado de própolis verde brasileira (PVB) poderia reduzir o tempo de internação hospitalar em pacientes adultos com COVID-19 (SILVEIRA *et al.*, 2023). Investigações subsequentes buscaram avaliar a eficácia persistente deste insumo natural e avaliar seus compostos bioativos, ampliando o conhecimento acerca de intervenções terapêuticas frente à pandemia principalmente para a PVB (SANTOS *et al.*, 2024; KUMAR *et al.*, 2023; FIORINI *et al.*, 2021). Contudo, o Brasil tem uma extensão continental e uma pluralidade de ecossistemas (FRANCHIN *et al.*, 2024). Dada a ampla diversidade da flora brasileira, as amostras de própolis são classificadas em 14 grupos, com base na origem geográfica, fonte botânica e composição química: cinco grupos no Sul, seis no Nordeste, uma na região Sudeste, a “própolis vermelha”, recentemente adicionada e proveniente de estados do Nordeste, bem como um tipo de própolis da região Amazônica (COSTA *et al.*, 2020). No estudo de Toreti e colaboradores (2013) eles foram catalogados em grupos nomeados por cores e regiões. Para a região sul foram Grupo 1 (RS5) Amarelo Sul; Grupo 2 (RS1) Marrom Sul, Grupo 3 (PR7) Marrom Escuro Sul, Grupo 4 (PR8) Marrom Sul, Grupo 5 (PR9) Marrom Esverdeado Sul e para a região Nordeste Grupo 6 (BA11) Marrom Avermelhado, Grupo 7 (BA51) Marrom Esverdeado, Grupo 8 (PE5) Marrom Escuro, Grupo 9 (PE3) Amarelo, Grupo 10 (CE3) Amarelo Escuro, Grupo 11 (PI11) Amarelo para o Nordeste. A **Figura 3** ilustra a diversidade dos biomas brasileiros e a origem de 8 tipos de própolis brasileira, ressaltando suas principais substâncias bioativas (FRANCHIN *et al.*, 2024).

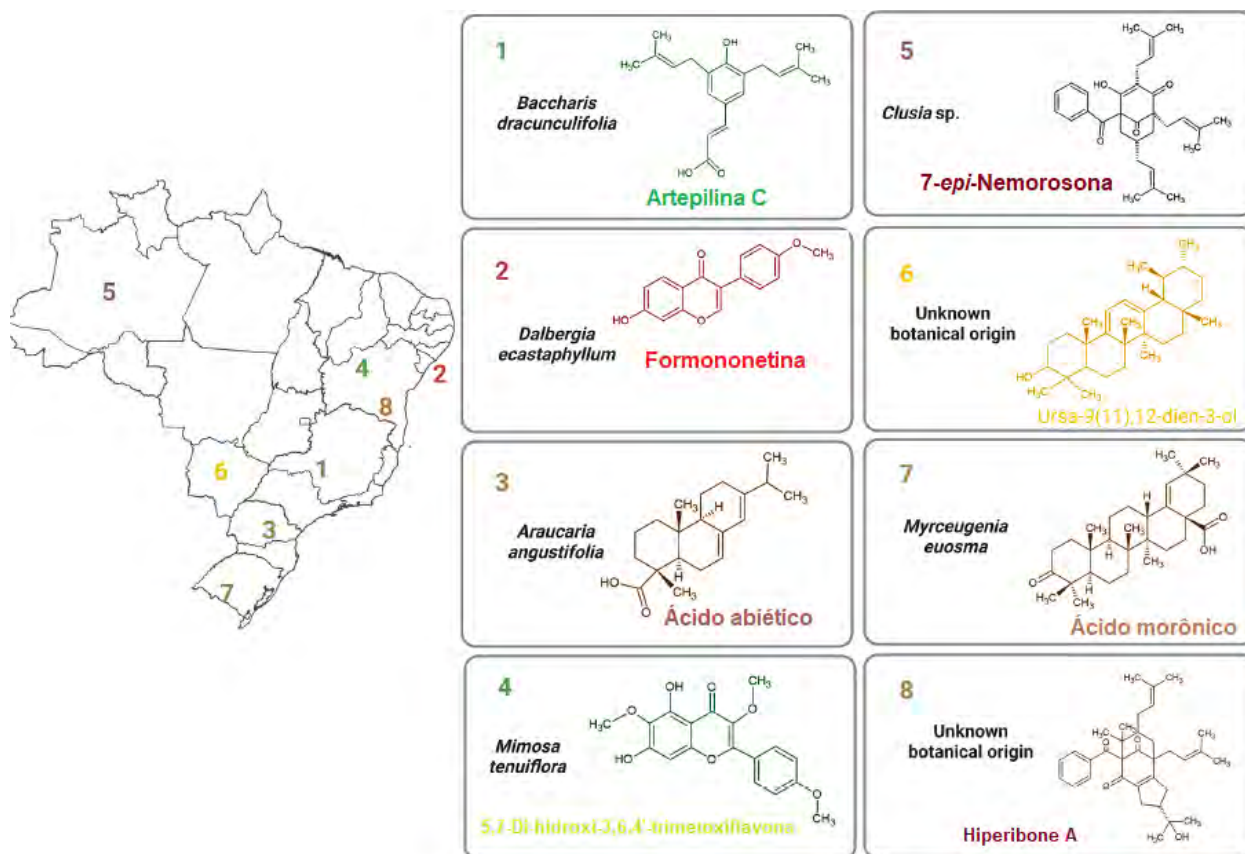


Figura 3-Representação ilustrativa dos locais onde são produzidas algumas própolis brasileiras, com a respectiva fórmula estrutural das principais substâncias e origens botânicas, quando conhecidas Adaptado de FRANCHIN *et al.*, 2024.

Uma das própolis brasileiras mais produzidas e comercializadas é a própolis verde, característica da região sudeste do Brasil, produzida por abelhas *Apis mellifera* a partir de resinas coletadas de brotos de *Baccharis dracunculifolia* (SALATINO *et al.*, 2021). Outra própolis que vem ganhando destaque por sua composição química e propriedades biológicas é a vermelha, produzida na região costeira do Nordeste do Brasil, caracterizada pelo habitat de manguezal, cuja fonte botânica é uma mistura de resinas de *Dalbergia ecastaphyllum* e *Symphonia globulifera*. Além disso, a própolis marrom é uma das mais complexas do ponto de vista químico, onde diversas fontes botânicas foram relatadas na composição desta própolis, com *Araucaria angustifolia*, *Eucalyptus spp.* e *B. dracunculifolia*, entre outras (COSTA *et al.*, 2020). A própolis verde é especialmente reconhecida por suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, enquanto a própolis vermelha se destaca por suas atividades anticancerígenas. Em contrapartida, a própolis marrom apresenta propriedades anti-inflamatórias e antiparasitárias (RIBEIRO *et al.*, 2024; MESSIAS *et al.*, 2023).

Muitos estudos comparam a composição fenólica e a capacidade antioxidante dos extratos da própolis vermelha, marrom e verde, no entanto, existe uma carência de pesquisas dedicadas à própolis marrom (VIEIRA *et al.*, 2023; RAJAN *et al.*, 2021). A própolis marrom, advinda de regiões como Bahia, Paraná, Minas Gerais e Sergipe, apresenta uma diversidade química que inclui compostos como α -pineno, α -bisabolo, hidrocarbonetos, aldeídos e monoterpenos, influenciada pela flora local. No estado do Paraná, a própolis é majoritariamente extraída da resina da árvore *Araucaria sp.*, cuja presença é marcante nas florestas da região sul do Brasil. Esta resina destaca-se por sua composição rica em diterpenos ácidos, que conferem à própolis uma variedade de atividades biológicas relevantes, incluindo propriedades “antimicrobianas”, antiparasitárias e “citotóxicas” em relação a linhagens de células cancerígenas (SANTOS *et al.*, 2021; ESPERANDIM *et al.*, 2023). Os compostos bioativos

dessa própolis podem ter efeitos leishmanicidas e anti-inflamatórios, variando significativamente conforme a região de coleta, o que a torna um interessante objeto de estudo para aplicações terapêuticas (OLIVEIRA *et al.*, 2023; RIBEIRO *et al.*, 2022, RIBEIRO *et al.*, 2024).

Existe uma escassez de estudos sobre a própolis da região sul do Brasil. Essa própolis tem como principal origem botânica a *Myrceugenia euosma*, cujo cultivo está estabelecido em áreas próximas à fronteira com o Uruguai. Conhecida pela sua riqueza em flavonoides, como galangina, apigenina, crisina, pinobanksina e pinocembrina (**Figura 4**), a própolis sulista também contém triterpeno pentacíclico chamado de ácido morônico, considerado a substância principal. Outros componentes importantes incluem a meliferona, um triterpeno incomum, além de ácidos anwuveizônico, betulônico e várias substâncias aromáticas (VALENÇA *et al.*, 2021).

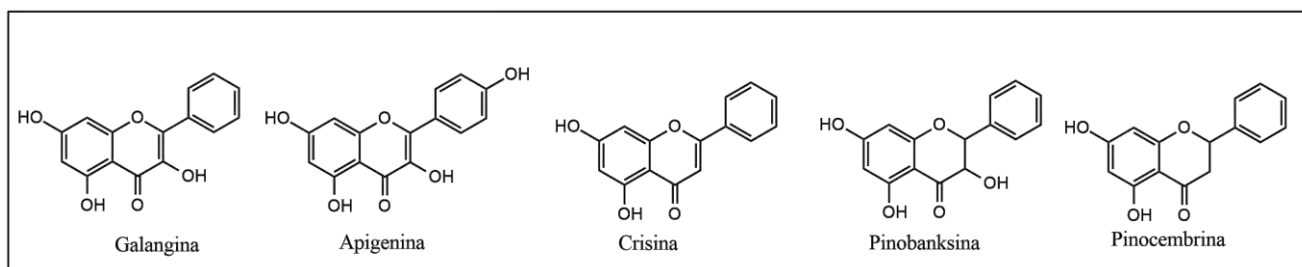


Figura 4-Flavonoides presentes na própolis sulista (VALENÇA *et al.*, 2021).

A maioria da literatura científica sobre própolis tem se concentrado nos últimos 30 anos, caracterizando a pesquisa nesse campo como relativamente nova. Isso pode explicar a ausência de estudos sobre a própolis preta, produzida nas proximidades de Manaus, na Floresta Amazônica. Essa variedade química contém substâncias como benzofenonas poliisopreniladas, incluindo xantochimol e 7-*epi*-nemorosona, apresentando um perfil semelhante ao da própolis de origem venezuelana e cubana, ambos derivados de exsudatos de flores da espécie *Clusia* (**Figura 5**). Além disso, a própolis preta é composta, principalmente, por constituintes como hiperibone A, 7-*epi*-clusianona e gambogenona, que merecem investigação mais aprofundada (SALATINO *et al.*, 2021; ISHIDA *et al.*, 2011).

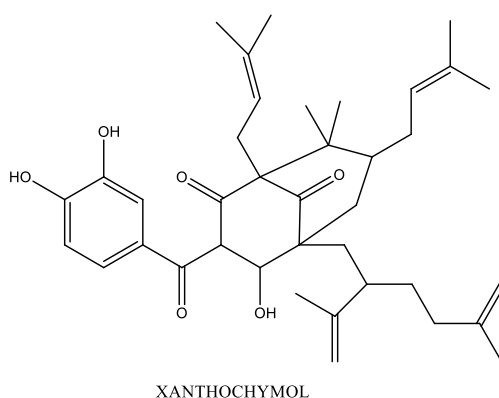


Figura 5-Benzofenona poliprenilada de própolis preta (SALATINO *et al.*, 2021)

Os triterpenoides possuem ocorrência em diversas amostras de própolis brasileira, destacando-se na própolis amarela do bioma Pantanal, no Mato Grosso do Sul, que contém quinze triterpenoides identificados, incluindo α - e β -amirina, ursadienol, lupenona, oleanona e botulina, além de esteroides como lanosterol, cuja origem botânica permanece incerta (MACHADO *et al.*, 2016). Por outro lado, a própolis proveniente de Teresina, Piauí, é composta por triterpenoides

cicloartânicos, como os ácidos isomangiferólico, mangiferólico, mangiferônico, ambônico e ambólico, sugerindo a *Mangifera indica* como uma possível fonte botânica (SILVA *et al.*, 2005).

A própolis do Rio Grande do Norte (RN), apresenta altos níveis de flavonoides, principalmente flavonóis e chalconas com grande similaridade entre o perfil químico da própolis RN e dos ápices caulinares da 'jurema-preta' (*Mimosa tenuiflora*, Leguminosae, Mimosoideae) (FERREIRA *et al.*, 2017). Outras variantes, como a própolis escura, proveniente da resina da jurema preta (*Mimosa hostilis Benth*) (Figura 6), que cresce em regiões ao norte do país, têm sido estudadas por Marcucci e pesquisadores (2020), Vieira e colaboradores (2023) e Cunha (2018), que identificaram o ácido 3,4-di-hidroxibenzóico, a rutina e o ácido *trans*-cinâmico como compostos significativos para suas propriedades antioxidantes e antibacterianas. Adicionalmente, a própolis verde da Caatinga, derivada de *Mimosa tenuiflora*, foi recentemente analisada e revelou uma rica composição de flavonóis e chalconas (SARTORI *et al.*, 2024; SON *et al.*, 2022, SON *et al.*, 2023, SON *et al.*, 2024). Apesar da relevância de tais estudos, a própolis brasileira ainda não recebe a consideração acadêmica merecida.



Figura 6- Aspectos de quatro própolis brasileiras. Adaptado de MARCUCCI *et al.*, 2020.

Diante disso, ressalta-se a imperativa necessidade de investigação das aplicações farmacológicas e da composição das diversas própolis brasileiras, tendo em vista que esta matriz figura entre os produtos naturais mais renomados e utilizados na atualidade (MAROOF *et al.*, 2023). Esse enfoque ressalta o Brasil como um país de elevado potencial para a descoberta de terapias inovadoras no tratamento de diversas enfermidades.

2.2. A Própolis verde

A própolis verde é reconhecida por sua coloração esverdeada, oriunda da coleta das folhas e brotos de *Baccharis dracunculifolia* pelas abelhas *Apis mellifera* (Figura 7). Esta planta, comumente denominada alecrim-do-campo, pertence à família Asteraceae e é nativa das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, prosperando em áreas de cerrado e pastagens abandonadas (RIBEIRO *et al.*, 2023; SFORCIN *et al.*, 2012; HOSSAIN *et al.*, 2022). O arbusto, que pode atingir até quatro metros de altura, apresenta folhas revestidas por tricomas tectores e glandulares, fundamentais para sua defesa contra herbívoros. Ademais, as secreções salivares dessas abelhas conferem à própolis características distintivas, potencializando seu valor como recurso natural. A atividade apícola brasileira, impulsionada pela rica biodiversidade do país, desponta como um setor promissor no mercado internacional, possibilitando a oferta de uma diversidade de produtos apícolas (QUEIROGA *et al.*, 2014; STURM, 2019; SON *et al.*, 2022; HERRERA-LÓPES *et al.*, 2020).



Figura 7-Abelha *Apis mellifera* coletando resina de *B. dracunculifolia* para a produção de própolis (TOMAZZOLI *et al.*, 2020)

O interesse econômico da própolis verde é evidenciada, tanto pela sua exportação quanto pelo crescente interesse acadêmico (VIERA *et al.*, 2024), conforme demonstrado na pesquisa realizada na *web of science* com a palavra-chave "própolis verde" na última década que gerou 448 publicações indexadas na plataforma. Para essa pesquisa as publicações de TAIWAN foram excluídas devido a existência do nome propolis verde taiwanesa que não tem relação com a PVB. Nessa pesquisa, foi possível verificar que as agências de fomento brasileiras, como o CNPq, CAPES e FAPESP, destacam-se como as principais financiadoras de pesquisas nessa área. Além disso, o Japão apresenta um significativo engajamento, contribuindo com cerca de 20% do total de fomento, apoiado por instituições como o Ministério da Educação, Cultura, Esportes, Ciência e Tecnologia e a Sociedade Japonesa para a Promoção da Ciência. Este vínculo é reforçado pela alta exportação de própolis verde para o país (VIERA *et al.*, 2024). Por último, a Fundação Nacional de Ciências Naturais da China (NSFC) é responsável por 3,5% do apoio em pesquisas nessa área. O Brasil se destaca em termos de interesse acadêmico, liderando a quantidade de publicações na última década sendo esse quantitativo em 255 publicações, o que representa 57% do total. Em seguida, encontram-se o Japão (67), a China (36) e os Estados Unidos com apenas 20, conforme apresentado na **Figura 8**. Este desempenho mostra a relevância do Brasil no cenário acadêmico global.



Figura 8- Colaboração nacional e internacional na produção de publicações científicas sobre própolis verde na última década (<https://www-webofscience-com.ez30.periodicos.capes.gov.br/>). Própria autoria.

Um aspecto bem interessante das publicações acadêmicas do Vietnã (7° na classificação da **Figura 8**) é que 50% delas estão focadas no Própolis Verde da Caatinga (*Mimosa tenuiflora*). Além disso, destaca-se a empresa Apis Flora Indl Coml Ltda, por ocupar a quarta posição em relevância nos estudos sobre este tipo de própolis. Tal interesse reflete o *status* da empresa como líder no mercado nacional de produtos apiterápicos, bem como seu compromisso com a internacionalização, realizando exportações para 20 países, incluindo China, Estados Unidos, Japão e Argentina (SILVEIRA *et al.*, 2022).

Ao observar brevemente as 448 publicações geradas na *web of science* foi possível verificar que a literatura dispõe até o presente momento de muitas revisões abordando sobre própolis verde, muitos trabalhos sobre composição e aplicação das propriedades farmacológicas em diversas áreas. Porém, não é possível observar cada uma dessas 448 publicações sobre o conteúdo que cada uma delas abordam. Para isso, quantificar tal análise pode ser realizado utilizando técnicas de cienciometria, especialmente o método bibliométrico de revisões da literatura onde, com o uso de ferramenta de inteligência artificial (IA), é possível lidar com um grande volume de dados e produzir uma pesquisa de grande impacto (DONTU *et al.*, 2021). De maneira geral, métodos bibliométricos são destinados a fornecer dados quantitativos sobre artigos escritos e publicados na literatura.

A revisão bibliográfica neste estudo empregou prospecções tecnológicas com redes bibliométricas conforme apresentado na **Figura 9**. A bibliometria é uma ferramenta essencial na pesquisa científica, pois utiliza métodos quantitativos para analisar dados de publicações (MARINHO *et al.*, 2023). Ao estudar a produção científica, promove a identificação de tendências e padrões em campos específicos do conhecimento, enriquecendo a compreensão sobre a evolução de temas diversos no mundo acadêmico. Essa análise permite, por exemplo, avaliar a relevância de periódicos, mapear a colaboração entre autores e instituições, e destacar áreas de pesquisa emergentes, contribuindo assim, para orientar futuras investigações e políticas científicas conforme apresentado nos periódicos de WAHID e colaboradores (2024); HELENO e pesquisadores (2023); AGUIRRE-RODRÍGUEZ e estudiosos (2024); GUEDES e demais autores (2024) e BIANCHI e pesquisadores (2023).

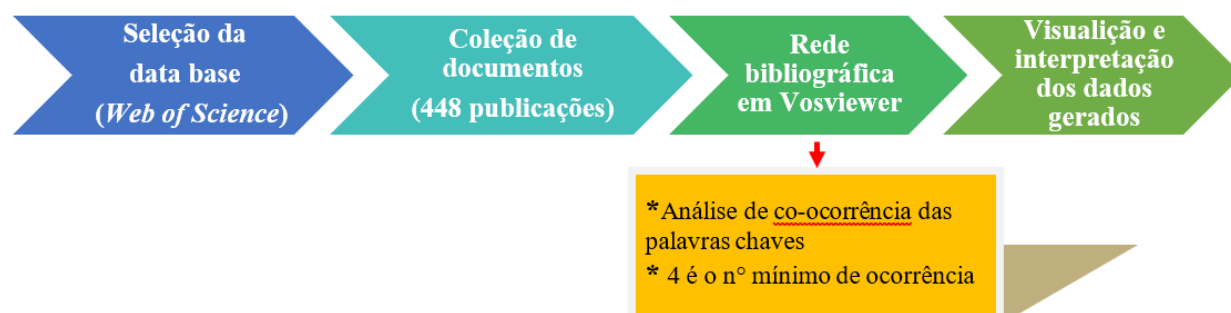


Figura 9 - Modelo de mapeamento das principais tendências e lacunas na pesquisa sobre a própolis no Brasil. Própria autoria.

A análise das citações geradas nesta pesquisa pela base de dados da *web of science* permitiu a identificação de instituições influentes, autores prolíficos, países que se destacam na pesquisa e periódicos de renome. Essa abordagem sistemática tem sido amplamente aplicada em diversos temas, contribuindo para o entendimento do *status* científico e das áreas que exigem maior atenção (TAVARES *et al.*, 2024).

A análise dos dados bibliométricos foi realizada através do *software* VOSviewer versão 1.6.19 (Copyright © 2023 Centre for Science and Technology Studies, Leiden University, The Netherlands). O VOSviewer é um *software* de inteligência artificial especializado na construção e visualização de redes bibliométricas, projetado para rastrear co-ocorrências e co-autorias de termos relevantes em literatura científica. Com essa ferramenta, é possível identificar tendências e lacunas na literatura analisada, o que fundamenta o desenvolvimento de pesquisas subsequentes. A criação de redes bibliométricas através do VOSviewer permite a visualização e análise de padrões e tendências em conjuntos de documentos acadêmicos, facilitando a exploração das inter-relações entre diferentes áreas de conhecimento (STEFANIS *et al.*, 2023).

Essa análise pode revelar informações importantes sobre o campo de estudo, como: (i) Co-autoria: identificar grupos de autores que trabalham em conjunto regularmente e analisar as redes de colaboração científica; (ii) Co-ocorrência de palavras-chave: entender quais conceitos ou tópicos são frequentemente discutidos juntos, o que pode fornecer uma visão geral das tendências de pesquisa em um campo; (iii) Citações: examinar quais documentos são frequentemente citados juntos para entender a estrutura de um campo de pesquisa, identificar trabalhos fundamentais ou influentes e perceber como as ideias fluem através do campo; (iv) Análise de co-citação: identificar grupos de documentos que são frequentemente citados juntos, o que pode indicar a existência de subcampos ou tópicos de pesquisa específicos. Essas visualizações podem ajudar pesquisadores a entender melhor o campo de estudo, identificar tendências emergentes, reconhecer lacunas na literatura existente, e determinar possíveis direções para futuras pesquisas (OLIVEIRA, 2023).

Para o levantamento bibliográfico acerca da própolis verde, inicialmente foi utilizada a plataforma *web of science*. Dentre as plataformas, optou-se essencialmente pela *web of science* utilizando como tópico as palavras “green propolis” ou “brazillian green propolis”. para esta pesquisa foi excluído o país Taiwan, por possuir uma própolis verde tailandesa. Após análise realizada no intervalo de 2014 a 2025 (última década) foram encontrados 448 publicações. Foram analisadas co-ocorrência total de 2195 palavras-chaves, considerando 4 como o número mínimo de ocorrências para cada palavra-chave, e com isto chegou-se a 203 palavras, que possibilitou uma melhor visualização das interações entre os trabalhos de própolis verde. Criou-se o mapa de interações entre os grupos e a análise de *clusters* para mapear os estudos da própolis verde empregando o método de distribuição do gráfico “Fractionation”, ferramenta disponível dentro do *software* da IA para melhorar a visualização dos dados gerados.

As linhas que conectam palavras-chave revelam uma relação significativa entre elas, indicando que ocorrem frequentemente em documentos relevantes. O tamanho dos círculos revelam os temas de maior relevância e publicações, quanto maior seu tamanho, maior o número de publicações no tema. A distância física entre os círculos também reflete essa dinâmica: quanto mais afastados, menos relevante é a conexão entre os termos. Os clusters são formados por palavras-chave que frequentemente aparecem juntas, e nessa pesquisa resultou-se em 3 clusters que frequentemente aparecem juntas tendo uma relação temática entre si (DONTU *et al.*, 2021). Portanto, os clusters agrupam palavras-chave de uma mesma área temática, e mostra relações de uma área com a outra através de conexões de palavras-chave de clusters diferentes demonstrando a existência de relações entre áreas em um campo de pesquisa (LIM *et al.*, 2024).

Através dessa análise, formaram-se três *clusters* distintos (**Figura 10**) : o vermelho onde se concentra a composição química da própolis verde, especialmente em relação à artepilina C; o verde, que aborda investigações biológicas envolvendo testes *in vivo*, para doenças/condições como Alzheimer, Covid-19, diabetes, obesidade, colite intestinal, resistência a insulina e leishmaniose; e o azul, que compara a própolis verde com variantes de outros países (Turquia, China, Bulgária, Cuba), além de explorar atividades antitumorais *in vitro*. Essas informações revelam a diversidade e relevância das pesquisas sobre a própolis verde no cenário científico.

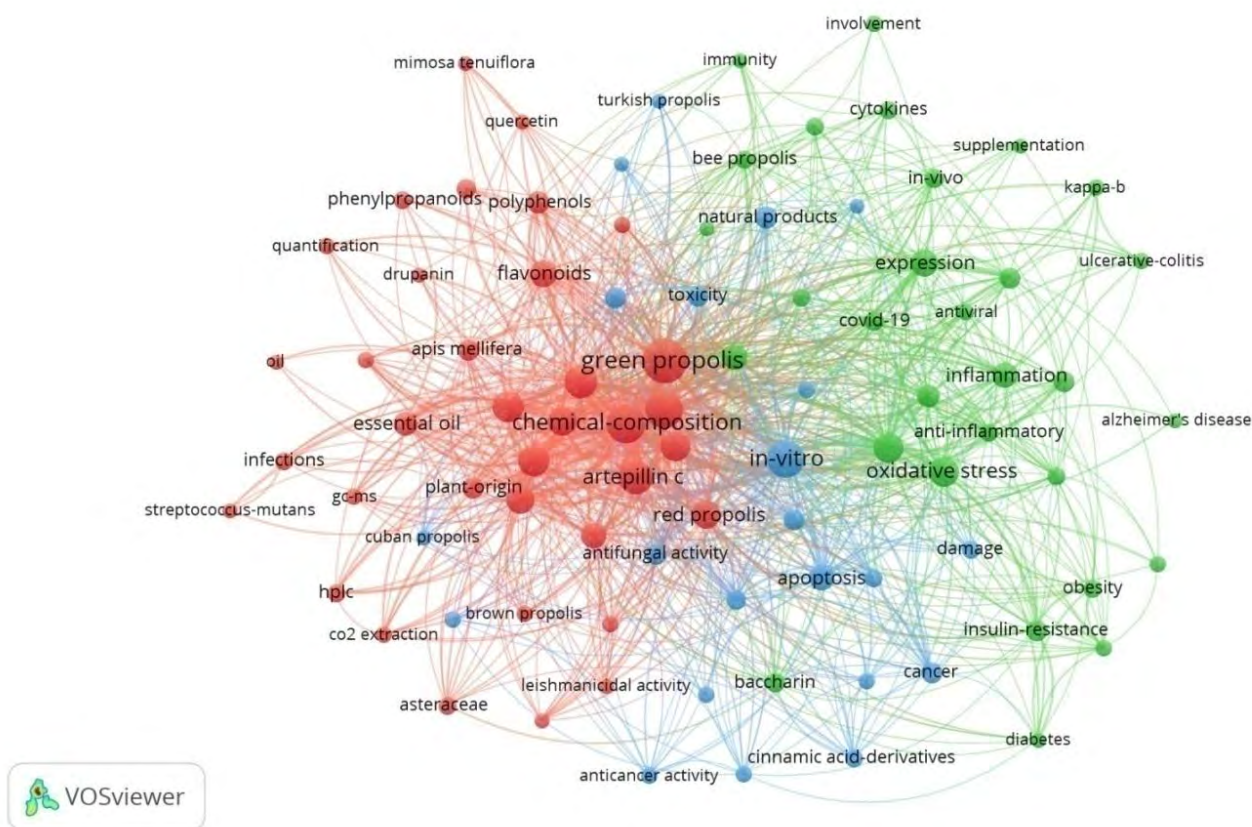


Figura 10-Mapa bibliométrico obtido pelo *software* VOSviewer versão 1.6.16 (<https://www.vosviewer.com>), usando “green propolis” como palavras-chave, registrado no banco de dados *web of science* no período de 2014 a 2025 (realizado em 8 de outubro de 2024).

O *cluster* vermelho, considerado o mais relevante, possui grandes círculos interligados aos temas de composição química, comparações entre própolis verde e vermelha. A distância do círculo vermelho da própolis marrom do centro dos principais estudos dão um índice da escassez de pesquisa

entre as três própolis (vermelha e marrom e verde) nas 448 publicações avaliadas, e a ausência das demais própolis brasileiras são um indicio do quão escasso é a compreensão das demais própolis encontrados em nosso país. As substâncias artepilina C e os flavonoides concentram a maior parte das pesquisas nas 448 publicações geradas, no entanto, a drupanina e os óleos essenciais tem possuído pouca relevância com menor ocorrência na literatura científica. É possível destacar na figura estudos sobre o preparo de extrato etanólico da "própolis verde", em detrimento de outros extratos, como hexânico ou aquoso. A escolha do solvente para preparação do extrato de própolis é muito importante, pois solventes distintos solubilizam e extraem substâncias com diferentes polaridades da própolis. O método de preparo de extratos também influencia a atividade biológica do produto (SFORCIN *et al.*, 2017). Atualmente, sistemas solventes eutéticos naturais, formados por uma combinação de cloreto de colina com ácidos orgânicos, açúcares e álcoois, em proporções específicas, que se assemelham ao ambiente intracelular das plantas demonstraram ser eficazes na extração de substâncias fenólicas, apresentando alta atividade antioxidante e antimicrobiana. As combinações mais promissoras utilizadas no trabalho de Lazović e pesquisadores (2024) foram colina-cloreto: ácido tartárico (1:1), glicerol:ácido láctico (1:1) e glicina:ácido láctico (1:3), embora não apareça na rede bibliográfica são importantes estudos realizados na área.

Além disso, dentre os materiais mencionados no agrupamento vermelho, as palavras-chave como "identificação", "quantificação" e "controle de qualidade" são essenciais para entender os componentes dessa matriz e possibilitar uma padronização que facilite o consumo no mercado. A crescente demanda por produtos naturais, como a própolis, reflete um interesse significativo nas suas propriedades e benefícios (ZHU *et al.*, 2024;). Este cenário acarreta a necessidade de estabelecer critérios rigorosos para a padronização química das diversas variedades de própolis. Nesse contexto, as técnicas cromatográficas e hifenizadas, dentre elas HPLC-PDA, LCMS e GC-MS, destacam-se como ferramentas essenciais para a caracterização do perfil químico da própolis. Essas metodologias possibilitam não apenas a identificação, mas também a quantificação dos constituintes bioativos, contribuindo para a garantia de qualidade e eficácia dos produtos derivados dessa substância (COELHO *et al.*, 2017). Além disso, a produção de "biofilmes" à base de própolis verde observado nesse agrupamento vermelho, com propriedades bactericidas e ação contra cepas multirresistentes como *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, tem recebido atenção significativa na última década (MECCATTI *et al.*, 2023).

O agrupamento em azul destaca pesquisas como a de Machato e demais autores (2016) e Yuan e colaboradores (2020) que realizaram uma análise comparativa dos perfis químicos de amostras de própolis verde e a própolis cubana. O estudo visou compreender as semelhanças e diferenças na composição química entre essas matrizes, além de investigar suas atividades biológicas. Essa comparação, como também artigos de revisão, tem se mostrado essenciais para elucidar as propriedades terapêuticas dos diferentes tipos de própolis em escala internacional e nacional.

Trabalhos inovadores têm sido apresentados na rede do *cluster* verde, destacando-se o estudo randomizado controlado de Zhao e pesquisadores (2016), que investigou os efeitos do própolis verde brasileira em indivíduos com *diabetes mellitus* tipo 2 ao longo de 18 semanas. Os participantes foram divididos em dois grupos: um recebeu 900 mg/dia de própolis verde, enquanto o outro atuou como controle. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas em marcadores como glicose sérica e hemoglobina glicada, o grupo que consumiu própolis apresentou aumentos significativos nos níveis de glutatona e polifenóis totais, sugerindo que essa resina pode ser benéfica na melhoria da função antioxidante em pacientes diabéticos.

Com o avanço das pesquisas, a complexidade desse campo tende a aumentar, exigindo uma análise mais aprofundada para integrar diferentes aspectos científicos sobre a própolis verde. Esse levantamento bibliográfico tentou esclarecer essas questões, contribuindo para a compreensão global da própolis e sua relevância nos contextos da última década.

2.3. Composição química da própolis verde

A composição química da própolis impacta fortemente em suas propriedades biológicas, e na sua caracterização que é importante para seu controle de qualidade (RIBEIRO *et al.*, 2022). A própolis é composta de resinas (50%), ceras (30%), óleos voláteis (10%), pólen (5%) além de outras substâncias (5%), como microelementos e vitaminas (B1, B2, B6, C e E). Os principais constituintes da própolis são: hidrocarbonetos superiores, álcoois; álcoois graxos de cadeia longa; ácidos graxos superiores típicos de ceras e seus ésteres; aldeídos e cetonas; terpenoides e fenilpropanoides (como ácido clorogênico e ácido cafeico); esteroides; aminoácidos; açúcares; lignanas, ácidos alifáticos; ácidos aromáticos (derivados benzóico e cinâmicos); ésteres aromáticos; flavonas e flavonoides; flavanonas; chalconas e diidrochalconas além de minerais (RIBEIRO *et al.*, 2021; SALGUEIRO, 2016).

A pesquisa sobre a própolis tem revelado uma vasta diversidade de substâncias, com mais de 300 substâncias já identificadas até o presente momento. Entre estas, destacam-se aminoácidos essenciais e fenilpropanoides que enriquecem ainda mais o perfil químico da própolis. Os principais componentes químicos não voláteis encontrados na própolis verde pertencem à classe dos polifenóis, como os ácidos fenólicos e os flavonoides (PIRES, 2019).

Uma alteração notável nas características físicas da própolis verde (textura e coloração da amostra), que deixa de apresentar dureza e profundidade do verde, tornando-se progressivamente mais cremosa e pulverulenta está atrelada a quantidade relativa de triterpenoides em sua composição. À medida que os níveis de triterpenos aumentam e os derivados típicos de chiquimato diminuem, essas propriedades visuais são observadas sendo necessário a investigação dessas substâncias apolares (derivados de cicloartenol e derivados de lipídeos fenólicos) na composição da própolis verde e nas ceras (SALATINO *et al.*, 2005).

2.3.1. As ceras

A cera de abelha é uma substância líquida secretada pelas glândulas de cera das abelhas operárias mais jovens que é usada na construção dos favos de mel. A cor da cera de abelha muda de branco para marrom-amarelado após o contato com o mel e o pólen de abelha. Ela se dissolve completamente em clorofórmio e parcialmente em álcool fervente. Geralmente, a cera de abelha consiste em mais de 300 componentes (NAINU *et al.*, 2021).

O processamento da própolis verde bruta envolve etapas relativamente simples e diretas. Após a extração do mel, os apicultores coletam a própolis raspando-a das colmeias, sendo esta frequentemente misturada com cera de abelha. Essa mistura é então enviada para processamento, e se apresentar alta quantidade de cera, deve ser lavada com água quente para a remoção da cera extrínseca, seguida por secagem ao ar. Em casos de baixa presença de cera, a mistura avança diretamente para a fase de extração, na qual a própolis é dissolvida em álcool etílico a 95%. O processo de filtração, aliado à remoção da cera, garante a eliminação eficaz de materiais indesejados e da cera remanescente, fato esse importante, porque a própolis com elevado teor de cera, em geral apresenta menor concentração de substâncias biologicamente ativas (EVRAN *et al.*, 2023).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio do “Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Extrato de Própolis” (normativa nº 9 03, de 19 de janeiro de 2001), estabeleceu requisitos rigorosos para a comercialização da própolis nacional. De acordo com a legislação brasileira, os parâmetros de qualidade exigem que a própolis bruta contenha um máximo de 25% (m/m) de ceras, e o extrato de própolis não deve exceder 1%. Essas diretrizes visam assegurar a pureza e a eficácia do produto no mercado, garantindo a confiança dos consumidores (PIRES, 2019).

As ceras, que incluem alcanos e ácidos graxos, são insolúveis a baixas temperaturas e sua determinação é essencial para o controle de qualidade da própolis, uma vez que são consideradas biologicamente inativas e indesejáveis nos extratos (MARTIN, 2019). A cera de abelha é considerada a cera natural de maior relevância comercial, e é estável e altamente resistente à umidade, mas não

resiste ao calor e às pressões mecânicas (AHANGARI *et al.*, 2018). Tem na sua composição uma mistura de diversas substâncias, entre as quais se destacam o ácido palmítico, ésteres metílicos e os ésteres de oleato de álcoois alifáticos de cadeia longa, variando de C30 a C32. Entretanto, sua composição é notoriamente variável, uma vez que é influenciada pelas características genéticas das abelhas (SOLEIMANIAN *et al.*, 2018).

Figueiredo e colaboradores (2015) provaram que níveis de cera presentes na própolis podem variar com as diferentes regiões do Brasil e com as épocas do ano. O teor de cera da própolis verde da região metropolitana do Vale do Aço, Minas Gerais foi maior no inverno (10,84%) do que as amostras de verão (8,94%) e outono (7,22%). Marcucci *et al.* (2022) conduziram o primeiro estudo de análise térmica utilizando (TGA) e (DSC) para investigar a cera de própolis. Os resultados demonstraram que a cera presente na resina de própolis apresentou boa estabilidade térmica até 200 °C, um efeito esperado, uma vez que as ceras de própolis são predominantemente constituídas por monoésteres e hidrocarbonetos não saturados, cuja composição confere estabilidade térmica ao material.

Martin (2019) destacou a utilização da cera de abelha no tratamento da dermatite atópica, especialmente em virtude da escassez de opções terapêuticas seguras e eficazes. O tradicional *cold cream*, uma emulsão água-em-óleo à base de cera de abelha e bórax, é frequentemente empregado na prática clínica para amenizar os sintomas dessa condição. A pesquisa evidenciou que a cera de abelha bruta apresentava ácidos graxos alifáticos, enquanto a cera purificada possui predominantemente ácido cerótico (C26) e palmitato de merissila (C46), ambos sendo ácidos graxos de cadeia.

2.3.2. Derivados Cinâmicos

As substâncias predominantes da própolis verde são os derivados prenilados do ácido *para*-cumárico, destacando-se a artepilina C, bacarina, capilartemisina e drupanina (**Figura 11**). Estes produtos possuem uma gama de propriedades biológicas. (CONTIERI *et al.*, 2022; DOS SANTOS *et al.*, 2022; COSTA JR *et al.*, 2020; FIORINI *et al.*, 2021; CUI *et al.*, 2022).

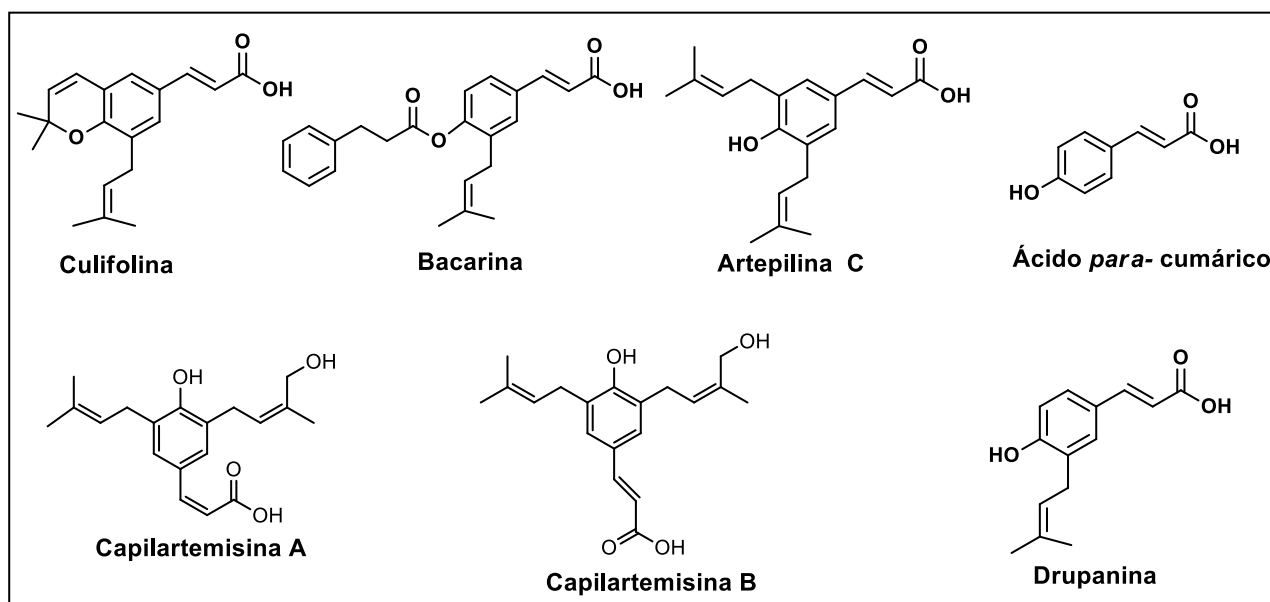


Figura 11-Substâncias predominantes na própolis verde brasileira

O ácido *para*-cumárico é uma substância fenólica, amplamente encontrado em diversas espécies do reino vegetal. Sua biossíntese ocorre a partir da fenilalanina e tirosina, mediada pela do ácido chiquímico, possibilitando sua conversão em outros ácidos fenólicos, tais como o ácido cafeico,

ácido ferúlico e ácido sinápico, além de flavonoides e precursores de lignina. Adicionalmente, o ácido *p*-cumárico pode participar de reações de prenilação, tanto em condições naturais quanto em laboratórios, resultando em ácidos fenólicos mais complexos, como artepilina C (Substâncias predominantes na própolis verde brasileira), drupanina e plicatina B (**Figura 12**) (VIEIRA *et al.*, 2024).

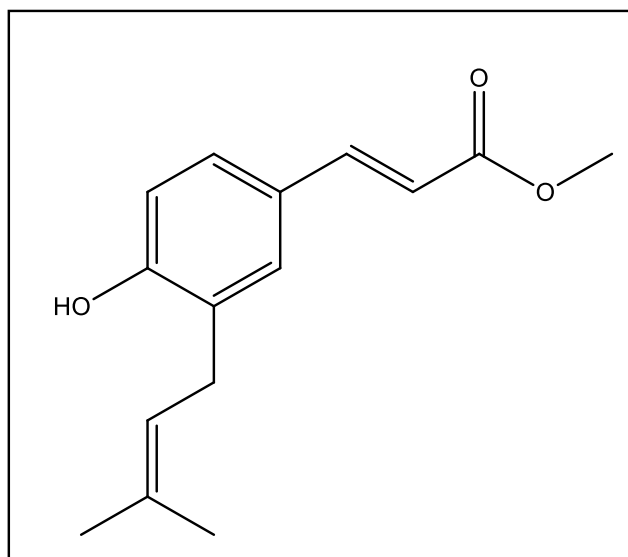


Figura 12 - Estrutura química de plicatina B ((*E*)-3-(4-hidroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)acrilato de metila).

Ácidos cinâmicos prenilados podem estar presentes como ésteres, como o éster alílico do ácido 3-prenil-cinâmico (SALATINO *et al.*, 2005). A artepilina C ((*E*)-3-[4-hydroxy-3,5-bis(3-methylbut-2-enyl)phenyl]prop-2-enoic acid), é uma substância bioativa que foi previamente isolado da *Flourensia heterolepis* e de várias espécies de *Baccharis*, *Relhania*, sendo um dos principais ácidos fenólicos encontrados nas própolis brasileiras (VIEIRA, 2023). Consiste de um ácido *p*-hidroxicinâmico substituído por grupos prenilas, que conferem uma maior hidrofobicidade e asseguram sua afinidade por ambientes lipofílicos. Existe uma correlação entre as propriedades biológicas da artepilina C e sua estrutura particular em condições fisiológicas saudáveis, pois melhoram o potencial antioxidante do sistema biológico por meio da transferência de átomos de hidrogênio em uma etapa, principalmente pela interação com membranas celulares, provavelmente devido à presença de grupos prenilados, evitando a formação de peroxidação lipídica causada por radicais livres que danificam a estrutura da membrana com baixa toxicidade (CAMURI *et al.*, 2018). É disponibilizada comercialmente pela Fujifilm Wako Pure Chemical Industries Ltd. a um preço de US\$ 495,00/5 mg e sua concentração é um indicativo da qualidade do própolis e estudos recentes ressaltam sua importância (SHAHINOZZAMAN *et al.*, 2020).

A bacarina (ácido 3-prenil-4-di-hidroxicinamoiloxi cinâmico) é um composto fenólico derivado do ácido 3-fenil-2-propenóico, com alto potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos sendo uma das principais substâncias encontrados na própolis verde brasileira e sua fonte botânica, *Baccharis dracunculifolia* (ALMEIDA-JUNIOR *et al.*, 2024; ZAMARRENHO *et al.*, 2023 CONTIGLI, *et al.*, 2021). Um estudo pioneiro, *in vivo*, foi verificado que bacarina e drupanina demonstraram que são responsáveis pela indução da apoptose em linhas celulares de vários tumores, suprimindo o crescimento do tumor em camundongos com sarcoma alo-enxertada (MISHIMA *et al.*, 2005). A drupanina (ácido (*E*)-3-(4-hidroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)acrílico) possui uma ausência de um grupo prenila na molécula e isso aumenta a sua polaridade frente a artepilina C, fazendo com que ela seja extraída preferencialmente pelo etanol, em virtude de ser a substância com características mais polares. Dessa forma, os extratos etanólicos apresentaram teores mais elevados de drupanina, quando comparados com o derivado diprenilado (artepilina C), e consequentemente teores mais baixos do culifolina (substância mais lipofílica) (PIRES, 2019).

Culifolina ou benzopirano (ácido (E)-3-[2,2-dimetil-8-(3-metilbut-2-enil)cromen-6-il]prop-2-enóico) é o sistema heterocíclico que consiste em um anel fenil fundido com um anel oxina que ocorre em vários compostos naturais (KATIYAR *et al.*, 2022). Vários culifolinas biologicamente ativos foram isolados de espécies do gênero *Piper*, incluindo um culifolina prenilado (BATISTA *et al.*, 2008). O Culifolina é um produto de degradação da artepilina C, que especialmente em condições de luz e temperaturas elevadas, se transforma em culifolina por ciclização conforme relatado por Arruda e pesquisadores (2020) e Shahinozzaman e colaboradores (2020).

A capilartemisina foi isolada pela primeira vez por Tazawa e pesquisadores (1998) do extrato etanólico da própolis verde brasileira e também foi isolada do extrato etanólico de uma amostra de própolis marrom do estado de Minas Gerais (RIBEIRO *et al.*, 2023). que possuía atividade significativa contra *Leishmania amazonensis*. É uma substância bioativa presente também em *Artemisia scoparia*, merecendo atenção em virtude de suas potenciais propriedades terapêuticas. Estudos recentes, como o de Hasegawa e demais autores (2021), sugeriram que extratos de outras espécies de *Artemisia* podiam ter efeitos benéficos na nefropatia diabética precoce em ratos, inibindo a oxidação de proteínas e a produção de óxido nítrico. Segundo os autores, as tiazolidinedionas (ligantes sintéticos do receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma abreviado PPAR γ) são utilizadas para o tratamento do diabetes. PPAR γ é um tipo de superfamília de receptores nucleares e desempenha um papel importante na adipogênese e no metabolismo da glicose. A capilartemisina B foi identificada como um ligante natural do PPAR γ , implicando em seu papel na regulação do metabolismo lipídico.

Outros derivados prenilados estão presentes na própolis verde na forma de anéis heterocíclicos, tais como cromanos e derivados 2,3-diidrobenzofuranos substituídos. Ésteres não-prenilados dos ácidos *p*-cumárico e cafeico são reportados com menos frequência, a exemplo do ácido rosmarínico que foi identificado pela primeira vez na própolis verde do Rio de Janeiro por Castro e Salgueiro (2016), e o *p*-cumarato de diidroconiferila identificado por Kumazawa e colaboradores (2003) na própolis verde de Minas Gerais, tais ésteres apresentam estrutura similar à do CAPE, princípio ativo da própolis europeia (PIRES, 2019).

2.3.3. Os Triterpenos

Os triterpenoides pentacíclicos têm atraído significativa atenção devido a suas potenciais propriedades terapêuticas compreendendo diversos grupos que podem ser divididos de acordo com seus esqueletos básicos em várias famílias estruturais. As famílias mais importantes de triterpenos são derivados de protostano, cicloartano, dammarano e eufano, e derivados pentacíclicos, como oleanano, ursano, gamacerano, lupano e hopano. A **Figura 13** mostra as estruturas de esqueletos principais selecionados de triterpenos pentacíclicos (BACHOŮŮK & URBAN, 2021). Essas substâncias são caracterizadas por sua estrutura complexa, que consiste em 30 átomos de carbono formados por seis unidades de isopreno (EL-DAWY *et al.*, 2022; GUERRA *et al.*, 2020).

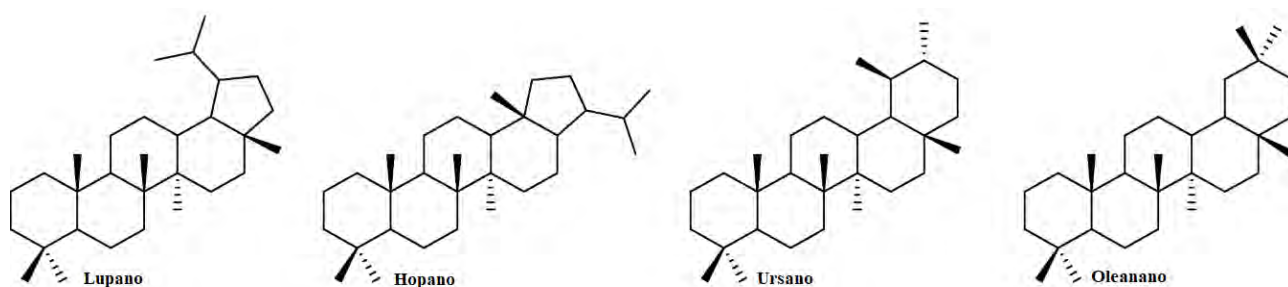


Figura 13-Estruturas de esqueletos principais dos triterpenos pentacíclicos (BACHOŮŮK & URBAN, 2021)

Possuem uma variedade de efeitos biológicos, os ácidos triterpênicos provavelmente atuam em múltiplas vias; na verdade, há muitas revisões publicadas nos últimos 10 anos sobre seu mecanismo de ação responsável por várias atividades, como anticâncer, imunomodulador, antidiabético, antiinflamatório, cardioprotetor, antiurolítico, antiviral e cicatrizante (MIOC *et al.* 2022). São amplamente distribuídos entre as plantas, e sua baixa solubilidade em água resulta em uma biodisponibilidade reduzida, limitando sua aplicação clínica ((BACHOŔÍK & URBAN, 2021).

Os triterpenos são amplamente encontrados em diversos tipos de própolis espalhados pelo mundo, como África, Bolívia, Brasil, Indonésia e Tailândia. Em estudos anteriores sobre própolis (DA SILVA *et al.*, 2005; KARDAR *et al.*, 2014; PUJIRAHAYU *et al.*, 2019; THANH *et al.*, 2021) foram relatados a identificação de triterpenos do tipo cicloartano (C₃₀ e C₃₁) em própolis de Camarões, própolis de Mianmar, própolis da Malaia, própolis do Vietnã, própolis verde de Teresina e da caatinga.

Na própolis verde brasileira os triterpenoides derivam de outras fontes além de *B. dracunculifolia* (SALATINO *et al.*, 2021), como pode ser verificado no trabalho de Da Silva e colaboradores (2005). Os autores isolaram alguns triterpenos (**Figura 14**), que também foram identificados nas cascas do caule da *Mangifera indica*. Considerando a similaridade na composição entre a própolis e os exsudatos de brotos de plantas visitadas por abelhas, foi sugerido que o mangueiral situado nas proximidades do apiário, favoreceu a coleta da resina pelas abelhas. Análises preliminares em CCD das frações etéreas da própolis neste estudo revelaram natureza terpênica, identificada pela coloração roxa após revelação com sulfato cérico. Albuquerque (2007) também identificou com sucesso as frações de própolis que continham triterpenos, os quais apresentaram coloração avermelhada ao reagir com o reagente de Liebermann-Burchard. Além disso, a cromatografia em camada fina (CCD) permitiu a verificação das frações terpênicas através de cores violetas após a aplicação do reagente vanilina sulfúrica e visualização em lâmpada de 365 nm, conforme demonstrado por Mattos (2009) e Martelanc e colaboradores (2009).

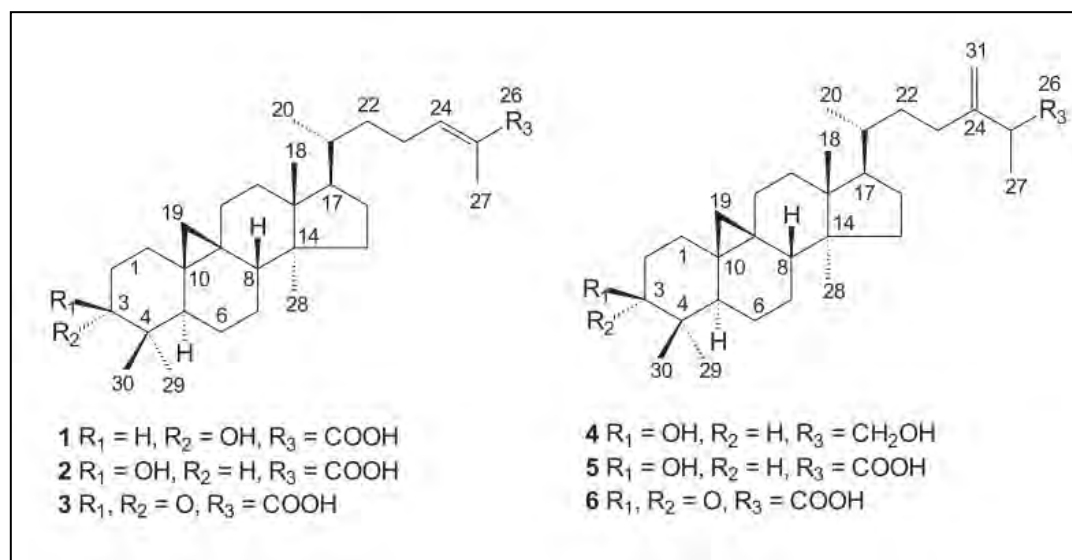


Figura 14-Triterpenos do tipo cicloartano identificados em própolis de Teresina-PI. Substâncias: **1**-ácido isomangiferólico, **2**- ácido mangiferólico, **3**- ácido mangiferônico, **4** – 24-metileno- cicloartano-3β,26-diol, **5**- ácido ambólico e **6**-ácido ambônico (DA SILVA *et al.*, 2005).

2.3.4. Os Flavonoides

Os flavonoides, metabólitos especiais polifenólicos provenientes das plantas, desempenham um papel crucial em diversos processos fisiológicos. Seu acúmulo nos órgãos e tecidos vegetais ocorre em resposta a diferentes condições ambientais e em estágios variados de desenvolvimento. Já foram identificados mais de 8.000 flavonoides naturais, amplamente presentes em plantas superiores. Essas substâncias possuem atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antitumorais, anti-arteriosclerose, antiproliferativas, estrogênicas e antiestrogênicas (MALLA *et al.*, 2012).

Atualmente, mais de 100 tipos de flavonoides foram separados e identificados de diferentes variedades de própolis conforme trabalho de CUI e pesquisadores (2022) como flavonas (luteolina), flavonóis (quercetina), diidroflavonas (pinostrobin e a pinocembrina), diidroflavonóis (pinobanksina), isoflavonas (7-hidroxi-4'-metoxisoflavona), chalconas e diidrochalconas além de neoflavonoides cuja estrutura está relacionada aos flavonoides ou heteroflavonoides. Alguns trabalhos abordam como etapa final o uso de Sephadex LH-20 para isolar ou purificar os flavonoides e o uso da cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC), além de métodos clássicos como cromatografia líquida de média pressão (MPLC) (MARUYAMA *et al.*, 2009; MOTTAGHIPISHEH *et al.*, 2020)

A ocorrência de flavonoides na própolis verde, oriunda de *Baccharis*, destaca a relevância dos estudos que investigam essa fonte botânica para o entendimento de sua matriz. Souza e pesquisadores (2011) realizaram um experimento com dez populações nativas de *B. dracunculifolia*, coletando frutos em diversas localidades e cultivando cem indivíduos de cada grupo em uma área experimental. A análise mensal revelou a presença de sete substâncias fenólicas. Os resultados obtidos permitiram sugerir que os meses de dezembro e abril seriam a melhor época para a colheita desta planta e proporcionando os melhores rendimentos qualitativos e quantitativos para estas substâncias. O éter metílico da aromadendrina (**Figura 15**, em inglês, AME) apresentou grande variação em relação as demais substâncias, e segundo o estudo de Souza (2007) este fato faz deste flavonoide um marcador quimiotaxonômico de *Baccharis* já que é detectado durante todo o ano e em todas as populações estudadas. Nesse contexto, Simões-Ambrosio e colaboradores (2010) analisaram o impacto da sazonalidade na produção das mesmas substâncias na própolis, constatando que AME e a bacularina são fundamentais para a atividade antioxidante e os extratos com maior atividade antioxidante foram produzidos em maio, junho e agosto.

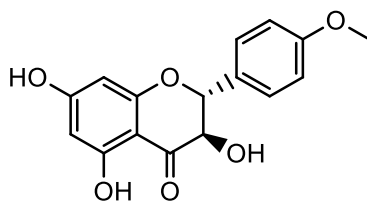


Figura 15- Estrutura química do flavonoide AME presente no estudo (SIMÕES-AMBROSIO *et al.*, 2010).

Maruyama e pesquisadores (2009) investigaram os efeitos anti-hipertensivos de flavonoides isolados da própolis verde brasileira, por cromatografia de exclusão com Sephadex LH-20, em ratos hipertensos. As frações obtidas foram administradas nos ratos, resultando em quedas significativas na pressão arterial. Os flavonoides foram identificados como diidrocanferide, isosakuranetina, betuletol e canferide (**Figura 16**). As evidências sugerem que a ação vasodilatadora dessas substâncias pode desempenhar um papel no mecanismo anti-hipertensivo, indicando potencial para a prevenção da hipertensão (KHOSHANDAM *et al.*, 2023).

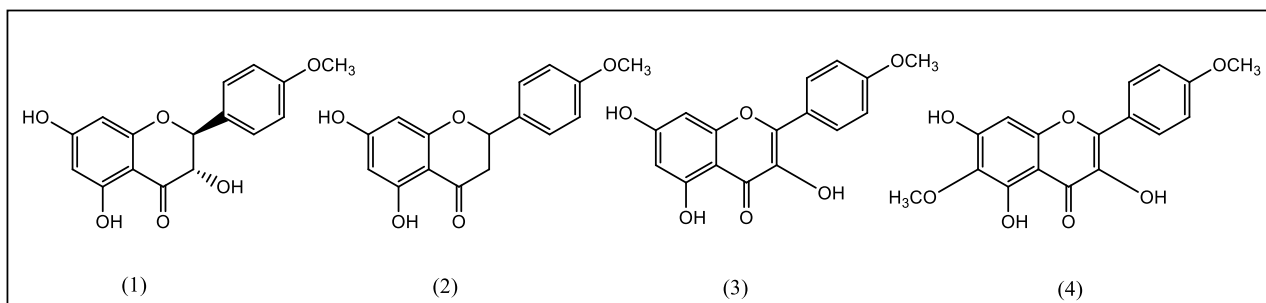


Figura 16- Estruturas químicas dos flavonoides presentes no extrato etanólico de própolis testados em ratos hipertensos. **1**-diidrociferide, **2**- isosakuranetina; **3**-ciferide e **4**-betuleto. (MARUYAMA *et al.*, 2009).

O potencial terapêutico dos flavonoides presentes na própolis verde é mais uma vez evidenciado pelo estudo de Costa e demais autores (2018), que isolou cinco substâncias da própolis verde brasileira. Destaca-se, entre elas, canferide, que demonstrou efeito gastroprotetor em doses baixas, corroborando a atividade antiúlcera do extrato de própolis verde e seu uso popular. Além disso, a combinação de canferide e betuleto apresentou propriedades antibacterianas, mostrando eficácia em cremes dentais à base de própolis na manutenção da saúde bucal e prevenção de doenças periodontais (AMANO *et al.*, 2025). Adicionalmente, Patel & Patel (2024) revisaram as atividades da aromadendrina, enquanto o flavonol betuleto foi isolado do extrato etanólico da própolis verde (SHAHA *et al.*, 2022; HATTORI *et al.*, 2011) e derivados do betuleto foram identificados como potenciais agentes antitumorais (RUBIO *et al.*, 2006).

2.3.5. Os Lipídeos fenólicos e derivados

O ácido anacárdico, derivado do ácido salicílico, é o principal componente extraído da casca da castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.), representando até 70% de seu conteúdo total. Classificado como lipídio fenólico, apresenta cadeias de carbono variando de 2 a 17 átomos, com 0 a 3 ligações insaturadas, conferindo-lhe diversas atividades biológicas, incluindo propriedades antibacterianas e antitumorais (CASTILLO-JUÁREZ *et al.*, 2007). Estudos demonstraram que misturas de ácidos anacárdicos extraídas da casca da *Amphipterygium adstringens* possuem atividade antibacteriana significativa contra o *Helicobacter pylori* (ARAÚJO *et al.*, 2020, MORAES *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2008, OSMAN *et al.*, 2019).

O líquido da casca da castanha de caju, rico em ácido anacárdico e seus derivados, transforma-se em cardanol por meio de descarboxilação durante o processamento industrial. Cardanol e cardol são substâncias apolares característicos das plantas pertencentes ao gênero da família *Anacardiaceae*, observados tanto em espécies nativas quanto em cultivos (BRAGA *et al.*, 2021). Plantas da mesma família, como *Anacardium occidentale* e/ou *Mangifera indica*, contêm uma variedade de lipídios fenólicos, incluindo cardanóis, cardóis e derivados do ácido anacárdico, sendo muitos deles considerados biomarcadores da resina da mangueira (*M. indica*) (OIRAM FILHO *et al.*, 2023; HEMSHEKHAR *et al.*, 2012; BANKOVA *et al.*, 2018; NEGRI *et al.*, 2019). PANT e colaboradores (2024) observaram que *Mangifera indica* foi a fonte botânica de própolis nas regiões subtropicais e tropicais, pois observaram que as abelhas extraíram tanto a resina da casca, quanto o látex dos frutos, resultando em uma mistura rica em lipídios fenólicos.

Silva e pesquisadores (2008) relataram o isolamento e identificação de triterpenos e dos derivados fenólicos cardanol, cardol e ácido anacárdico da própolis produzida por *Apis mellifera*, destacando sua presença em amostras coletadas em Teresina, Piauí, onde os cajueiros (*Anacardium occidentale*) nas proximidades do apiário influenciaram essa composição (Figura 17). Além disso, foram evidenciados estudos acerca da atividade antibacteriana do extrato etanólico da própolis contra patógenos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Shigella spp.*

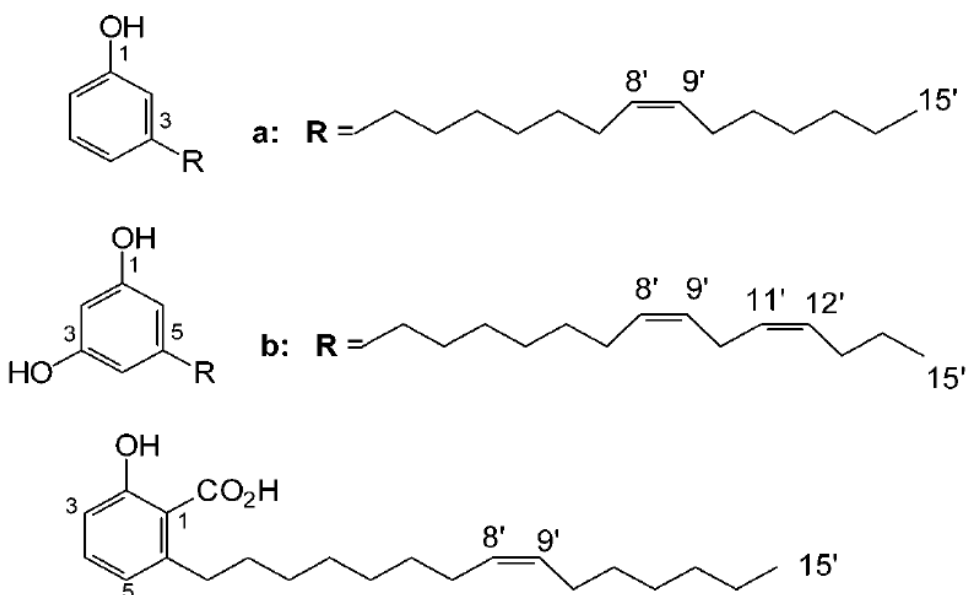


Figura 17-Lipídios fenólicos isolados/identificados no extrato metanólico da própolis produzida por *A. mellifera*

Em contrapartida, o estudo conduzido por Popova e demais autores (2021) evidenciou a presença de cicloartanos e lípidos fenólicos na própolis derivada de *Mangifera indica*. A pesquisa comparou o perfil químico dessa resina com amostras de própolis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão e de *Apis mellifera*, identificando 25 substâncias entre os quais se destacam ácidos graxos e ácidos anacárdicos. Em complemento, Popova e colaboradores (2022) analisaram o perfil químico e a atividade antioxidante de própolis de seis espécies de abelhas sem ferrão do Vietnã, revelando mais de 70 substâncias, incluindo lipídios fenólicos (cardanóis, resorcinóis e ácidos anacárdicos com 19 carbonos, C19:0 e C19:1) e triterpenos.

A árvore *Schinus terebenthifolius*, popularmente conhecida como “aroeira vermelha”, destaca-se no Brasil por sua contribuição à medicina popular e ganha destaque como fonte botânica da própolis e de lipídios fenólicos. Substâncias isoladas da aroeira tem sido amplamente utilizada para o tratamento de úlceras, problemas respiratórios e artrite, além de apresentar propriedades anti-sépticas e anti-inflamatórias (PACHECO *et al.*, 2022). Pesquisas recentes têm isolado metabólitos bioativos, incluindo derivados do ácido anacárdico, que demonstram potencial inibitório sobre a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *T. cruzi*, um alvo relevante no combate a tripanossomíase. Além disso, estudos sobre a composição química da própolis de diferentes regiões brasileiras identificaram a presença desses compostos, reforçando a importância de *S. terebenthifolius* como fonte botânica (UMEHARA *et al.*, 2020; SAWAYA *et al.*, 2007).

Carneiro e colaboradores (2016) conduziram uma análise comparativa entre extratos de própolis da abelha sem ferrão *Tetragonisca angustula* e resinas da planta *Schinus terebinthifolius*, utilizando a espectrometria de massas de ionização por eletrospray de infusão direta (ESI-MS). Os resultados indicaram que as flores de *S. terebinthifolius* são a principal fonte resinosa para a própolis de *T. angustula*, devido à similaridade em seus perfis químicos. Os autores sugeriram a presença de ácidos diterpênicos nas resinas de diferentes partes da árvore, e a análise de massa em alta resolução permitiu a formulação da composição molecular desses compostos. Apesar da similaridade composicional, as investigações sobre atividade biológica mostraram que o extrato de *S. terebinthifolius* apresentava maior atividade, possivelmente devido a variações quantitativas ligadas ao frescor do material, apontando para a necessidade de estudos adicionais para o isolamento e caracterização dessas substâncias.

Em estudo realizado por Surek e demais autores (2021), foi avaliada a composição química dos extratos de própolis de *A. mellifera* e diversas espécies de Meliponini, destacando a presença de

lipídios fenólicos, especialmente o ácido anacárdico. Embora tenha sido observado um íon em LCMS com massa exata de 402.3134, a identificação da substância não foi confirmada. Pesquisas adicionais, como a de Negri e colaboradores (2019), identificaram cardanóis e cardóis em extratos hexânico e clorofórmico da própolis verde de São Paulo, utilizando GC-MS, corroborando dados da biblioteca NIST. Na análise, os lipídios fenólicos foram os principais constituintes do extrato hexânico. Por outro lado, Araújo e pesquisadores (2015) estudaram a composição química da geoprópolis produzida por *Melipona fasciculata*, enfocando suas propriedades antimicrobianas, anti-tumorais e imunomoduladoras, destacando a importância dos triterpenos e do ácido anacárdico em combinação com cloranfenicol.

Assim, é evidente a contribuição de diversas fontes botânicas, como *S. terebinthifolius* e *M. indica*, na produção da própolis verde. A identificação de derivados de lipídios fenólicos como constituintes químicos dessa matriz ressalta a complexidade de sua composição. No entanto, há uma escassez de pesquisas voltadas ao isolamento dessas substâncias específicas dentro dessa resina, o que limita a compreensão aprofundada de suas potenciais aplicações e propriedades.

2.4. Atividade antiviral contra SARS-CoV2

Desde o início da pandemia da Covid-19, estudos têm demonstrado que o fortalecimento da imunidade dá ao corpo humano maiores chances de combater e se proteger contra o vírus da SARS-CoV2. A busca por substâncias antivirais de origem vegetal é uma das preferidas no mundo científico para uso na fitoterapia, e a China desempenha um papel de liderança em pesquisas relacionadas à medicina tradicional. Nas últimas décadas, estudos aprofundados sobre fitoquímicos com atividade antiviral ganharam grande importância (SILVA-BELTRÁN *et al.*, 2023). Uma variedade de metabólitos ativos, incluindo alcaloides, proteínas, flavonoides, terpenoides, lignanas, polifenóis e cumarinas, demonstraram ter aplicações terapêuticas contra vários vírus (KUMAR *et al.*, 2023). Um pré-requisito é que esses metabólitos ativos tenham efeito antiviral e inibam a interação entre a proteína S (que permite a ligação aos receptores celulares que desencadeiam a entrada do vírus na célula hospedeira) e os receptores da membrana celular hospedeira (SILVA SOBRINHO *et al.*, 2022).

Plantas medicinais e resinas vegetais, como a própolis, dão origem a uma variedade de compostos biologicamente e/ou farmacologicamente ativos. No entanto, o papel farmacológico natural da própolis no gerenciamento da COVID-19 permanece pouco explorado (ANSHORI *et al.*, 2024). A pesquisa em produtos naturais é o principal caminho para a descoberta de novas estruturas que tenham potencial para produzir medicamentos eficazes para diversas doenças humanas (NEWMAN & CRAGG, 2020). Os benefícios à saúde, o custo acessível e a facilidade de uso fazem da própolis um excelente tratamento complementar para fortalecer a imunidade e combater infecções. Por isso, o interesse internacional pela própolis produzida no Brasil é crescente, com sua inclusão em diversos estudos ao redor do mundo, especialmente no Japão (BERRETTA *et al.*, 2017).

O estudo realizado por Silveira (2023) (SILVEIRA *et al.*, 2023) indicou que o consumo de própolis por pacientes hospitalizados com Covid-19 resultou na redução do tempo de internação hospitalar (KULAKSIZ *et al.*, 2023). Portanto, investir em estudos que visem à extração, isolamento e identificação de substâncias bioativas presentes em plantas parece ser uma estratégia para combater a ação de diferentes tipos de vírus pertencentes à família coronaviridae, incluindo o responsável pela atual pandemia global (ZAROWSKI & KARPINSKI *et al.*, 2023). Várias literaturas publicadas têm incentivado o uso de produtos apícolas, como mel, própolis, pólen de abelha, pão de abelha e até mesmo veneno de abelha, no tratamento da COVID-19 (NAINU *et al.*, 2021).

A ACE2 é uma proteína de membrana integral tipo I, classificada como uma enzima metaloprotease, composta por 805 aminoácidos e possuindo uma sequência de consenso de ligação de zinco HEXXH-E em seus sítios ativos. A alta contagiosidade da COVID-19 é atribuída à facilidade com que o SARS-CoV-2 se liga à ACE2 humana, superando outros coronavírus nessa interação. Em resposta, pesquisas têm sido direcionadas ao desenvolvimento de agentes que possam competir eficientemente pela ACE2, visando bloquear a entrada viral nas células humanas. No estudo de Güler e pesquisadores (2021) foram investigadas por docking molecular 10 flavonoides abundantes em

extratos etanólicos de própolis da Anatólia à ACE2 com a do MLN-4760, um bloqueador conhecido da ACE2. Rutina, éster fenetílico do ácido cafeico (CAPE), miricetina, quercetina, pinocembrina e hesperetina (em ordem) expressaram uma afinidade de ligação à ACE2 maior do que a da molécula inibidora natural de referência.

Estudos *in silico* investigaram o potencial de ligação de compostos bioativos da própolis às proteínas do SARS-CoV-2 (Mpro e S2) que são essenciais para sua replicação. A protease-chave (Mpro) e a RNA polimerase dependente de RNA (RdRP), que são responsáveis pelo processo proteolítico da poliproteína viral, bem como pela replicação e transcrição do genoma viral, são dois alvos promissores de medicamentos para doenças relacionadas ao SARS-CoV. Nesse contexto, Shaldam e coautores (2021) relataram a afinidade de ligação de 14 fenólicos e terpenos selecionados encontrados no mel e na própolis contra as enzimas Mpro e RNA polimerase dependente de RNA do vírus SARS-CoV-2. Destas substâncias, o ácido *p*-cumárico, o ácido elágico, o canferol e a quercetina apresentaram as interações mais fortes. Já a artepilina C, ácido elágico, hesperetina, canferol e quercetina foram os mais ativos na principal protease (Mpro).

Pesquisa realizada por Avelar e sua equipe avaliou 18 derivados de triterpenos como potenciais inibidores do domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína spike, utilizando técnicas de docking molecular e simulações de dinâmica molecular. Os resultados indicaram que pelo menos três derivados — ácido oleanólico, ácido morônico e ácido ursólico — apresentaram energias de interação compatíveis com a do ácido glicirrízico, uma molécula referência nesse contexto. A dinâmica molecular sugeriu que os ácidos oleanólico e ursólico poderiam induzir mudanças na conformação da proteína spike, comprometendo a interação com o ACE2. Além disso, outro estudo conduzido por Santos e colaboradores (2024) demonstrou a eficácia antiviral da bacarina e da artepilina C contra a COVID-19, enquanto a pesquisa de Omar e seus coautores (2023) elucidou a estrutura cristalina da protease 3CLpro, principal enzima proteolítica do SARS-CoV-2, destacando a bacarina como um inibidor eficaz em análises *in silico* e experimentais.

Marcucci (1995) afirmou que as atividades antivirais dos ácidos cafeicos, flavonoides, ácidos aromáticos e seus ésteres na própolis podem prevenir a transmissão, bem como a propagação de vírus. Os ingredientes ativos encontrados no própolis, como ácido cafeico e quercetina, apresentam uma quantidade suficiente de inibição contra a helicase SARS-CoV-2 no corpo humano. Várias opções de terapia para COVID-19 tem sido investigadas e o melhor curso de ação está em constantemente sendo avaliado em pesquisas acadêmicas desde 2020 (MANI *et al.*, 2020).

2.5. Atividade Anticâncer

Atualmente, há um interesse crescente em produtos apícolas, particularmente em termos de suas potenciais atividades anticâncer pois estes podem interferir no desenvolvimento de células cancerígenas com uma ampla gama de mecanismos citotóxicos. As atividades anticâncer dos produtos apícolas são avaliadas principalmente usando ensaios MTT *in vitro*. Portanto, uma avaliação detalhada desses produtos contra modelos animais portadores de câncer é necessária para obter uma visão mais profunda sobre a influência de diferentes fatores nas potências desses produtos naturais (NAINU *et al.*, 2021).

A pesquisa para tratamentos oncológicos com compostos prenilados presentes na composição da PVB (como artepilina C e bacarina) bem como inúmeros derivados de triterpenos pentacíclicos tem ganhado amplo destaque na última década. O estudo das propriedades anticâncer da própolis resultante de diferentes espécies de abelhas encontradas em várias localizações geográficas no tratamento de linhagens celulares de câncer de mama, cólon, fígado, pulmão e pâncreas foi amplamente documentado nos últimos anos (ZULLKIFLEE *et al.*, 2022). Descobertas ilustram o vasto potencial terapêutico da apiterapia, principalmente da própolis verde brasileira, indicando novas direções para o desenvolvimento de fármacos contra o câncer, como é o caso artepilina C e drupanina contra câncer de mama (YAMAGA *et al.*, 2024) e câncer de ovário (MIZE *et al.*, 2023), inibição das enzimas collagenase e elastase por moléculas de artepilina C e aromadendrina com valores de CI₅₀

excelentes a bons de 16,65 e 0,79 μM para artepilina.C e 7,31, 19,38 e 10,56 μM para aromadendrina (WANG *et al.*, 2024). Além disso, outras própolis além da brasileira como o caso da própolis chinesa e coreana exibem fortes propriedades antiangiogênicas que ajudam a prevenir a inflamação e o câncer (AHN *et al.*, 2009).

Artepilina C têm demonstrado, em estudos recentes, a capacidade de induzir apoptose e inibir a divisão celular anormal em carcinomas e melanomas malignos (SIMANJUNTAK *et al.*, 2024; RANA & BAJWA, 2023). O impacto da artepilina C na sinalização androgênica em células de câncer de próstata como também sua eficácia citotóxica contra MCF-7, implicam um potencial significativo na prevenção da recorrência do câncer de mama (OTA *et al.*, 2023; MEIRELLES *et al.*, 2024).

Pesquisa realizada por Li e colaboradores (2024) ressaltaram a eficácia da bacarina na inibição da isoforma AKR1C3, associada à progressão do câncer. Aldo-Keto Reductase Family 1 Member C3 (AKR1C3) funciona como uma enzima essencial na biossíntese de andrógenos. Níveis elevados de AKR1C3 ativam a via de sinalização do receptor de andrógeno (AR), contribuindo para a recorrência do tumor e conferindo resistência às terapias contra o câncer. A superexpressão de AKR1C3 serve como um fator oncogênico, promovendo proliferação, invasão e metástase de células de carcinoma, e está correlacionada com prognóstico desfavorável e sobrevida global em pacientes com carcinoma.

Estudos adicionais, como o de Gastaldello e coautores (2021), confirmaram as propriedades antimitóticas e antiangiogênicas da bacarina em modelos animais de melanoma induzido. Por fim, a indução de apoptose em linhagens celulares de câncer por meio da bacarina, artepilina C e drupanina foi corroborada pela pesquisa de Akao e pesquisadores (2003), consolidando o papel dessas substâncias na luta contra diversas neoplasias. Resumidamente, a **Figura 18** ilustra os diversos mecanismos de ação da bacarina na prevenção de diferentes tipos de câncer.



Figura 18- Fluxograma dos mecanismos propostos da Bacarina contra tumores. Adaptado de CAMPO *et al.*, 2023.

Revisões como de Jang e pesquisadores (2015) reforçam a necessidade de investigar a eficácia de capilartemisina em patologias críticas, como cirrose e câncer hepático. E revisões recentes, como as de El-dawy e colaboradores (2022), indicam que triterpenoides podem desempenhar um papel crucial na supressão da tumorigênese *in vivo* e *in vitro*, promovendo mecanismos celulares como apoptose e interrupção do ciclo celular.

Desde a descoberta por Pisha e coautores em 1995 da eficiência anti-melanoma seletiva do ácido betulínico, os triterpenos pentacíclicos entraram no estudo de vários grupos de pesquisa para identificar sua capacidade de combater várias doenças, em particular tumores malignos (MIOC *et al.*

2022). Ácidos triterpênicos pentacíclicos derivados de plantas têm ganhado cada vez mais atenção devido às suas múltiplas atividades biológicas. O ácido betulínico e o ácido ursólico modulam diversas vias na carcinogênese e possuem ação contra o câncer de mama triplo negativo (GUERRA *et al.*, 2020).

Segundo Woŭniak e pesquisadores (2023), as características do ácido ursólico incluem potencial anticâncer, propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, proteção de órgãos internos contra danos induzidos quimicamente e potencial antimicrobiano diretamente conectado com o papel do ácido no sistema de defesa das plantas. O lupeol, reconhecido por sua potente atividade anticâncer e efeitos colaterais mínimos em estudos pré-clínicos, tem mostrado grande potencial terapêutico. Uma abordagem sinérgica envolvendo lupeol e 5-fluorouracila demonstrou eficácia no combate à quimiorresistência mediada por c-MET/EphA2 em câncer de mama triplo negativo, resultando em respostas anticâncer promissoras em modelos *in vitro*, *in vivo* e em culturas de tumor *ex vivo* derivadas de pacientes (MITRA *et al.* 2023).

2.6. A cromatografia contracorrente (CCC)

O isolamento de substâncias a partir de matrizes complexas, como a própolis verde, é um desafio que requer metodologias de separação eficazes, com a cromatografia preparativa sendo uma dos métodos mais empregados. Para melhorar esse processo, é essencial adotar métodos que sejam econômicos, rápidos e que reduzam perdas de amostra. Embora a aplicação de métodos cromatográficos em etapas múltiplas possa resultar em analitos com purezas adequadas, os rendimentos frequentemente são insatisfatórios (SEGET *et al.*, 2006).

A cromatografia contracorrente (CCC), desenvolvida nas décadas de 1970 e 1980, aparece como uma solução inovadora oferecendo alta capacidade de carga e baixo consumo de solvente (KOSTANYAN *et al.*, 2020). A técnica se baseia na partição líquido-líquido, na qual a fase líquida estacionária é retida dentro da coluna do aparelho usado no processo cromatográfico sem auxílio de um suporte sólido. Sendo assim, evita adsorções irreversíveis de compostos polares. Uma das fases do sistema de solvente bifásico permanece fixa na coluna do aparelho enquanto a outra fase é bombeada (MENDONÇA *et al.*, 2024).

A fase estacionária ocupa a maior parte do volume total da coluna, esta retenção no interior da coluna é denominada de “retenção da fase estacionária” e desempenha um papel importante no número de pratos teóricos e na resolução do processo (CONWAY, 1990). Como não há suporte sólido, a adsorção não contribui para a retenção e separação do soluto. A separação é determinada apenas pelo coeficiente de distribuição (K) do soluto no sistema de solvente que está sendo utilizado. K é expresso como a razão da concentração do soluto (considerando-se todas as formas químicas presente) na fase estacionária em relação à concentração do soluto (em todas as formas) na fase móvel, sendo este parâmetro o único que assegura a retenção do soluto, permitindo o processo cromatográfico (MILATO, 2015).

Desde a introdução da CCC em 1970, a técnica evoluiu rapidamente. Os primeiros aparelhos desenvolvidos utilizando força gravitacional, CCC de gotículas e CCC de rotação locular, foram substituídos por equipamentos mais eficientes, que utilizavam força centrífuga para retenção da fase líquida estacionária: CCC hidrostático utilizado em equipamento de cromatografia de partição centrífuga (CPC) e CCC hidrodinâmico utilizado em equipamento de cromatografia contracorrente (CCC) (LEITÃO *et al.*, 2012). No final da década de 1960, Yoichiro Ito, o inventor da cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC), contribuiu significativamente com a publicação de 600 artigos e 50 patentes sobre a técnica (JERZ & WINTERHALTER, 2020).

Atualmente os equipamentos vendidos para cromatografia contracorrente são centrífugas, ou seja, utilizam a força centrífuga para reter a FE (BERTHOD *et al.*, 2009). O sistema hidrodinâmico utiliza dois eixos de rotação, mimetizando o movimento planetário, promovendo campo de força centrífuga variável ao longo da coluna. Quando a força centrífuga é grande, ocorre decantação de fases, e quando a direção da força inverte, ocorre mistura de fases, alternando zonas de decantação e

mistura, auxiliando o processo de partição e conseqüente separação (**Figura 19**) (ITO, 2005). Tanto a fase mais densa quanto a menos densa podem ser utilizadas como fase móvel, modificando-se apenas o sentido da rotação utiliza colunas baseadas no equilíbrio hidrodinâmico entre as duas fases líquidas. Em um sistema hidrodinâmico a fase estacionária encontra-se retida por toda a coluna. A fase móvel percorre a coluna sempre estando em contato com a fase estacionária, ou seja, há um movimento de equilíbrio por toda a coluna de forma constante (GUO *et al.*, 2020; FRIESEN *et al.*, 2015; POOLE, 2020).

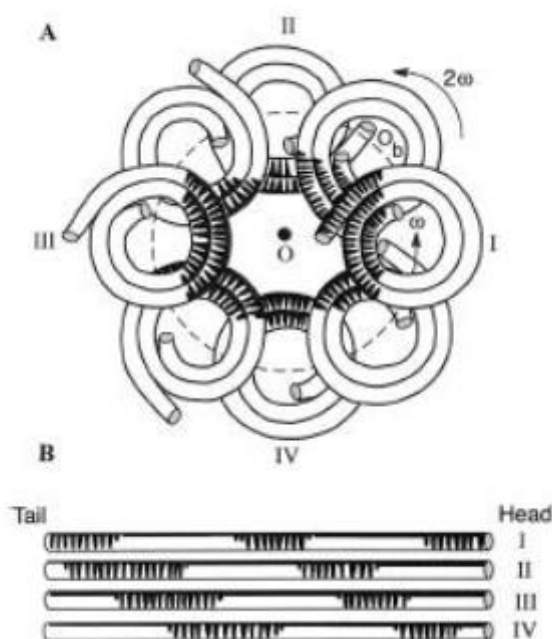


Figura 19 - Representação da distribuição das fases em uma coluna em espiral (ITO, 2005).

O movimento planetário somado a configuração em espiral da coluna são responsáveis por deslocar as fases para uma das extremidades da coluna denominada cabeça, a extremidade de alta pressão. A outra extremidade da coluna é chamada de cauda, a extremidade de baixa pressão. E devido à diferença de densidade entre as fases, a mais densa seguirá para a cauda, deslocando a menos densa para a cabeça. A velocidade de rotação do aparelho é ajustável de 0 a 1000 rpm no sentido ‘cabeça-cauda’ (BERTHOD *et al.*, 2009; FIGUEIREDO, 2012).

CCC vem se tornando uma técnica preparativa amplamente aplicada na área dos produtos naturais, sendo usada para fracionar extratos brutos assim como frações semi-puras em quantidades que variam de miligramas a gramas e no fracionamento bioguiado (YI *et al.*, 2016; MENDONÇA *et al.*, 2024). Comparada com a cromatografia em coluna, ela não emprega uma fase estacionária sólida ou suporte e tem vantagens únicas sempre que interações de superfície sortivas tornam as separações em coluna impraticáveis (POOLE, 2020).

O conhecimento sobre cromatografia contracorrente e suas técnicas associadas tem se disseminado de maneira gradual, mas sólida, ao redor do mundo, com mais de 500 instituições atualmente dedicadas à pesquisa em CCC/CPC (JERZ & WINTERHALTER, 2020). Essa crescente de produções científicas da cromatografia contracorrente evidencia seu potencial na purificação de substâncias, solidificando seu papel como uma ferramenta essencial na pesquisa e na indústria contemporânea. Um aspecto crucial sobre CCC é a necessidade de empregar sistemas de solventes compostos por duas fases líquidas imiscíveis (sistemas bifásicos). Nesses sistemas, uma fase desempenha o papel de fase estacionária, enquanto a outra atua como fase móvel. A técnica fundamenta-se na partição de um soluto entre essas duas fases, regida pelo coeficiente de partição ou de distribuição (K ou K_D), que idealmente deve estar entre $0,5 < K < 2,0$ no sistema escolhido (SANTOS *et al.*, 2024).

A natureza líquida do sistema permite uma ampla variedade de combinações de fases imiscíveis, conferindo seletividade ao isolamento de substâncias com diferentes polaridades. Portanto, a seleção cuidadosa de um sistema bifásico apropriado é crucial para o êxito na separação de misturas, sendo aconselhável a adoção de estratégias específicas para tal (MELLO & LEITÃO, 2023; LEITÃO *et al.*, 2012).

A CCC tem várias vantagens sobre outras técnicas cromatográficas, como versatilidade em relação às fases móveis/estacionárias, onde ambas, superior ou inferior, podem ser usadas como fase móvel, bem como fácil escalonamento, baixo consumo de solvente e tempo de análise diminuído quando comparado a outras técnicas preparativas (YANG *et al.*, 2020). Estudos recentes demonstraram que a CCC preserva a integridade de compostos sensíveis e promove práticas de química verde, reduzindo o uso de solventes tóxicos e o impacto ambiental (SKALICKA-WOŨNIAK *et al.*, 2014).

A configuração típica da cromatografia líquida em contracorrente (CCC) assemelha-se à utilizada em outros tipos de cromatografia (**Figura 20**), incluindo um reservatório de fase móvel e estacionária, uma bomba, uma válvula de injeção, uma bobina, um detector e um processador ou registrador de dados. Neste contexto, a escolha do sistema de solvente é crucial, representando cerca de 90% do esforço total necessário no CCC (ITO, 2005).

Cada componente do sistema pode impactar significativamente o desempenho da separação, tornando a determinação cuidadosa dos parâmetros operacionais uma etapa essencial para o êxito do fracionamento (VIEIRA *et al.*, 2015). Nesse contexto, Berthod e seus colaboradores (2002) salientam um aspecto importante referente ao preenchimento dos aparelhos de CCC de acordo com o sistema solvente adotado. Quando a fase estacionária selecionada é a mais densa, o preenchimento ocorre em direção da cauda para a cabeça, caracterizando o modo de fase normal. Em contrapartida, se a fase estacionária corresponde à fase líquida superior, o preenchimento é realizado na direção oposta, da cabeça para a cauda, configurando o modo de fase reversa nos equipamentos hidrodinâmicos.

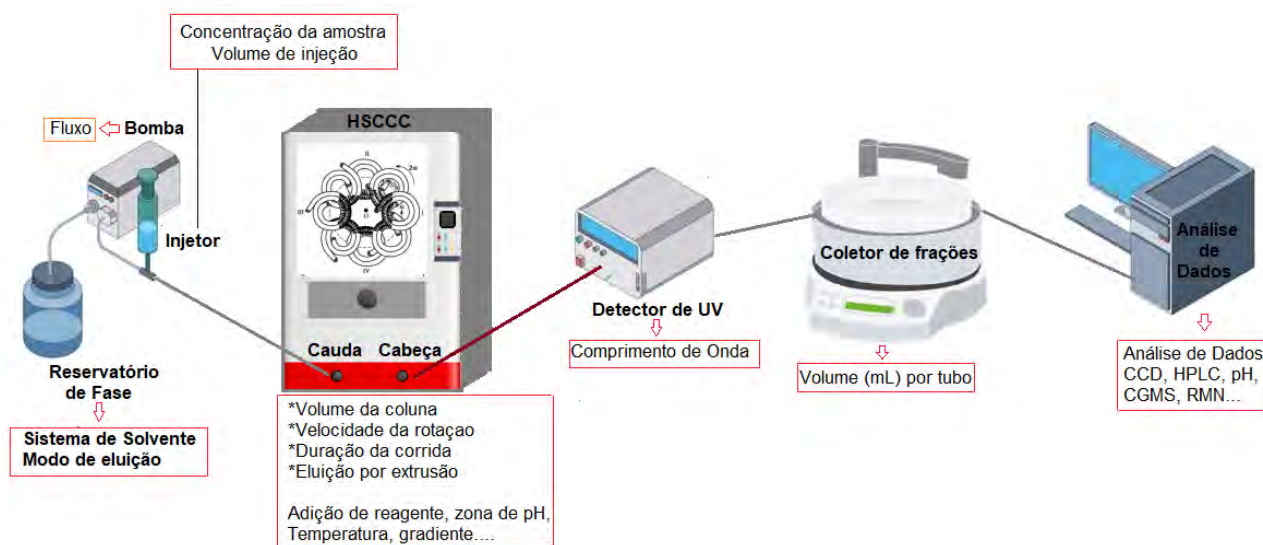


Figura 20 - Configuração genérica de equipamentos de CCC e possíveis parâmetros para ajustar em cada componente. Adaptado de VIEIRA *et al.*, 2015.

Desde sua invenção, a HSCCC tem-se consolidado como uma ferramenta versátil para a separação de componentes de produtos naturais. Essa técnica sobressai na extração de frações fenólicas e no isolamento das substâncias fenólicas, demonstrando um potencial significativo na separação desses constituintes, especialmente em contextos preparativos, conforme proposto por Li e coautores (2022). Tal capacidade ressalta a relevância da HSCCC na separação e purificação de substâncias presentes em produtos apícolas.

Para o levantamento bibliográfico acerca da cromatografia contracorrente, utilizou-se a plataforma *web of science* utilizando como tópico a palavra “countercurrent chromatography” realizada no intervalo de 2014 a 2024 e foram encontrados ao todo 778 publicações. Não seria possível avaliar cada uma das 778 publicações obtidas contudo o uso da IA facilita a geração de uma de dados organizadas em clusters conforme afinidade entre os termos. Esse banco de dados de palavras foi inserida no software do Vosviewer para a visualização da rede bibliométrica e em quais pesquisas as palavras chaves estão relacionadas (**Figura 21**).

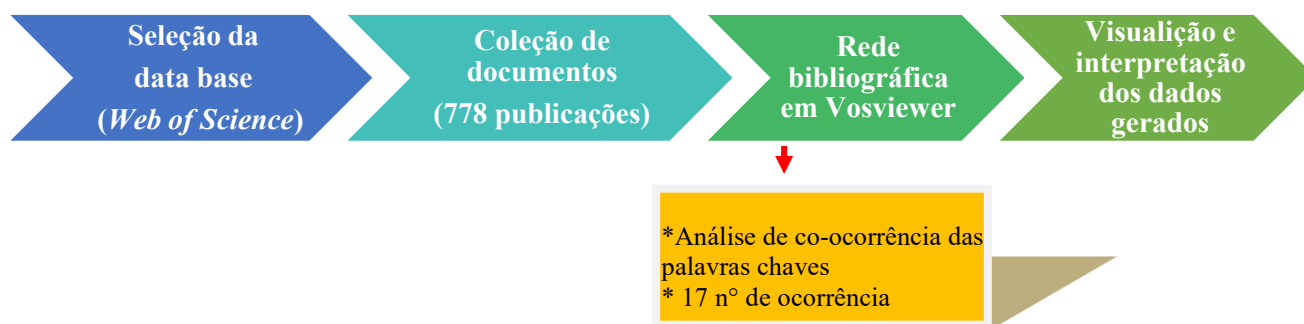


Figura 21-Modelo de mapeamento das principais tendências e lacunas na pesquisa sobre a própolis no Brasil. Própria autoria.

Como critério, foram analisadas a co-ocorrência de todas as palavras chaves encontradas em todas a 778 publicações chegando a um total de 3941 palavras-chaves, considerando 17 como o número mínimo de ocorrências para cada palavra-chave, e com isto chegou-se a 33 palavras conectas entre si em temas descritos em cada círculo da **Figura 22**. Criou-se o mapa de interações entre os grupos e a análise de 3 *clusters* (vermelho, verde e azul) que foram distribuídos com a força de associação entre eles.

O *cluster* verde revela as palavras-chave mais frequentes utilizadas em CCC e que traduzem seu objetivo principal: “separação” (CHEEL *et al.*, 2016), “purificação” (MICHEL *et al.*, 2023), “extração” (YANG *et al.*, 2024) e “separação preparativa” (LI *et al.*, 2024; LIU *et al.*, 2024). A existência da proximidade entre as palavras “separação preparativa” e “centrifugal partition chromatography” (CPC) é um indicativo que essa técnica está intimamente ligada a fracionamentos em larga escala. Dentre as vantagens das técnicas hidrostáticas (CPC), como a possibilidade de trabalhar com altas vazões, destaca-se a excelente retenção de todos os sistemas de solventes, principalmente daqueles compostos por solventes de alta polaridade e viscosos, incluindo os sistemas de solventes aquosos bifásicos, que não são retidos em colunas hidrodinâmicas (HSCCC) (LEAL *et al.*, 2022).

Aumentar a separação para produzir uma quantidade suficiente da molécula de interesse é conhecido como escalonamento ou “scale up” em inglês. As colunas de CCC hidrodinâmicas e CCC hidrostático estão disponíveis desde a escala laboratorial até a escala industrial. Em sistemas CCC hidrodinâmicos, o aumento de escala foi demonstrado como linear simplesmente considerando a razão dos volumes das colunas e/ou a razão das seções do tubo. Para instrumentos CCC hidrostáticos, muitos exemplos tendem a provar que instrumentos CPC de larga escala têm melhor desempenho do que CPCs de pequeno volume (BOUJU *et al.*, 2016). O “scale up” possui inúmeras publicações em CPC indicando que esse tipo de técnica é frequentemente escolhida como técnica preferencial em relação à HSCCC (COSTA *et al.*, 2017) o que justifica a proximidade entre as palavras chaves “scale up” e “CPC”.

Além disso, observa-se no agrupamento verde a aplicação de líquidos iônicos utilizados no geral em CPC (ROCHA *et al.*, 2022). As separações de alcaloides possuem artigos que descrevem o isolamento de alcaloides por HSCCC convencional por refino de zona de pH o que justifica a proximidade das palavras chaves “alkaloids” e “HSCCC” (LEITÃO *et al.*, 2021).

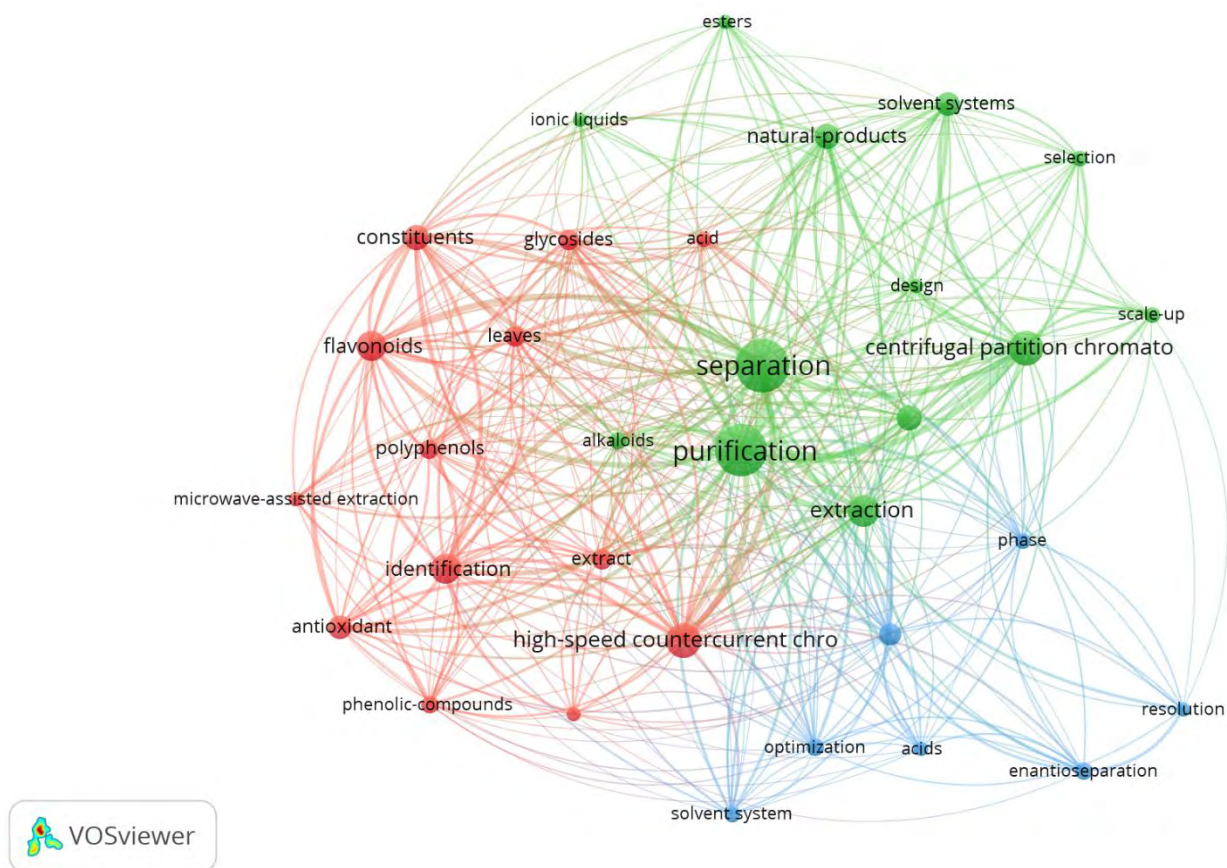


Figura 22-Mapa bibliométrico obtido pelo software VOSviewer versão 1.6.16 (<https://www.vosviewer.com>), usando “cromatografia contracorrente” como palavras-chave, registrado no banco de dados *web of sciense* no período de 2014 a 2025 (realizado em 8 de outubro de 2024).

Por outro lado, o cluster azul ilustra a interligação entre pesquisas focadas em separações enantiométricas e a otimização de sistemas de solventes, evidenciando outra vertente de inovação na área de separações químicas por CCC. O distanciamento dessa rede frente aos cluster vermelho e verde são um indício da escassez de pesquisas relacionados ao tema. A pesquisa de Jin e colaboradores (2020) destacou a enantioseparação bem-sucedida do ácido 2-(4-clorofenil)succínico por meio de cromatografia em contracorrente, utilizando hidroxipropil- β -ciclodextrina como seletor quiral. Foi empregado um sistema de solvente com duas fases, formado por n-hexano, acetato de etila e tampão fosfato 0,1 mol/L ajustado para pH 2,65, na proporção 5:5:10 (v/v). Com condições otimizadas, 20 mg de racemato foram enantioseparados com uma recuperação entre 70-75% e pureza de 99,0%.

O cluster vermelho representa um segmento significativo de estudos focados nas separações e purificações que utilizam a técnica de HSCCC, abrangendo o fracionamento de folhas, extratos brutos, polifenóis, glicosídeos, substâncias fenólicas e flavonoides. A análise do tamanho dos círculos que representam CPC e HSCCC indica que ambas as abordagens possuem importância equivalente, embora abranjam temáticas diversas. No estudo de Lu e pesquisadores (2024), uma cromatografia combinada de HSCCC com método HPLC preparativo foi desenvolvida para isolar os cinco

Os produtos naturais e as substâncias isoladas, como flavonoides, alcaloides, esterres e glicosídeos, foram encontrados nas palavras chaves dos 778 artigos científicos que emergiram de diferentes matrizes e países. No entanto, produtos apícolas e/ou propolis não apareceram na rede bibliométrica (**Figura 22**) e nas 3941 palavras chaves gerados pela IA na qual dentre os 778 artigos apenas 4 possuíam referência a palavra própolis.

Publicações

386	11
135	10
62 (4 própolis)	8
58	8
39	7
33	7
32	7
30	7
17	5
16	5
16	4 (Arábia Saudita, 1 própolis)
14	
12	
12	

No que se refere à produção científica por país, a China se destacou com 386 publicações, seguida pela Alemanha com 135 e pelo Brasil com 62. Em contraste, países como Canadá, Arábia Saudita, Itália e Grécia mostraram-se menos produtivos em separações com CCC. Além disso, identificou-se uma lacuna significativa na literatura científica, especialmente no que tange ao uso da cromatografia contracorrente (CCC) na separação de substâncias da própolis: quatro artigos foram publicados no Brasil (do total de 62 publicações brasileiras) e apenas um artigo da Arábia Saudita dentre as quatro pesquisas desenvolvidas nesse tema pelo país árabe. No Brasil, entre as quatro publicações existentes, somam-se apenas três publicações em periódicos sobre a própolis e, uma publicação com sua fonte botânica *B. dracunculifolia* (**Figura 23**).

28

O fracionamento da própolis é essencial para a separação e identificação das substâncias bioativas que contribuem para suas propriedades. Técnicas de fracionamento, como a cromatografia contracorrente, permitem a obtenção de extratos mais puros e concentrados, o que pode potencializar suas aplicações. O fracionamento eficaz pode facilitar a pesquisa e desenvolvimento de novos produtos à base de própolis, melhorando sua qualidade e eficácia. A CCC é uma ferramenta poderosa no campo de trabalho fitoquímico, pois permite o fracionamento de extrato vegetal em substâncias principais existentes e também o enriquecimento de substâncias minoritárias. Esta característica é ainda mais perceptível quando escalas semipreparativas e preparativas são empregadas (COSTA *et al.*, 2021).

Embora técnicas manuais, como cromatografia líquida à vácuo, colunas abertas e cromatografia em camada delgada, geralmente obtenham analitos com pureza satisfatória, elas frequentemente resultam em baixos rendimentos (JERZ *et al.*, 2014). Como alternativa a estes desafios, a CCC permite a recuperação total do analito devido à retenção da fase estacionária sem o uso de um suporte sólido. O equipamento de CCC tem sido cada vez mais implementado em protocolos de isolamento em escala laboratorial para os produtos naturais bioativos (LEITÃO *et al.*, 2017; BERTHOD *et al.*, 2009).

Entre os estudos encontrados na **Figura 23**, destacam-se os trabalhos de Santos *et al.* (2024), que focaram no fracionamento da própolis verde, e Lopez *et al.* (2024), que exploraram o fracionamento da própolis vermelha. Adicionalmente, Jerz *et al.* (2014) investigaram a própolis originária da Arábia Saudita. Em uma exploração mais extensa no *Google Acadêmico*, foi possível localizar o estudo de Arruda e colaboradores (2020), que examinaram o fracionamento dos produtos de degradação da artepilina C e a utilização da sua fonte botânica, a *B. dracunculifolia*, em experimentos realizados por Rodrigues *et al.* (2022).

JERZ e colaboradores (2014) avaliaram o extrato acetato de etila da própolis da Arábia Saudita utilizando HSCCC. Para a separação por HSCCC, os autores hexano-acetonitrila (1:1, v/v) m modo de eluição reversa. Os resultados obtidos evidenciaram o bom fracionamento e a obtenção de substâncias parcialmente puras como ocicloartenol, 24-metileno-cicloartenol e a mistura de acetatos de triterpenos (Figura 24).

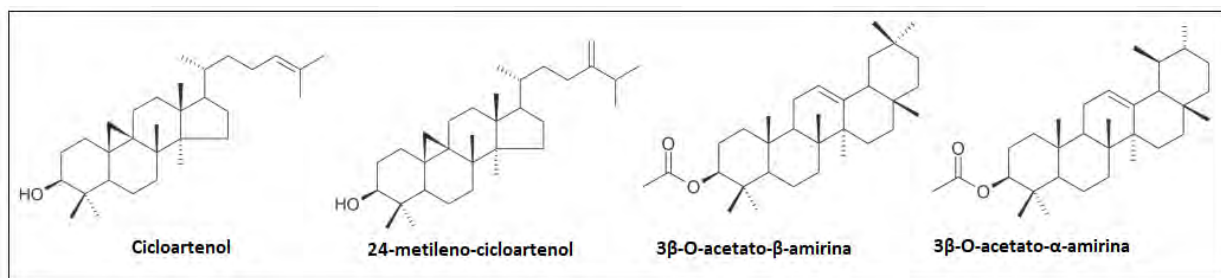


Figura 24-Triterpenos isolados da própolis da Arábia Saudita (JERZ *et al.*, 2014)

Já no trabalho realizado por Arruda e colaboradores (2020), o HSCCC foi usado para isolar os produtos de degradação da artepilina C. O extrato hidroalcóolico (etanol/água 7:3) de própolis foi fracionado utilizando a fase estacionária etanol/água (7:3) e a fase móvel hexano/acetato de etila (95:05), coletando 105 frações, e obtendo-se o 2,2-dimetil-8-prenilculifolina com 86,7% de pureza (19 mg).

No estudo de LOPEZ e coautores (2024), foi desenvolvido um método de isolamento por cromatografia contracorrente de alta eficiência (HSCCC), seguido de escalonamento, com o intuito de identificar as substâncias bioativas da própolis vermelha. Para a separação, foi usado o sistema de solventes hexano-metanol-água na proporção 5:4:1 (v/v), utilizando a fase inferior como fase estacionária. O trabalho resultou no isolamento da retusapurpurina e do 7-O-metilvesitol (**Figura 25**).

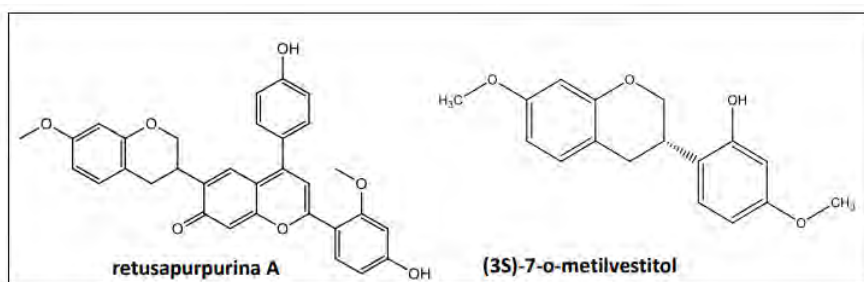


Figura 25-Substâncias isoladas da própolis vermelha (LOPES *et al.*, 2024)

Recentemente RODRIGUES (2022), aplicou a técnica de HSCCC ao extrato hidroalcoólico das folhas de *B. dracunculifolia* e obteve a drupanina, artepilina C e bacarina. Estas substâncias fenólicas preniladas foram obtidas em quantidades satisfatórias por meio de dois métodos cromatográficos: cromatografia líquida a vácuo (VLC) e HSCCC. O desenvolvimento da técnica de eluição por gradiente em HSCCC foi realizado usando metanol:água (9:1) como fase estacionária e hexano/acetato de etila como fase móvel, usando um gradiente começando com 5% de acetato de etila até níveis de 30%.

Ademais, foi realizado por nosso grupo o fracionamento do extrato hexânico da própolis verde, com foco específico no isolamento de seus biomarcadores artepilina C e bacarina por meio da cromatografia contracorrente (SANTOS *et al.* 2024). Os pesquisadores avaliaram o potencial biológico do extrato hexânico e das substâncias isoladas, em relação à interação entre o domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína *Spike* de SARS-CoV-2 e o receptor ACE2, que será discutido no Capítulo I (**item 4**) desta tese. Esse estudo propiciou um desdobramento para o isolamento seletivo da artepilina C no extrato etanólico, que será abordado no Capítulo II (**item 5**), bem como o desenvolvimento da separação e isolamento dos demais constituintes presentes no extrato etanólico da própolis verde, que será discutido no Capítulo III (**item 6**). Ao explorar tais questões, esta pesquisa visa suprir as lacunas existentes no conhecimento acerca da própolis verde, ao mesmo tempo em que estabelece diretrizes para investigações futuras em cromatografia contracorrente

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente trabalho visa evidenciar o potencial da técnica de CCC na obtenção de metabólitos especiais da própolis verde a partir do fracionamento do extrato hexânico e etanólico destacando a escolha adequada do sistema de solventes e do modo de eluição para otimizar a eficiência do processo. Destacar o baixo custo operacional e a excelente reprodutibilidade na obtenção de frações semi-purificadas de matrizes complexas. O estudo também visa contemplar a avaliação da atividade biológica dos extratos e das substâncias isoladas, focando na sua eficácia contra o SARS-CoV-2 e o câncer de mama.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar sistemas de solventes para ser usado em CCC para o fracionamento de um extrato hexânico de própolis verde coleta em Paracambi, no Estado do Rio de Janeiro
- Avaliar os diferentes modos de eluição realizados em CCC para o isolamento e purificação das substâncias do extrato hexânico de própolis verde.
- Separar e isolar os metabólitos especiais do extrato de própolis verde.
- Escalonar do fracionamento mais eficiente.
- Otimizar sistemas de solventes como estratégia para o isolamento seletivo da artepilina C em um extrato etanólico de própolis verde do Estado do Rio de Janeiro e avaliar o *fingerprint* por LCQTOF
- Explorar a cromatografia contracorrente multidimensional (MDCCC) para um estudo fitoquímico de um extrato etanólico de própolis verde do Estado do Rio de Janeiro.
- Caracterizar espectroscopicamente as substâncias isolados da propolis verde por RMN ^1H e ^{13}C (uni e bidimensional), GC-MS e LCMS-QToF.
- Avaliar a atividade biológica dos extratos e das substâncias isoladas em CCC na inibição da interação entre o domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína *spike* e o receptor da proteína ACE2 através do imunoensaio LumitTM.
- Avaliar o efeito dos extratos hexânico e etanólico de própolis verde dos constituintes isolados sobre a viabilidade celular de linhagem de adenocarcinoma de mama (MCF-7 e MDA-MB-231).

CAPÍTULO I:

ISOLAMENTO POR CROMATOGRAFIA CONTRACORRENTE DE BIOMARCADORES DE PRÓPOLIS VERDE: POTENCIAIS BLOQUEADORES DE INTERAÇÃO RBD e ACE2 do SARS-COV-2.

4. CAPÍTULO I - ISOLAMENTO POR CROMATOGRAFIA CONTRACORRENTE DE BIOMARCADORES DE PRÓPOLIS VERDE: POTENCIAIS BLOQUEADORES DE INTERAÇÃO RBD e ACE2 do SARS-COV-2.

SANTOS, Cristiane Cardoso dos; SILVA, Alicia Fontoura da; CASTRO, Rosane Nora; PIRES, Lucas de Oliveira; CAMPOS, Mariana Freire; OLIVEIRA, Beatriz A.C. de; ALLONSO, Diego; LEITÃO, Suzana Guimarães; LEITÃO, Gilda Guimarães. Countercurrent chromatography isolation of green propolis biomarkers: potential blockers of SARS-COV-2 RBD and ACE2 interaction. *Journal Of Chromatography A*, [S.L.], v. 1734, p. 465265, out. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2024.465265>.

Resumo

A própolis é uma mistura resinosa natural produzida por abelhas com inúmeras atividades biológicas. Considerando o potencial recentemente relatado da própolis como adjuvante no tratamento da COVID-19, foi desenvolvida uma metodologia para o fracionamento do extrato hexânico da própolis verde brasileira (EHPV) para a obtenção de biomarcadores prenilados por cromatografia contracorrente. A inibição da interação entre o domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína spike e o receptor da proteína ACE2 foi avaliada pelo imunoensaio Lumit™. O fracionamento do EHPV foi realizado pelos modos de eluição-extrusão de fase normal (CCC1 e CCC2, com eluição estendida) e reversa (CCC3) com o sistema de solvente hexano-etanol-água 4:3:1. O modo de eluição normal do CCC1 (471 mg EHPV em um volume de coluna de 80 mL, 1,6 mm id) foi escalonado (CCC5, 1211 mg EHPV em um volume de coluna de 112 mL, 2,1 mm id), levando ao isolamento de 89,9 mg de artepilina C, 52,7 mg de bacarina, e 26,6 mg de culifolina, com purezas de 93%, 83% e 88%, respectivamente, por HPLC-PDA. Entre as substâncias isoladas, artepilina C e bacarina, apresentaram os melhores resultados no imunoensaio Lumit™, mostrando 67% e 51% de inibição, respectivamente, na concentração de 10µM. Esta técnica provou ser de baixo custo operacional e excelente reprodutibilidade.

Palavras-chave: biomarcadores de própolis verde; artepilina C, bacarina, cromatografia contracorrente; química verde.

Abstract

Propolis is a natural resinous mixture produced by honeybees with numerous biological activities. Considering the recently reported potential of propolis as an adjuvant in COVID-19 treatment, a methodology for the fractionation of the hexane extract of Brazilian green propolis (HEGP) was developed for the obtention of prenylated biomarkers by countercurrent chromatography. The inhibition of the interaction between the receptor binding domain (RBD) of spike protein and ACE2 protein receptor was evaluated by the LumitTM immunoassay. Fractionation of HEGP was performed by both normal (CCC1 and CCC2, with extended elution) and reversed (CCC3) phase elution-extrusion modes with the solvent system hexane–ethanol–water 4:3:1. The normal elution mode of CCC1 (471 mg HEGP in a 80 mL column volume, 1.6 mm id) was scaled-up (CCC5, 1211 mg HEGP in a 112 mL column volume, 2.1 mm id), leading to the isolation of 89.9 mg of artepillin C, 52.7mg of baccharin and 26.6 mg of culifolin, with purities of 93%, 83% and 88%, respectively, by HPLC-PDA. Among the isolated substances, artepillin C and baccharin presented the best results in the LumitTM immunoassay, showing 67 % and 51 % inhibition, respectively, at the concentration of 10 μ M. This technique proved to be of low operational cost and excellent reproducibility.

Keywords: green propolis biomarkers; artepillin C, baccharin, countercurrent chromatography; green chemistry.

4.1. Introdução

A própolis, uma excelente fonte de substâncias bioativas naturais, é uma mistura de substâncias complexa e resinosa usada pelas abelhas para defender a colmeia (BERRETTA *et al.*, 2017). Existem basicamente três tipos principais de própolis, a própolis europeia e asiática, rica em derivados do ácido cafeico, a própolis vermelha brasileira, rica em substâncias fenólicas, e a própolis verde brasileira, obtida da *Baccharis dracunculifolia* e rica em artepilina C e bacarina, (DUTRA *et al.*, 2017; MESSERLI *et al.*, 2017). No Brasil, existem 14 tipos de própolis, que são comumente classificadas com base em suas propriedades físico-químicas (FREIRES *et al.*, 2016; FRANCHIN, *et al.*, 2018; AZEVEDO *et al.*, 2023), sendo a própolis verde e vermelha as mais comercializadas. Numerosas atividades biológicas, como antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antiparasitária, anticancerígena, entre outras, foram relatadas para a própolis verde brasileira (CONTIERI *et al.*, 2022; MOITA, *et al.*, 2022; COSTA *et al.*, 2020; FIORINI *et al.*, 2021; ROMERO *et al.*, 2019). Além disso, a própolis contém secreções salivares das abelhas, o que a torna um produto natural único (CUI *et al.*, 2022).

Recentemente, a própolis tem mostrado resultados promissores contra a COVID-19 quando usado como suplemento alimentar, reduzindo a gravidade e a duração dos sintomas associados à doença, inibindo a interação da proteína *spike* S1 do SARS-CoV-2 e da proteína ACE-2 em testes pré-clínicos, na prevenção da infecção de células MRC-5 pelo HCoV-229E, bem como em estudos clínicos com pacientes hospitalizados com COVID-19 que resultaram em redução do tempo de internação hospitalar (OZAROWSKI *et al.*, 2023; SOBRINHO *et al.*, 2022; KULAKSIZ *et al.*, 2024; SILVA-BELTRAN *et al.*, 2023). O efeito antiviral é observado não apenas pelos extratos, mas também pelas substâncias biologicamente ativas contidas na própolis, por exemplo, apigenina, ácido cafeico, crisina, caempferol, artepilina C e quercetina.

Ao longo dos anos, muitos estudos relataram a composição química de amostras de própolis da Europa, América do Sul e Ásia (STURM *et al.*, 2020). A própolis europeia e chinesa contém principalmente, flavonoides e ácidos fenólicos, enquanto as substâncias predominantes na própolis brasileira são terpenoides e derivados prenilados do ácido *p*-cumárico, como artepilina C e drupanina. A própolis verde produzida pelas abelhas *Apis mellifera* no Brasil tem duas origens botânicas distintas, dependendo da localização geográfica. Nas regiões sudeste e centro-oeste, a própolis verde é derivada de *Baccharis dracunculifolia* DC (*Asteraceae*), enquanto na região da Caatinga do nordeste, é proveniente de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (*Fabaceae*), sendo designada como própolis verde da Caatinga (HOSSAIN *et al.*, 2022; QUEIROGA *et al.*, 2014; SON *et al.*, 2022; HERRERA-LOPEZ *et al.*, 2022; SON *et al.*, 2023). Numerosas substâncias já foram isoladas e identificadas das folhas e flores de *B. dracunculifolia*, como os flavonoides naringenina, acacetina, di-hidrocaempferol, isosakuranetina e canferide; ácidos fenólicos (*p*-cumárico, di-hidrocumárico, ferúlico, gálico, cafeico e vários derivados de ácido cafeoilquínico), bem como ácidos fenólicos prenilados (artepilina C, bacarina, drupanina) e triterpenoides pentacíclicos (GAZIM *et al.*, 2022; BASTOS *et al.*, 2024; BARBOSA *et al.*, 2022).

O isolamento preparativo de constituintes químicos de matrizes complexas é fortemente dependente de métodos de separação cromatográfica eficientes. É imperativo escolher um processo de baixo custo, que seja rápido, reproduzível e sem ou mínimas tenha perdas de amostra durante cada etapa. Em geral, a aplicação sequencial de técnicas cromatográficas preparativas em várias etapas fornece os analitos desejados em purezas adequadas. No entanto, os rendimentos são frequentemente muito baixos. Portanto, estratégias para superar protocolos de várias etapas e/ou baixas taxas de recuperação devem ser desenvolvidas com o objetivo de obter maiores quantidades de analito, especialmente quando ensaios biológicos adicionais são desejados (SEGER *et al.*, 2006; JERZ *et al.*, 2014).

A cromatografia contracorrente (CCC) é uma técnica de cromatografia de partição líquido-líquido que permite a recuperação completa do analito devido à retenção da fase estacionária sem o uso de um suporte sólido, tornando-a uma excelente escolha para superar muitos dos desafios

associados às técnicas cromatográficas de fase estacionária sólida desejados (LEITAO *et al.*, 2017; . BERTHOD *et al.*, 2016). Uma das principais vantagens da CCC é sua alta capacidade de carga, tornando-a especialmente útil para separações preparativas, ao mesmo tempo em que é versátil, pois uma ampla variedade de sistemas de solventes pode ser usada, bem como diferentes modos de operação (HUANG *et al.*, 2016). Devido a essas vantagens, ela tem sido cada vez mais implementada no isolamento em escala laboratorial de produtos naturais bioativos (JERZ *et al.*, 2014).

Nesse contexto, a CCC tem sido uma abordagem típica no fracionamento e purificação de compostos de própolis em modos de eluição isocráticos e gradientes (JERZ *et al.*, 2014; LOPEZ *et al.*, 2024). Vários sistemas de solventes diferentes foram usados, incluindo aquosos (como o mais popular hexano-acetato de etila-metanol-água) (LOPEZ *et al.*, 2024) e não aquosos, como hexano-acetonitrila (JERZ *et al.*, 2014) em modos de eluição isocráticos ou gradientes.

Jerz e colaboradores (2014) usaram a abordagem de fracionamento por cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC) acoplada à detecção por espectrometria de massa *off-line* (APCI-MS) das frações obtidas para investigar a composição da própolis da Arábia Saudita. O sistema de solvente não aquoso hexano-acetonitrila no modo de eluição reversa resultou em bom fracionamento, e os triterpenos cicloartenol e 24-metileno-cicloartenol puderam ser identificados. Em um estudo com própolis verde brasileira, o modo de eluição gradiente foi usado no isolamento de HSCCC de produtos de degradação de artepilina C (ARRUDA *et al.*, 2020).

Por essas razões, neste capítulo será abordado o isolamento dos biomarcadores artepilina C, e bacarina, do extrato hexânico de própolis verde (EHPV) do Rio de Janeiro usando a técnica CCC, além de avaliar o potencial do extrato hexânico e etanólico da própolis verde e as frações purificadas e obtidas por CCC, na interação entre o domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína *Spike* do SARS-CoV-2 e o receptor da proteína ACE2.

4.2. Materiais e métodos

4.2.1. Solventes e Reagentes

Os solventes orgânicos utilizados para a preparação dos extratos brutos foram de grau analítico. Para separações HSCCC, os solventes foram de grau HPLC ou ACS analítico, todos adquiridos da Tedia Brazil (Rio de Janeiro, Brasil). Todas as soluções aquosas foram preparadas com água pura produzida pelo sistema de água Milli-Q (Direct-Q® 3UV, EUA).

4.2.2. Preparação de extratos brutos de própolis verde

Própolis verde bruta foi obtida diretamente de produtores da cidade de Paracambi (Estado do Rio de Janeiro - Brasil) no ano de 2012. Cerca de 3 g de própolis pulverizada foi colocada dentro de um cartucho de celulose e submetida à extração com Soxhlet por 6 h, utilizando 150 mL de n-hexano para obtenção de EHPV e 150 mL de etanol (96%) para obtenção do extrato etanólico de própolis verde (EEPV). Após o procedimento, os extratos EHPV e EEPV foram deixados em refrigerador durante a noite (12h) para promover a precipitação de parte da cera (PIRES & CASTRO, 2023; CASTRO & SALGUEIRO, 2016). O procedimento para obtenção de EHPV foi repetido seis vezes para acumular extratos e cada um dos extratos de EHPV foram utilizadas nos cinco fracionamentos por CCC

4.2.3. Equipamento de cromatografia contracorrente de alta velocidade

Os fracionamentos dos extratos de própolis foram conduzidos no aparelho P.C. Inc., Potomac, MD, EUA, equipado com uma bobina tripla. A coluna de 80 ml (1,6 mm I.D.) e a coluna de 70 mL (1,6 mm I.D.) foram usadas em todos os fracionamentos semipreparativos (**Figura 26**).

Os fracionamentos em escala aumentada de EHPV foram realizados na coluna de 112 mL de um cromatógrafo de contracorrente Quattro HT-Prep (AECS®, Bridgend, Reino Unido) equipado com duas bobinas contendo duas colunas multicamadas de politetrafluoroetileno (PTFE) cada (coluna 1: 26 mL, 1,0 mm I.D., coluna 2: 224 mL, 3,2 mm I.D., coluna 3: 112 mL, 2,0 mm I.D., coluna 4: 120 mL, 2,0 mm I.D.). A velocidade de rotação foi ajustada até 865 rpm (**Figura 26**).

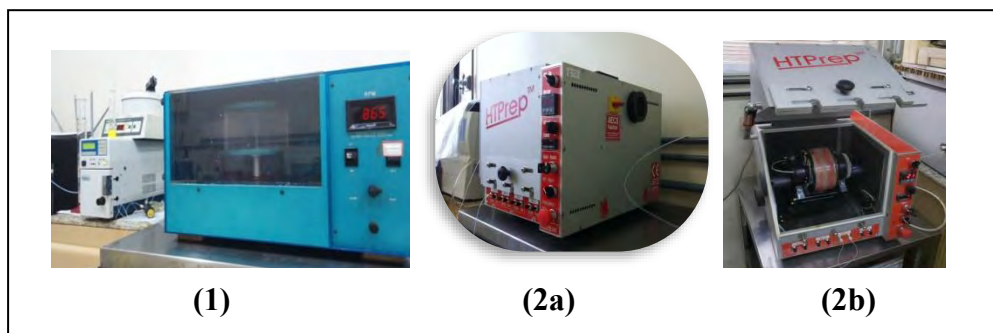


Figura 26 - Equipamentos utilizados no fracionamento da própolis verde. **1:** P.C. Inc.; **2a:** Quattro HT-Prep, fechado e **2b:** Quattro HT-Prep aberto equipado com as colunas.

Ambos os sistemas HSCCC foram conectados a uma bomba de fluxo constante Waters Modelo M-45 (WATERS, MA, EUA) e a um coletor de frações Bio-Rad modelo 2110 (Bio-Rad, EUA). Uma alça de injeção de amostra PEEK de 5 mL conectado a uma válvula de injeção de 6 vias (Black, Bulkhead, Polyimide/PTFE, 1/16" OD Tubing; 1/EA, modelo V-451, Index Health & Science LLC, EUA) foi usado para injetar a amostra. As separações foram realizadas em temperatura ambiente e ambos os equipamentos estão localizados no lab CCC no IPPN da UFRJ.

4.2.4. Seleção de sistema de solvente bifásico para fracionamentos de HSCCC

A seleção do sistema de solvente apropriado para o fracionamento de EHPV foi feita pelo experimento de frasco agitado, onde a amostra (2 mg) foi dissolvida em diferentes sistemas de solvente (**Tabela 1, Figura 27**). A estimativa visual dos valores do coeficiente de partição (K) dos compostos alvo foi obtida pela aplicação de volumes iguais de cada fase lado a lado separadamente em placas de cromatografia em camada fina (CCD) de sílica gel (Merck Art. 64271, Darmstadt, Alemanha), desenvolvidas com o sistema de solvente hexano:acetona (70:30, v/v).

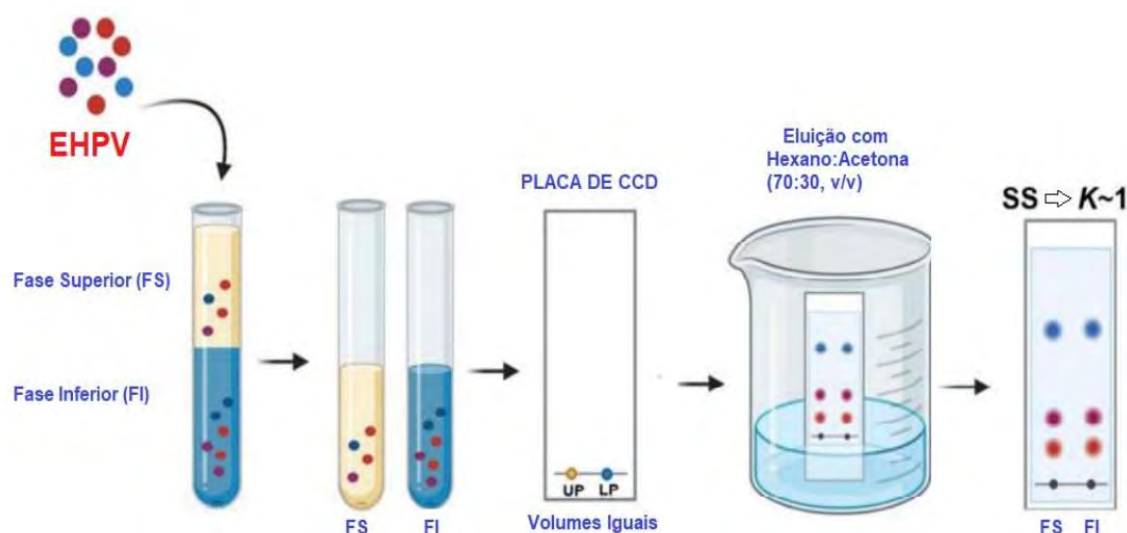


Figura 27-Teste de partição em tubo de ensaio. Adaptado da apostila CCC2024 Pre-Conference Short Course

A metodologia utilizada no teste de partição (**Figura 27**) foram primeiro visualizados sob luz UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$ e 365 nm) e então pulverizados com reagente de vanilina-ácido sulfúrico seguido de aquecimento (**Figura 28**). O cálculo de K e α (fator de separação) para as substâncias alvo artepilina C, 1 (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) e bacarina, 2 (ácido benzenopropanóico, 4-[(*E*)-2-carboxietenil]-2-(3-metil-2-buten-1-il) fenil éster) nos modos de eluição normal e reversa foram realizados em todos os sistemas (**Tabela 1**). Foi possível identificar artepilina C, bacarina e culifolina na CCD por comparação de padrões cedidos por Pires (2019).

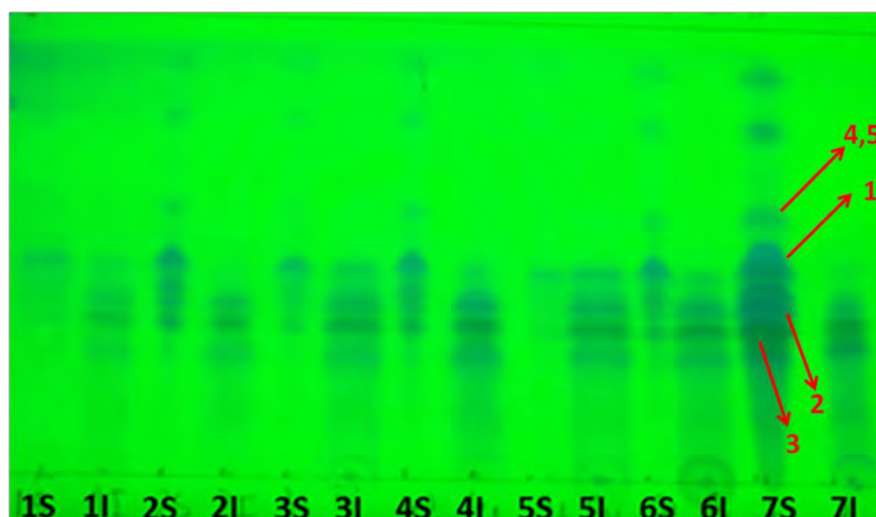


Figura 28-Resultados de CCD da seleção do sistema de solvente pelo teste de partição em tubo de ensaio para o fracionamento HSCCC do extrato hexânico de própolis verde (EHPV). Substâncias: (1): artepilina C, (2): bacarina, (3): culifolina e a (4 e 5) mistura de triterpenos ácidos ambônico e mangiferônico. Sistemas de solvente testados onde (S) significa fase superior e (I) significa fase inferior: (1) hexano-etanol-água 2:2:1, (2) hexano-metanol-água 2:2:1, (3) hexano-etanol-água 4:3:1, (4) hexano-metanol-água 4:3:1, (5) hexano-etanol-água 5:4:1, (6) hexano-metanol-água 5:4:1, (7) hexano-acetato de etila-metanol-água 1:1:1:1. A placa de CCD foi eluída com o sistema de solvente hexano:acetona (7:3, v/v) seguido de visualização sob luz UV (254 nm).

O sistema hexano-etanol-água (4:3:1) foi selecionado após ambos os resultados de CCD (**Figura 28**) e valores de K calculados para os alvos prenilados. Os valores de K das substâncias alvos

e fatores de seletividade foram calculados pela dissolução dos resíduos obtidos pela evaporação de cada uma das fases (fases superior e inferior) dos sistemas de solventes testados, em 1 mL de metanol e analisados por HPLC-PDA. O valor de K foi expresso como a área do pico do composto na fase estacionária dividida pela área do pico do composto na fase móvel. O $\alpha = K_2 / K_1$, $K_2 > K_1$ (CONWAY, 1990). Todos os K resultantes para as substâncias 1 (artepilina C) e 2 (bacarina), resumidos na **Tabela 1**, foram obtidos pela escolha da área do pico correspondente para cada composto prenilado dentro do cromatograma do extrato de hexânico.

4.2.5.Procedimento de separação por HSCCC

O sistema de solvente hexano-etanol-água 4:3:1 (v/v) foi usado em todos os fracionamentos de EHPV. O sistema bifásico foi feito misturando solventes apropriados em um funil de separação e após o equilíbrio as fases foram separadas e desgaseificadas antes do CCC ser executado. A serpentina foi primeiro preenchida inteiramente com a fase estacionária sem rotação e então a fase móvel foi bombeada com uma rotação de 980 e 860 rpm para o PCInc e Quattro HT-Prep, respectivamente, até que o equilíbrio das duas fases fosse atingido (**Figura 29**). Então, EHPV (quantidade descrita na **Tabela 2**) dissolvido em 5 mL do sistema de solvente selecionado (1:1, v/v) foi introduzido na serpentina através de uma válvula de injeção de amostra manual de 6 vias, usando uma alça de injeção de amostra de 5 mL.

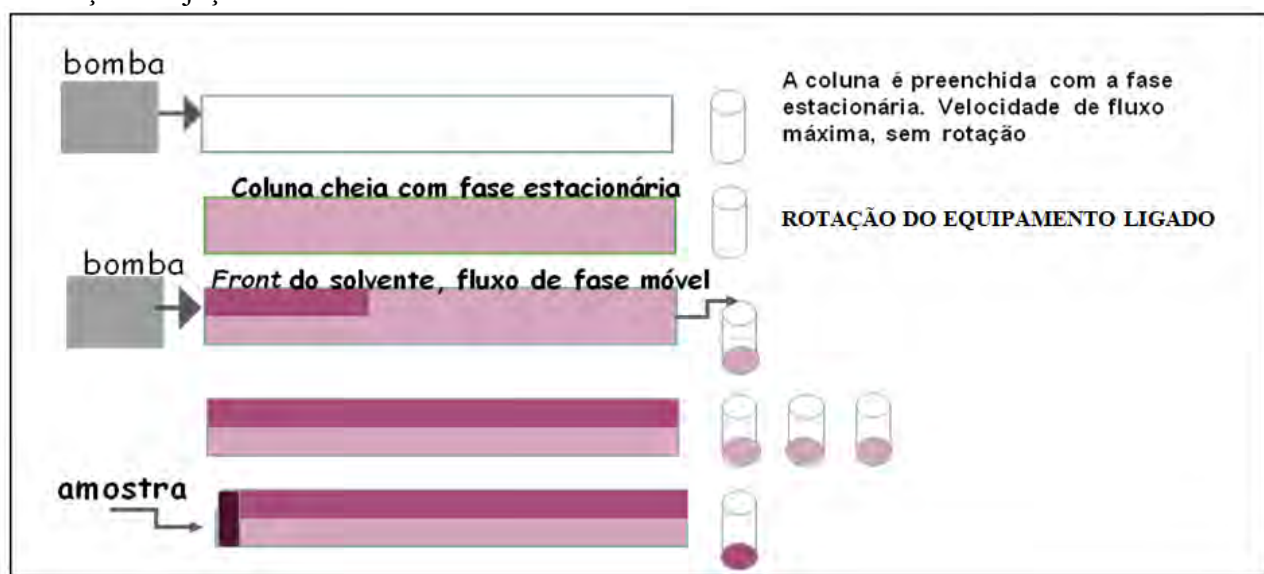


Figura 29- Modo de operação do equipamento

Os fracionamentos para CCC1, CCC2, CCC4 e CCC5 de EHPV foram realizados no modo de eluição normal (cauda-cabeça, fase superior orgânica como fase móvel). O CCC3 foi realizado na direção cabeça-cauda (modo de eluição reversa, com a fase inferior aquosa como fase móvel). Os fracionamentos semipreparativos CCC1 a CCC3 foram realizados no aparelho PC Inc, a uma taxa de fluxo de fase móvel de $2,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, enquanto os fracionamentos dos escalonamentos CCC4 e CCC5 foram realizados no aparelho Quattro HT-Prep com taxa de fluxo de fase móvel de $2,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Frações de 4 mL foram coletadas nos fracionamentos CCC1 a CCC3, e frações de 5 mL foram coletadas nos fracionamentos CCC4 e CCC5, que foram analisados por cromatografia em camada fina (CCD) seguida de visualização sob luz UV (254 e 365 nm) e então pulverizados com reagente vanilina sulfúrica (**Figura 32**).

Os parâmetros analíticos para cada fracionamento EHPV são descritos na **Tabela 2**. Todos os fracionamentos foram realizados no modo operacional de eluição-extrusão. Todas as frações foram

evaporadas até a secura (SpeedVac SPD 121P, Refrigerator Vapor Trap RVT400, Thermo Savant, EUA) e transferidas para frascos pesados.

4.2.6. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

O perfil cromatográfico das frações obtidas em CCC1 a CCC5 foi analisado em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (Shimadzu, modelo GC-MS -QP2010 Plus, Kyoto, Japão) e equipado com um amostrador automático (Shimadzu, modelo AOC-20i, Kyoto, Japão). A separação foi realizada em uma coluna capilar de sílica fundida (HP-5, 5% fenil-95% dimetilpolisiloxano, 30 m x 0,25 mm I.D. x 0,25 µm de espessura de filme, Agilent Technologies, CA, EUA). As amostras foram injetadas em um modo split (1:30, 1 µL) com a temperatura do injetor a 230 °C. A temperatura do forno foi mantida a 120 °C por 3 minutos, aumentada de 120 para 290 °C a 7 °C/min e mantida a 290 °C por 25 minutos. O hélio foi usado como gás de arraste sob um fluxo constante de 1 mL.min⁻¹. O espectrômetro de massa foi operado no modo de impacto de elétrons (EI) a 70 eV. As amostras foram analisadas no modo de varredura (40-800 Da) e a interface foi mantida a 310 °C. Os dados foram adquiridos e processados usando o software LabSolutions (versão 4.30, Shimadzu) comparados com a biblioteca NIST 2008 e NIST 2023.

4.2.7. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os perfis cromatográficos dos extratos EHPV e EEPV, bem como das frações obtidas em CCC1 a CCC5, foram avaliados em um cromatógrafo líquido Prominence Shimadzu série LC-20A equipado com uma bomba (LC-20AT), degaseificador *on-line* (DGU-20A), forno de coluna (CTO-20A), amostrador automático (SIL-20AC) e detector PDA (SPD-M20A). A aquisição de dados foi processada pelo software LCSolution (versão 1.24, Shimadzu, Kyoto, Japão). As análises foram realizadas em uma coluna de fase reversa C18 (250 mm x 4,6 mm I.D. x 5 µm, BetaSil-ThermoScientific™), mantida a 40 °C. A fase móvel utilizada foi água acidificada com 1% de ácido acético (solvente A) e metanol acidificado com 1% de ácido acético (solvente B), com vazão constante de 1,0 mL.min⁻¹ e volume de amostra injetado de 15 µL. O gradiente iniciou com 35% de solvente B, aumentando para 80% de B em 20 min, depois 85% de B em 5 min, 90% de B em 5 min, 95% de B em 2 min e 100% de B em 3 min, retornando para 35% de B após 40 min. As amostras (2 mg.mL⁻¹) foram dissolvidas em metanol de grau espectroscópico, e a solução foi filtrada através de um filtro (13 mm x 0,45 µm, PVDF, Analítica). A identificação das substâncias foi baseada na comparação de seus tempos de retenção e espectros UV com padrões comerciais ou compostos previamente isolados (CHAVES *et al.*, 2019). Cada amostra e padrão foram analisados individualmente, e os cromatogramas foram monitorados em 280 e 315 nm, uma vez que a maioria dos derivados prenilicos identificados na própolis verde absorvem nessas regiões.

4.2.8. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Todos os experimentos de RMN foram realizados a uma temperatura de 353K em um espectrômetro Bruker Ultrashield Plus a uma frequência de 500 MHz para ¹H e 125 MHz para ¹³C, respectivamente. As substâncias isoladas foram analisadas em solventes deuterados (CDCl₃, acetona-d₆, DMSO-d₆) com tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os deslocamentos químicos (δ) foram obtidos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) foram medidas em Hz (Hz).

4.2.9. Ensaios de interação SARS-CoV-2 RBD e ACE2

Os ensaios foram realizados pela doutoranda Mariana Freire Campos em colaboração com a Profa Suzana Guimarães Leitão (Laboratório FitosFar, UFRJ). Para investigar se os extratos de

própolis verde brasileira e biomarcadores isolados seriam capazes de inibir a formação do domínio de ligação ao receptor (RBD) e do complexo da enzima conversora de angiotensina humana 2 (ECA2), foi utilizado o imunoensaio LumitTM (Promega, Madison, WI, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram totalmente solubilizadas em DMSO (dimetilsulfóxido - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Resumidamente, as amostras foram adicionadas a placas brancas de fundo plano na concentração final de 250 µg.mL⁻¹ (extratos) e 10µM (substâncias isoladas), seguido pelos reagentes RBD (7,5 nM) e ACE2 (7,5 nM). A detecção foi realizada usando anticorpos secundários acoplados a partículas luminescentes que se reconstituem na ausência de um inibidor, gerando um sinal luminoso. Após 1 hora de incubação, a luminescência dos poços foi lida no leitor de placas Spectramax M5 (Molecular Devices, San Jose, CA, EUA), em 500 ms de exposição. Os dados foram processados usando o software GraphPadPrism 8.

4.2.10. Ensaio de citotoxicidade Vero E6

Os ensaios foram realizados pela doutoranda Mariana Freire Campos em colaboração com a Profa Suzana Guimarães Leitão (Laboratório FitosFar, UFRJ). Células Vero E6 (2 × 10⁴ células/poço) foram incubadas em placas de 96 poços com os extratos (250, 125, 50 e 25 µg.mL⁻¹) e as substâncias isoladas (100, 10, 1, 0,1 e 0,01 µM) por 24h a 37 °C, 5% de CO₂. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio MTT. Resumidamente, 5 mg.mL⁻¹ de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT, Sigma-Aldrich) em 1× PBS foram adicionados a monocamadas de células por 4h a 37 °C, 5% de CO₂. Em seguida, foi adicionado 100% de DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich), e as placas foram lidas em um leitor de microplacas M5 Spectramax (Molecular Devices), a 540 nm. Todas as amostras foram ressuspensas em 100% de DMSO para os testes *in vitro*, não excedendo 1% (v/v) e, portanto, não afetando o crescimento celular. A viabilidade celular total foi determinada pela quantificação da metabolização do corante por células não tratadas normalizadas para o controle do veículo (n = 3).

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Separação de biomarcadores de própolis por HSCCC

O extrato hexânico de própolis verde (EHPV) foi escolhido para fracionamento por CCC, uma vez que estudos anteriores por HPLC-PDA mostraram que este extrato é o mais rico nas substâncias preniladas quando comparado ao extrato etanólico, evidenciando a seletividade do solvente mais apolar (n-hexano) para a extração destes constituintes da própolis (PIRES & CASTRO *et al.*, 2023). O isolamento por CCC permitiu observar as principais substâncias preniladas: artepilina C **1** (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico); bacarina **2** (éster 4-[(1*E*)-2-carboxietenil]-2-(3-metil-2-butenil) fenil do ácido benzenopropanóico) e culifolina **3** (2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2*H*-1) além dos triterpenos pentacíclicos: ácido ambônico **4** e ácido mangiferônico **5** (Figura 30).

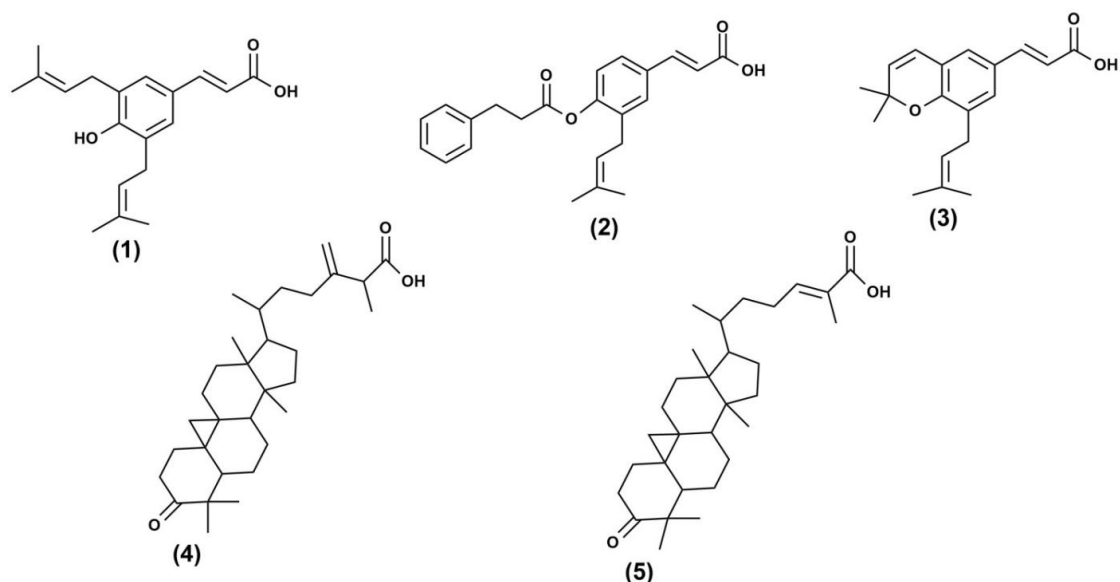


Figura 30 - Estruturas das substâncias isoladas da própolis verde brasileira. (1) artepilina C; (2) bacarina; (3) culifolina; (4) ácido ambônico; (5) ácido mangiferônico.

Três fatores foram determinantes para a escolha de EHPV para fracionamento de CCC foram, primeiro, o fato de não haver variação significativa no conteúdo de artepilina C entre os extratos hexânico e etanólico (PIRES & CASTRO, 2023), seguido por se observar teores mais altos de bacarina no extrato hexânico (observado por HPLC-PDA), além da baixa solubilidade do extrato etanólico ao utilizar sistemas de solventes contendo metanol e água.

Sete sistemas de solventes foram inicialmente estudados para o fracionamento de EHPV por HSCCC (**Tabela 1**); as razões de volume de solventes e modos de eluição foram modificadas de forma a fornecer valores de K adequados. Os valores de K das substâncias prenhaladas alvo em cada sistema de solvente foram calculados escolhendo a área de seu pico correspondente no cromatograma de HPLC-PDA do EHPV, seguindo a definição de K , por exemplo, a concentração da substância alvo na fase estacionária dividida pela sua concentração na fase móvel (CONWAY, 1990).

Tabela 1. Coeficiente de partição (K) e fator de separação (α) dos biomarcadores artepilina C, 1, e bacarina, 2, no extrato hexânico de própolis verde (EHPV) calculados para o modo de eluição em fase normal.

Número do Sistema solvente	Sistema de solventes	Proporção de solvente (v/v)	K_1	K_2	α
1	hexano- etanol- água	2:2:1	1.19	0.56	2.12
2	hexano – metanol - água	2:2:1	1.16	0.56	2.07
3	hexano – etanol - água	4:3:1	1.28	0.77	1.66
4	hexano – metanol - água	4:3:1	1.09	0.58	1.88
5	hexano-etanol- água	5:4:1	1.09	0.53	2.06
6	hexano – metanol - água	5:4:1	1.46	0.64	2.28
7	hexano- acetato de etila-metanol-água	1:1:1:1	0.57	0.56	1.02

¹ artepilina C (tempo de retenção por HPLC-PDA: 25.18 min)

² bacarina (tempo de retenção por HPLC-PDA: 28.28 min)

O sistema solvente contendo hexano-etanol-água é um sistema solvente genérico composto por dois solventes, hexano e água, com polaridades muito distintas e opostas, e um terceiro solvente etanol (ou metanol) que atua como uma ponte de polaridade entre esses dois solventes e pode servir como um solvente auxiliar para promover melhor partição de compostos entre as duas fases líquidas imiscíveis. Como as substâncias no extrato hexânico da própolis verde brasileira têm baixa a média polaridade, esse sistema solvente foi então selecionado para seu fracionamento inicial. Esse sistema solvente foi relatado recentemente para o fracionamento preparativo da própolis vermelha brasileira (LOPEZ *et al.*, 2024).

O sistema solvente quaternário hexano-acetato de etila-etanol-água, por outro lado, é útil para o fracionamento de substâncias de média a moderada polaridade mais alta, sendo sua polaridade ajustada pelas proporções de solventes. Nos sistemas 1 a 6, os valores de K para artepilina C, 1 e bacarina, 2, variaram de 1,09-1,46 e 0,53-0,64, respectivamente, na faixa de intervalo desejado para uma boa resolução ($0,5 < K < 2,5$) (BERTHOD *et al.*, 2016), significando uma purificação com pelo menos um volume de coluna ($K=1$). Pode-se observar pelos dados da **Tabela 1** que as substâncias 1 e 2 são mais retidos na fase estacionária (considerando o modo de eluição normal) com o aumento da razão hexano nos sistemas contendo etanol como solvente ponte (sistemas 1 e 3), enquanto o efeito oposto é observado quando o metanol é o solvente auxiliar (sistemas 2 e 4). Em vez disso, nos sistemas 5 e 6, ao aumentar tanto o hexano quanto o álcool (etanol ou metanol), ocorre a situação oposta: ao adicionar mais etanol e, ao mesmo tempo, mais hexano para modificar o sistema 1 (sistema 5), o valor de K da artepilina C diminui de 1,19 para 1,09.

Por outro lado, quando o metanol é usado, o valor de K_1 (artepilina C) aumenta de 1,16 para 1,46. O mesmo é observado para a bacarina, embora seus valores de K são menos afetados. A redução dos valores de K para a artepilina e bacarina pode ser observada como um efeito geral da substituição do etanol pelo metanol nos sistemas testados 1-4, sendo essa diferença para o mesmo composto aumentada à medida que a proporção de hexano aumenta no sistema. Curiosamente, esse não é o caso para os sistemas 5 e 6. O sistema 7, em vez disso, deu valores de K muito semelhantes para os alvos artepilina C e bacarina, 0,57 e 0,56, respectivamente, com uma baixa seletividade (α), o que significa que ambas as substâncias não seriam separadas e eluiriam rapidamente da coluna cromatográfica HSCCC. Todos os sistemas de solventes contendo metanol (SS 2,4, 6 e 7) causaram a formação de um precipitado (provavelmente ceras, **Figura 31**) durante a solubilização da amostra, bem como ao longo do tempo de sedimentação ($t > 30s$), não atendendo a alguns requisitos básicos descritos na literatura para seleção de sistemas de solventes (BARCENAS-PEREZ *et al.*, 2021), sendo, portanto, excluídos como uma opção para o fracionamento de EHPV.

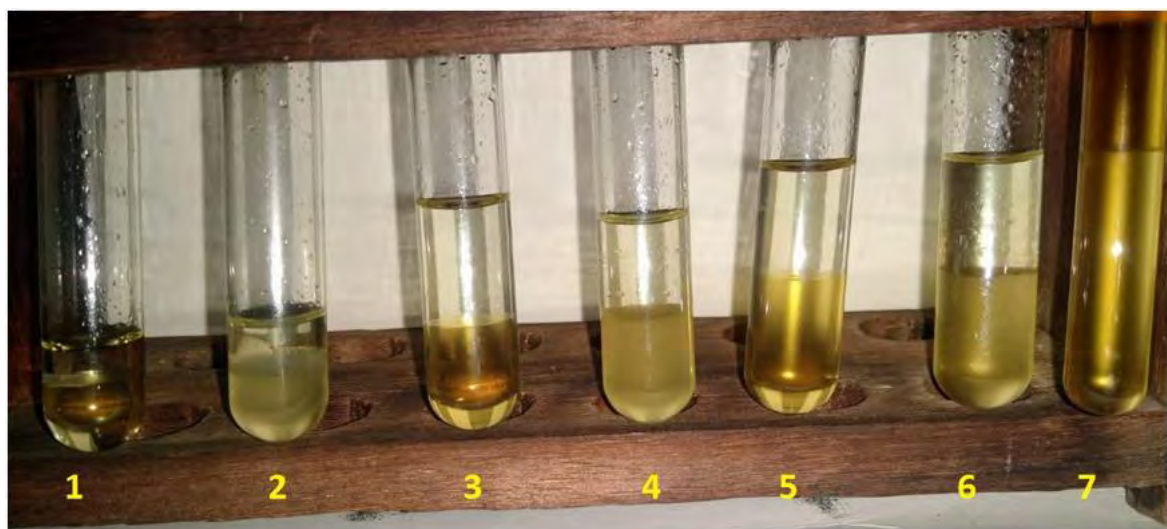


Figura 31-Testes de partição de tubos de ensaio com EHPV para sistemas de solventes 1 a 6: (1) hexano-etanol-água 2:2:1, (2) hexano-metanol-água 2:2:1, (3) hexano-etanol-água 4:3:1, (4) hexano-

metanol-água 4:3:1, (5) hexano-etanol-água 5:4:1, (6) hexano-metanol-água 5:4:1, (7) hexano-acetato de etila-metanol-água 1:1:1:1.

Comparando os sistemas 1 e 3, observa-se que ambos deram valores de K semelhantes para os compostos 1 e 2. O sistema solvente 5, quando comparado ao SS 1 e 3, foi o que deu os melhores valores de K para a artepilina e bacarina, considerando tempos de retenção e volumes, com um alto valor de α (valores acima de 1,2). No entanto, ao avaliar as razões de volume dos sistemas 1 (60:40 fase inferior /fase superior), sistema 3 (50:50 fase inferior /fase superior) e 5 (60:40 fase inferior /fase superior), optou-se pelo sistema 3 (**Figura 31**).

Com base nesses resultados, o sistema hexano-etanol-água 4:3:1 (v/v) foi selecionado para a separação CCC das substâncias prenildas do EHPV nos modos de eluição-extrusão de fase normal e reversa. Os fracionamentos foram realizados inicialmente no modo de eluição normal (CCC1 e CCC2, parâmetros analíticos conforme **Tabela 2**, a extrusão no CCC1 iniciou no tubo 40 e no CCC2, no tubo 80).

Tabela 2. Parâmetros analíticos para fracionamentos EHPV CCC1 a CCC5 por HSCCC com o sistema solvente hexano – etanol - água 4:3:1 (v/v).

Experimento	Modo de eluição	Peso da amostra(mg)	Retenção da fase estacionária (S_f)%	Aparelho/coluna/extrusão*	Total Frações
CCC1	Normal	471	88.24	PC Inc/80mL/40	65
CCC2	Normal	416	83.53	PC Inc/80mL/80	97
CCC3	Reverso	342	82.67	PC Inc/70mL/56	70
CCC4	Normal	896	88.90	HT Prep/112mL/51	67
CCC5	Normal	1211	88.90	HT Prep/112mL/60	86

*número do tubo onde a extrusão começou

Os resultados de CCD das frações CCC1 (**Figura 32**) mostraram culifolina, 3, nas frações Fr 39-45, bacarina, 2, em Fr 50-55, e artepilina C, 1, em Fr 56-60 quando comparados com amostras autênticas fornecidas por Pires e Castro (2023).

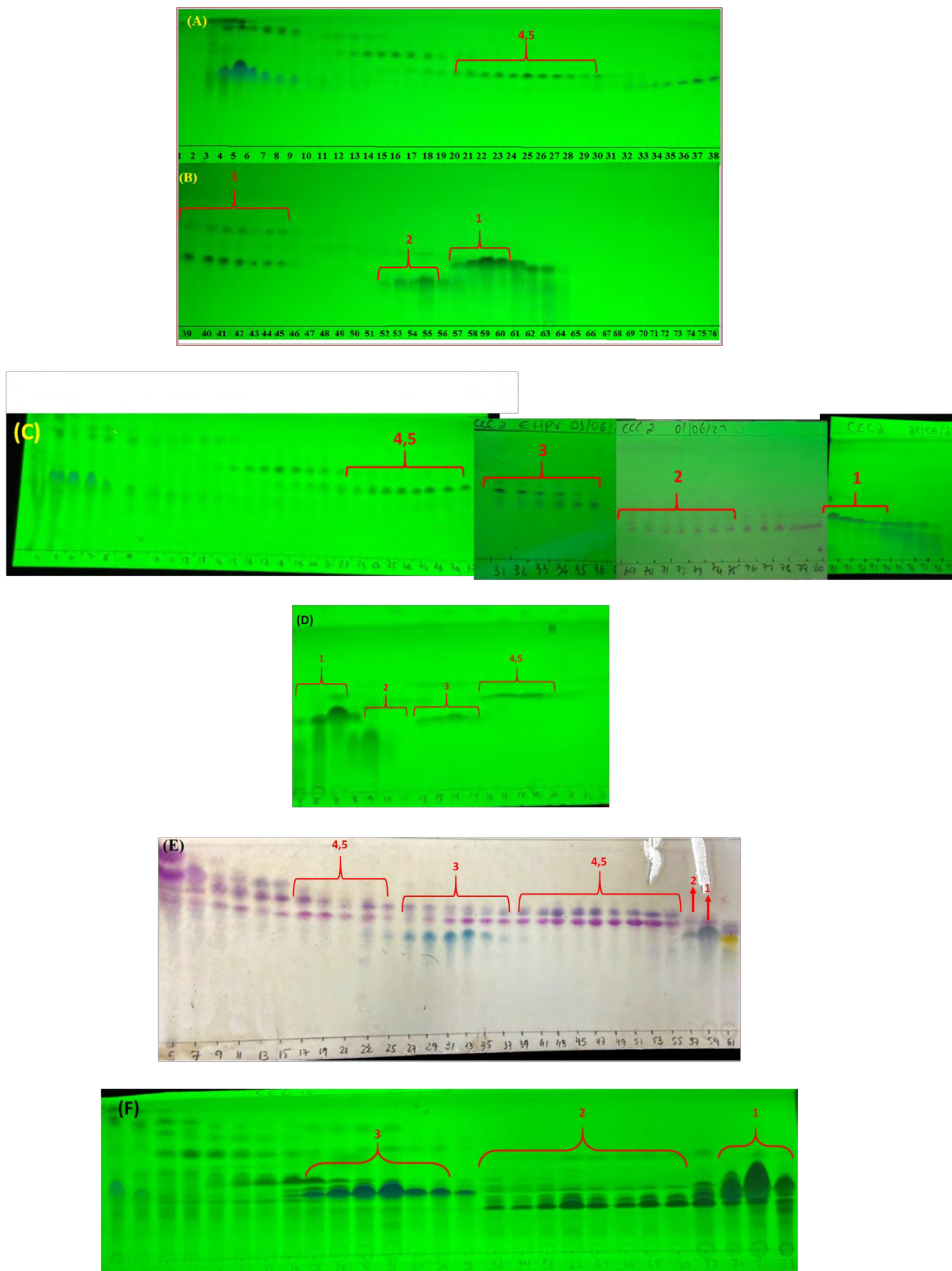


Figura 32- Substâncias: 1: artemilina C, 2: bacarina, 3: culifolina, mistura triterpênica de 4: ácidos ambônico e 5: mangiferônico. (A) e (B) Resultados de CCD de CCC1 visualizados sob luz UV ($\lambda = 45$)

254 nm). (C) Resultados de CCD de CCC2 visualizados sob luz UV ($\lambda = 254$ nm). (D) Resultados de CCD de CCC3 visualizados sob luz UV ($\lambda = 254$ nm). (E) Resultados de CCD de CCC4 pulverizado com reagente vanilina-sulfúrica. (F) Resultados de CCD de CCC5 visualizados sob luz UV ($\lambda = 254$ nm).

As purezas de cada fração avaliadas por HPLC-PDA são mostradas na **Tabela 3**. As frações contendo culifolina, 3, e bacarina, 2, quando pulverizadas com vanilina-sulfúrica apresentaram manchas de coloração roxa, características de triterpenos, que foram posteriormente identificadas como uma mistura de ácidos ambônico e mangiferônico, 4 e 5, respectivamente.

Tabela 3. Pureza por HPLC-PDA de substâncias preniladas artepilina C, 1, bacarina, 2, e culifolina, 3, obtidos de EHPV após fracionamentos CCC.

Experimento	Culifolina	Massa (mg)	% Pureza ^a	Bacarina	Massa (mg)	% Pureza	Artepilina C	Massa (mg)	% Pureza
CCC1	Fr 39-45	7.80	83*	Fr 50-55	26.20	90*	Fr 56-60	64.60	78
CCC2	Fr 37-45	19.54	54*	Fr 70-77	13.50	86*	Fr 83-93	89,73	80
CCC3	Fr 15	2.70	96 *	Fr 10-11	11.20	72*	Fr1-7	115.8	62
CCC4	Fr 29-39	33.40	74*	Fr 41-45	93.70	78*	Fr59-67	350.70	44
CCC5	Fr 26-33	26.60	88*	Fr 50-70	52.70	83*	Fr76-77	89.80	93

^aPureza cromatográfica por HPLC-PDA. *Análises de GC-MS e/ou CCD mostraram a presença de triterpenos.

Quando essas mesmas frações foram avaliadas por GC-MS (**Figura do apêndice A1 e Figura 33**), a Fração CCC1 Fr 50-55 (bacarina) confirmou a presença da mistura de triterpenos (Rt 36-38 minutos). A mistura de derivados de cicloartenol (ácidos ambônico e mangiferônico), eluídos na fração 19-24 (CCC3), foram identificados por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C (**Figura do apêndice A2-A5**) e a comparação com Silva e colaboradores (2005) confirmou a estrutura dos triterpenos (**Tabela A1**). A presença de triterpenos do tipo cicloartano (C_{30} e C_{31}) na própolis foi relatada anteriormente (SILVA *et al.*, 2005; KARDAR *et al.*, 2014; PUJIRAHAYU *et al.*, 2019; THANH *et al.*, 2019).

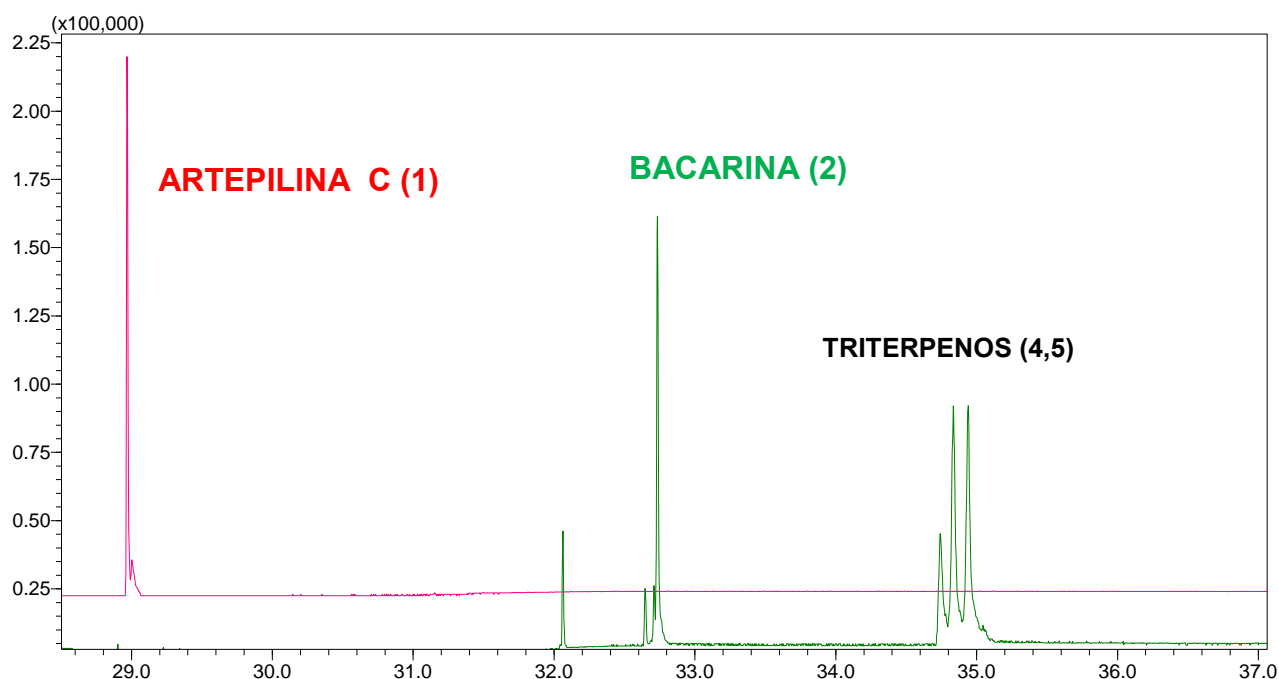


Figura 33- Cromatograma de ions totais (TIC) por GC-MS, expandido na região de 29-37 min, para análise de artepilina C (vermelho) e da bacarina (verde) mostrando a presença dos ácidos mangiferônicos e ambônico (Tr de 35,87 - 36,21 min).

Na tentativa de obter melhor resolução entre bacarina e artepilina C, e tentar evitar a contaminação de culifolina e bacarina pela mistura de triterpeno, a eluição foi realizada até o tubo 80, quando a extrusão começou. Os resultados de CCD (**Figura 32- C**) mostraram que a mistura triterpênica continuou a contaminar tanto o culifolina quanto a bacarina, e a artepilina C acabou eluindo em mais frações, reduzindo sua pureza cromatográfica por HPLC-PDA. Em uma segunda tentativa de resolver esse problema, o modo de eluição foi alterado para reverso, permitindo assim que os triterpenos eluíssem após o culifolina, aumentando sua pureza para 96% (**Tabela 3**). No entanto, essa modificação não permitiu que a bacarina e a artepilina C eluíssem puras, ao invés disso, suas purezas foram reduzidas.

As análises de HPLC-PDA, GC-MS e CCD das substâncias prenildadas obtidas após fracionamentos de CCC indicaram, em conjunto, que a melhor estratégia de purificação para obtenção de culifolina foi a eluição no modo de fase reversa, enquanto para bacarina e artepilina C, foi a eluição no modo normal (CCC3 e CCC1, respectivamente, **Tabela 3**). Portanto, CCC1 foi escolhido para o fracionamento de aumento de escala de EHPV, pois apresentou os melhores resultados para artepilina C e bacarina.

O aumento de escala em CCC pode ser desafiador quando o método é transferido entre equipamentos com design de coluna diferente para fins de aumento de escala. As metodologias de aumento de escala para CCC têm se concentrado em aumentar o carregamento da amostra, mantendo o mesmo tempo de separação. O fracionamento em escala do EHPV foi realizado com parâmetros CCC1 ajustados, inicialmente, aumentando o tamanho da amostra de 471 mg (CCC1) para 896 mg (CCC4) e depois para 1211 mg (CCC5), em uma coluna de maior volume e diâmetro interno (112 mL, 2,0 mm de diâmetro interno) (**Tabela 2**). Três parâmetros foram modificados neste processo: o volume da coluna e o diâmetro interno (de uma PC Inc. 80 mL, 1,6 mm de diâmetro interno para uma Quattro HT Prep 112 mL, 2,0 mm de diâmetro interno) e a vazão de 2,0 mL.min⁻¹ para 2,5 mL.min⁻¹. O estudo de aumento da carga da amostra não foi realizado na coluna menor (80 mL), pois houve sangramento considerável nas primeiras frações (CCC1), talvez devido à natureza do extrato resinoso, que poderia ser pior com o aumento da carga da amostra. Além disso, como CCC1 e CCC2 foram

realizados com concentração de praticamente 100 mg/mL de amostra injetada e as substâncias alvo foram obtidas com purezas menores que 90%, a resolução e a pureza podem ser reduzidas com cargas maiores, e optou-se por um volume de coluna e I.D. maiores.

De acordo com Wood e colaboradores (2007), uma boa separação é definida em termos de pureza, rendimento e tempo. Maior produtividade é alcançada separando maiores quantidades de amostra ao mesmo tempo com purezas idênticas e produzindo cromatogramas correspondentes. Existem duas maneiras diferentes de aumentar a escala dependendo das características da coluna: o aumento de escala linear deve ser aplicado a colunas de diferentes comprimentos e diferentes I.D., enquanto o aumento de escala volumétrico deve ser aplicado ao mesmo comprimento, mas colunas de diferentes I.D. Os cálculos podem ser visualizados da seguinte forma: Fator de aumento de escala linear, $SUF = A2/ A1$ e SUF volumétrico = $V2/ V1$, onde A é uma área transversal da coluna e V é o volume da coluna (COSTA *et al.*, 2016).

O cálculo para o aumento de escala volumétrico produziu um fator de 1,40. Este valor, quando multiplicado pela vazão de 2,0 mL.min⁻¹ (CCC1), exigiria uma mudança na vazão para 2,8 mL.min⁻¹, que não foi usada para evitar perda de resolução e fase estacionária, pois a taxa máxima de revolução do equipamento HT Prep é de 860 rpm. O aumento de escala linear foi aplicado ao método de transferência semipreparativo de 80 mL para 112 mL por um fator de 1,25. Este fator foi multiplicado pela vazão do CCC1 (2,0 mL/min⁻¹) resultando em um valor de 2,5 mL.min⁻¹. Valores mais altos de S_f foram obtidos (**Tabela 2**), em comparação aos experimentos do CCC1, quando o método foi transferido da coluna de 80 mL para a de 112 mL. Os resultados obtidos com a metodologia aplicada ao fracionamento de EHPV em CCC5 foram os mais eficientes para a purificação de artepilina C, rendendo 89,8 mg deste composto com 93% de pureza (HPLC-PDA) sem o uso de nenhuma outra técnica de purificação. Isso pode ser explicado em parte pela maior retenção da fase estacionária (um grande sangramento da fase estacionária foi observado em CCC1 após a injeção da amostra).

Em um estudo anterior de Pires e Castro (2023), a artepilina C foi obtida com 98% de pureza (HPLC-PDA) usando purificação em coluna aberta com sílica gel seguida por cromatografia líquida de alta eficiência semipreparativa (fase reversa). No entanto, se compararmos a grande quantidade de solvente usada em colunas abertas e o uso do solvente grau espectroscópico em CLAE semipreparativo, o CCC se destaca como uma metodologia que emprega melhor o conceito de ecologicamente amigável.

A metodologia CCC apresentada aqui para a obtenção dos biomarcadores de própolis verde artepilina C, 1 e bacarina, 2, permitiu uma diminuição no número de etapas para o isolamento dessas substâncias preniladas sem a necessidade de uma fase sólida estacionária. Além disso, foi possível obter bacarina e artepilina C de alta pureza, com um curto tempo de separação (aproximadamente 3 horas), baixo consumo de solvente e maior eficiência (**Figura 34** e **Figura 35**). Embora o processo de purificação utilize solventes orgânicos, a CCC é uma tecnologia muito mais eficiente em comparação à cromatografia líquida convencional como CLAE semipreparativa, do ponto de vista do consumo de solvente (ZHANG *et al.*, 2011). A otimização das variáveis operacionais (rendimento, eficiência e risco ambiental), juntamente com o aumento linear de escala de CCC1 para CCC5 semipreparativo foi realizada com sucesso, destacando o potencial dessa técnica.



Figura 34-Isolamento de (1) artepilina C, (2) mistura de triterpenos, (3) bacarina e (4) culifolina no fracionamento de própolis verde por CCC.

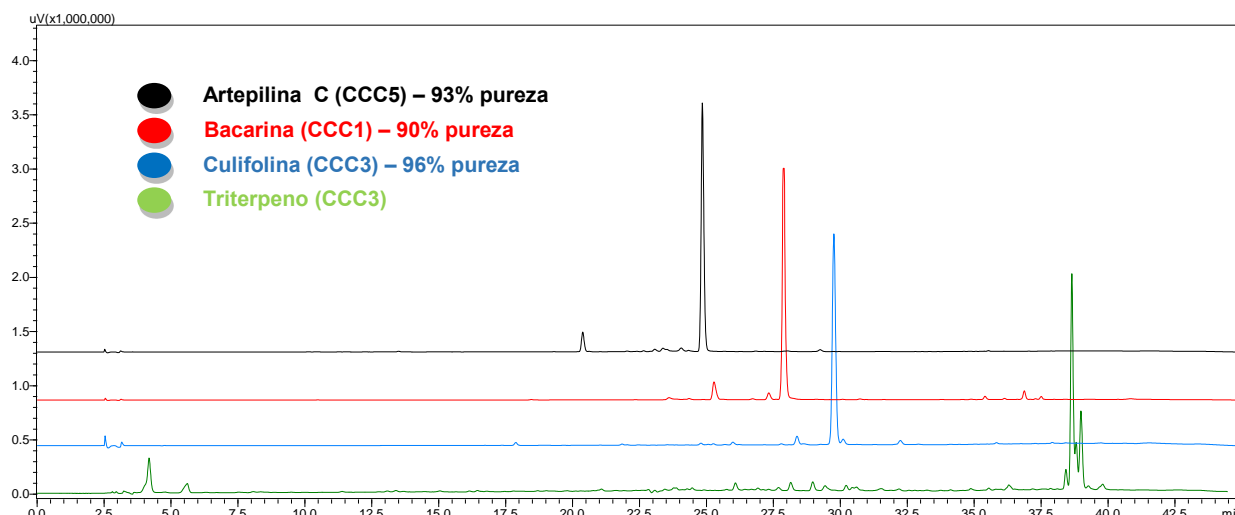


Figura 35-Perfil Cromatográfico em CLAE-DAD (280 nm) das substâncias identificadas no fracionamento de EHPV em Cromatografia Contracorrente.

A capacidade de trabalhar em modos de eluição normal (cauda-a-cabeça) ou reverso (cabeça-a-cauda), usando a mesma coluna cromatográfica, torna a CCC uma alternativa versátil e muito atraente para a separação de produtos naturais (SPORNA-KUCAB *et al.*, 2018). Neste trabalho, foi possível mostrar que o modo de eluição normal favoreceu a separação das substâncias mais polares (artepilina C e bacarina). Em contraste, o modo de eluição reversa foi caracterizado pela separação satisfatória do culifolina e da mistura de triterpenos (mais apolares).

4.3.2. Inibição da formação do complexo RBD:ACE2 por extratos de própolis verde brasileira e seus biomarcadores isolados

Tendo em vista o potencial da própolis verde para atuar como um agente anti-SARS-CoV-2 (CASSIMIRO *et al.*, 2022), EHPV, EEPV, culifolina (CCC3 FR 15, pureza de 96% por HPLC-PDA, **Figura do apêndice A10**), artepilina C (CCC5 FR 77, pureza de 96% por HPLC-PDA, **Figura do apêndice A6 e A7**) e bacarina (CCC1 FR 50-55 purificada por CLAE-FR semipreparativa de acordo com metodologia descrita em Pires e Castro (2023). Pureza de 98% por HPLC-PDA, **Figura do apêndice A8 e A9**), isolados nas frações CCC de EHPV foram submetidos a um ensaio *in vitro* de formação do complexo Spike:ACE2 para avaliar sua capacidade de inibição. Entre as amostras testadas, EEPV foi a mais eficaz, inibindo a formação do complexo em pelo menos 70% (**Tabela 4**).

Tabela 4. Taxas de inibição (em porcentagem) da formação do complexo RBD:ACE2 por extratos de própolis verde ($250\mu\text{g.mL}^{-1}$) e seus biomarcadores ($10\mu\text{M}$) avaliados pelo imunoensaio LumitTM.

Extrato/biomarcador	Inibição %
Extrato hexânico de própolis verde (EHPV)	37.8
Culifolina*	42.6
Bacarina*	51.4
Artepilina C*	67.3
Extrato etanólico de própolis verde (EEPV)	72.5

*substâncias prenildas isoladas por fracionamento CCC1 de EHPV

O extrato hexânico (EHPV), por outro lado, foi menos eficaz, reduzindo a formação do complexo em menos de 40%. Apesar da menor atividade do EHPV (37,8%), as substâncias preniladas culifolina, bacarina e artepilina C, isolados do EHPV apresentaram melhor desempenho, prevenindo em 67,3% (artepilina C) a interação RBD:ACE2, que é tão boa quanto o próprio extrato etanólico (72,5%) na concentração de 10 μ m.

Além desses resultados, tanto os extratos de própolis (EEPV e EHPV) quanto os compostos isolados não interferiram na viabilidade das células VeroE6 (**Figura apêndice A11**). Após o tratamento com EEPV e EHPV por 24 h, não foi detectada nenhuma diferença significativa na viabilidade celular (abaixo de 80%). Os mesmos resultados foram observados para bacarina, artepilina C e culifolina. Considerando que a interação RBD:ACE2 é a etapa chave do processo de entrada do vírus na célula hospedeira, a inibição dessa interação potencialmente inibiria a infecção pelo vírus (CAMPOS *et al.*, 2023), portanto, os dados aqui apresentados fornecem evidências de que a própolis verde (EEPV) e artepilina C podem atuar como fonte potencial de substâncias anti-SARS-CoV-2.

4.4. Conclusões

O método aqui descrito fornece uma nova abordagem para a purificação de biomarcadores de própolis por HSCCC de fase reversa e fase normal com alto rendimento. Os dados apresentados fornecem evidências de que a própolis é uma fonte potencial de substâncias anti-SARS-CoV-2. Estudos adicionais estão sendo conduzidos por nosso grupo para aprofundar a compreensão da ação observada e avaliar se é possível reproduzi-la em um modelo celular.

Outras investigações sobre o extrato de própolis verde EEPV e o uso de diferentes sistemas de solventes serão conduzidas para melhor purificação dos biomarcadores e isolamento de outras substâncias no extrato. Esses resultados contribuem significativamente para o conhecimento químico da própolis.

CAPÍTULO II

ISOLAMENTO SELETIVO DE ARTEPILINA C DA PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA POR CROMATOGRAPHIA EM CONTRACORRENTE.

5. CAPÍTULO II - ISOLAMENTO SELETIVO DE ARTEPILINA C DA PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA POR CROMATOGRAFIA CONTRACORRENTE

Resumo

O isolamento seletivo por cromatografia contracorrente de artepilina C, um derivado prenilado do ácido *p*-cumárico, direto do extrato etanólico de propolis verde brasileira (EEPV) em uma única etapa foi desenvolvido utilizando-se um sistema bifásico contendo solvente orgânico (hexano e acetato de etila) e solução de carbonato de sódio a 5%, baseado na capacidade de ionização de grupos carboxila em meio básico, propiciando a extração seletiva de compostos como a artepilina C para a fase aquosa, na forma de sal. O sistema de solventes hexano- Na_2CO_3 5% aq foi inicialmente otimizado com diferentes proporções de acetato de etila, sendo a proporção hexano-acetato de etila 1:1 – 5% aq. Na_2CO_3 selecionada. O fracionamento do extrato etanólico de propolis verde com esse sistema de solventes forneceu artepilina C com 72% de pureza. Entretanto, o alto pH atingido com a solução de Na_2CO_3 ionizou também outros derivados de natureza ácida (ácidos triterpenicos e outros derivados fenolicos) e a base foi trocada por NaHCO_3 a 4%. A composição da fase orgânica foi novamente otimizada sendo a proporção hexano-acetato de etila (8:2) e 4% de NaHCO_3 aquoso (1:1, v/v) selecionada. O fracionamento do extrato etanólico de propolis verde com esse novo sistema de solventes otimizado forneceu artepilina C com pureza de aproximadamente 81%, garantindo uma excelente separação dos demais compostos presentes no extrato. A menor basicidade da solução de bicarbonato não foi capaz de ionizar outras substancias ácidas e a menor concentração de acetato de etila impediu o carregamento de sal na fase orgânica. O monitoramento de EEPV e da fração enriquecida de artepilina C foi feito *off-line* por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de tempo de voo (LCQTOF).

Palavras-chave: Própolis verde brasileira; artepilina C, drupanina, bacarina, extração ácido-base, cromatografia contracorrente cromatografia contracorrente

Abstract

The selective isolation by countercurrent chromatography of artepillin C, a prenylated derivative of *p*-coumaric acid, directly from the ethanol extract of Brazilian green propolis in a single step was developed using a two-phase system containing organic solvent (hexane and ethyl acetate) and 5% sodium carbonate solution, based on the ionisation capacity of carboxyl groups in a basic medium, which allows the selective extraction of compounds such as artepillin C to the aqueous phase, in the form of a salt. The solvent system hexane- Na_2CO_3 5% aq was first optimised with different proportions of ethyl acetate, with the hexane-ethyl acetate ratio 1:1 - 5% aq Na_2CO_3 being selected. Fractionation of the ethanol extract of green propolis with this solvent system yielded artepillin C with a purity of 72%. However, the high pH obtained with the Na_2CO_3 solution also ionised other acidic derivatives (triterpenic acids and other phenolic derivatives) and the base was replaced by 4% NaHCO_3 . The composition of the organic phase was re-optimised, with a ratio of hexane-ethyl acetate (8:2) and 4% aqueous NaHCO_3 (1:1, v/v). Fractionation of the ethanol extract of green propolis with this new optimised solvent system provided artepillin C with a purity of about 81%, ensuring an excellent separation from the other compounds present in the extract. The lower basicity of the bicarbonate solution was not able to ionise other acidic substances and the lower concentration of ethyl acetate prevented the loading of salt into the organic phase. EEGP and artepillin C enriched fraction monitoring was performed off-line by liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry (LCQTOF).

Keywords: Brazilian green propolis; artepillin C, drupanin, baccharin, acid-base extraction, countercurrent chromatography

5.1. Introdução

Desde os tempos antigos, a própolis tem sido amplamente utilizado na medicina tradicional para melhorar a saúde e prevenir doenças, incluindo distúrbios gastrointestinais, sendo que Hipócrates historicamente a usava para tratar úlceras (COSTA *et al.*, 2018). As abelhas colhem a própolis, uma mistura complexa de substância semelhante a uma goma com propriedades pegajosas e resinosas, dos brotos e cascas de uma variedade de plantas para fechar os poros dos favos de mel e protege-los de patógenos, mantendo intrusos afastados (CHUANG *et al.*, 2022).

A composição da própolis é influenciada por uma série de fatores, incluindo fontes vegetais, localização geográfica e o período de produção, conforme destacado por Hirata e colaboradores (2021). A própolis verde brasileira (PVB), obtida de *Baccharis dracunculifolia*, apresenta cor verde e uma rica variedade de componentes químicos (YAMAGA *et al.*, 2024, COSTA *et al.*, 2018; GALEOTTI *et al.*, 2021) Este produto apícola é majoritariamente constituído por resinas (50%), ceras (30%), óleos voláteis (10%), pólen (5%) e outras substâncias (5%), incluindo microelementos e vitaminas (CUI *et al.*, 2022, YAMAGA *et al.*, 2021; HIRATA *et al.*, 2021;). A cera de abelha contém uma complexa mistura de compostos, como palmitato e ésteres de oleato de álcoois alifáticos (SOLEIMANIAN *et al.*, 2018; AHANGARI *et al.*, 2018). Os principais constituintes dessa matrix incluem derivados prenilados do ácido *para*-cumárico, como artepilina C, drupanina e bacarina (CONTIERI *et al.*, 2022; DOS SANTOS *et al.*, 2022; FIORINI *et al.*, 2021; CUI *et al.*, 2022; BESERRA *et al.*, 2020, CHAVES *et al.*, 2023), além de triterpenos do tipo cicloartano (C₃₀ e C₃₁) e derivados fenólicos como ácidos anacárdicos (DA SILVA *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2008), destacando-se também flavonoides como aromadendrina-4-éter metílico, betuletol e canferide (SOUSA *et al.*, 2011; KHOSHANDAM *et al.*, 2023; AMANO *et al.*, 2025).

O Brasil é o terceiro maior produtor de própolis do mundo (BERRETTA *et al.*, 2017) e 75% da PVB chega aos mercados internacionais, com uma parcela significativa sendo exportada para o Japão. No Japão, a PVB é reconhecida não apenas por seu uso direto, mas também como um importante objeto de pesquisa voltado para a análise de seus constituintes químicos e propriedades biológicas (SHAHINOZZAMAN *et al.*, 2020; CHUANG *et al.*, 2022, MARUYAMA *et al.*, 2009; SHAHA *et al.*, 2022, UEDA *et al.*, 2017; ITO *et al.*, 2023; TANI *et al.*, 2019). Esse interesse internacional na PVB destaca sua importância como um tópico de pesquisa científica e interesse comercial, destacando suas potenciais aplicações e benefícios.

Fenilpropanoides prenilados são constituintes muito comuns e abundantes na própolis verde do Brasil, mas a artepilina C atraiu grande atenção, não apenas por sua ação antimicrobiana, mas também por sua toxicidade para células tumorais (GALEOTTI *et al.*, 2021; ENDO *et al.*, 2018; MEIRELLES *et al.*, 2024, PELEGRINI *et al.*, 2024; OTA *et al.*, 2023). Consequentemente, a síntese de artepilina C foi relatada, mas, devido ao rendimento limitado e aos custos elevados, essa biomolécula tem sido ainda isolada a partir da própolis brasileira (GALEOTTI *et al.*, 2021).

Embora a artepilina C seja relatada como um dos principais componentes fenólicos da própolis brasileira, sua concentração fica em torno de 5,0% a 11,0% sendo que sua taxa de extração não excede 5% (ZHAO *et al.*, 2021; MIKAMI *et al.*, 2021). Portanto, é importante desenvolver métodos eficazes para a extração direcionada dessa substância bioativa. Apesar das pesquisas em curso estarem voltadas para validar suas propriedades biológicas, a comercialização do composto como medicamento ainda é um desafio significativo (BERRETTA *et al.*, 2017). A complexidade da purificação da artepilina C a partir da própolis bruta, devido ao elevado teor de cera e à diversidade de outras substâncias fenólicas, representa um entrave relevante. Mesmo com o uso de técnicas sofisticadas como RP-HPLC, a obtenção de compostos puros a partir de fontes naturais continua a ser uma tarefa difícil (CHUANG *et al.*, 2022; LIANG *et al.*, 2015).

Várias técnicas foram desenvolvidas para o isolamento e purificação de artepilina C da própolis verde brasileira desde o trabalho pioneiro de Aga e pesquisadores (1994), que relataram o isolamento e a identificação deste composto a partir do extrato usando coluna de Sephadex LH-20. A utilização de cromatografia de permeação em gel usando Sephadex LH-20 e extração com fluido supercrítico combinada com solventes orgânicos, foi descrito por Chuang e coautores (2022). A

inclusão de β -ciclodextrina foi usada por Nafady e colaboradores (2003), onde a própolis brasileira foi submetida a um processo de dissolução em água destilada contendo β -ciclodextrina, formando a inclusão de β -ciclodextrina-própolis, à qual foi adicionado etanol. Essa técnica seletiva desenvolvida nesse estudo permitiu isolar compostos fenólicos da própolis, como artepilina C e capilartermisina A, além de outros métodos que requerem múltiplas etapas de isolamento e purificação, como cromatografia clássica combinada com RP-HPLC preparativa, conforme estudos de Costa *et al.* (2018), Costa *et al.* (2019) e Pires & Castro (2023). No entanto, há algumas desvantagens distintas para essas separações usando a purificação por meio de HPLC preparativo, como alto custo, baixo rendimento, baixa taxa de recuperação e operação complexa, tornando-as inadequadas para aplicações em larga escala. Portanto, é fundamental desenvolver um novo procedimento de separação de produção em massa, eficiente e de baixo custo para promover as amplas aplicações da artepilina C.

A cromatografia contracorrente (CCC) destaca-se como uma técnica avançada para a separação e purificação direcionada de produtos naturais complexos como a própolis (SANTOS *et al.*, 2024). Sua capacidade de evitar problemas comuns como a adsorção irreversível de soluto, aliada à redução do consumo de solventes e custos operacionais a torna uma opção valiosa (LIANG *et al.*, 2015). A CCC é reconhecida por sua rapidez na separação, eficiência na preparação e recuperação total do material, permitindo a injeção direta de extratos brutos, sem a necessidade de pré-tratamento, sendo especialmente útil para o manuseio de materiais resinosos como PVB (KHAN *et al.*, 2018).

Em trabalho recente, nosso grupo de pesquisa (SANTOS *et al.*, 2024) destacou a obtenção da artepilina C a partir do extrato hexânico de própolis verde, alcançando 94% de pureza em HPLC-PDA por meio da técnica de HSCCC com um sistema de solvente bifásico composto por hexano-etanol-água na proporção de 4:3:1 (v/v). Essa substância, derivada do ácido *p*-cumárico, apresenta um desafio significativo para sua separação, devido à presença de outros derivados fenólicos e triterpenos ácidos, como os ácidos ambônico e mangiferônico.

Em continuidade à nossa pesquisa, este trabalho apresenta um avanço em relação ao anterior no sentido de extrair a artepilina C direto do extrato etanólico bruto por cromatografia contracorrente em uma única etapa. Para a separação e purificação desta substância da matriz da própolis, deve-se levar em conta, sua característica estrutural e a das demais substâncias presentes, como os ácidos orgânicos fenólicos, especialmente no extrato etanólico. Sendo assim, para otimizar o processo, a separação da artepilina C foi potencializada por métodos de extração ácido-base, sendo aproveitada as diferenças de solubilidade entre as formas ácida e básica das substâncias (NICHOLS, 2017; PIRES & CASTRO, 2023).

Com base na capacidade dos derivados de ácido fenólico da própolis de formar sais em soluções básicas e considerando os resultados bem-sucedidos alcançados anteriormente por nossa equipe na extração seletiva da 7- α -hidroxiroileanona, uma quinona diterpenica, direto do extrato em diclorometano de folhas *Tetradenia riparia* (MILATO *et al.*, 2018) por HSCCC com o sistema de solventes hexano-5% de Na₂CO₃ aquoso (1:1), esse sistema de solvente foi otimizado para a extração seletiva de artepillina C.

Assim, este estudo propõe uma extração seletiva, utilizando soluções básicas para isolar a artepilina C de EEPV. A técnica de cromatografia contracorrente (CCC) foi empregada para maximizar os rendimentos e a pureza do composto prenilato. Adicionalmente, foi realizada a identificação e análise do *fingerprint* de uma fração purificada e do extrato EEPV, através da injeção *off-line* de frações em espectrometria de massa de ionização por eletrospray (ESI-MS/QTOF).

5.2. Materiais e métodos

5.2.1. Solventes e Reagentes

Os solventes utilizados para a preparação dos extratos brutos foram de grau analítico e para separação HSCCC (cromatografia em contracorrente de alta velocidade) de graus HPLC ou ACS analíticos, adquiridos da Tedia Brasil (Rio de Janeiro, Brasil). Todas as soluções aquosas foram preparadas com água pura produzida pelo sistema de água Milli-Q (Direct-Q® 3UV, EUA). O ácido acético e o ácido clorídrico utilizados para neutralização foram da Nuclear e Vetec, respectivamente. As bases sólidas, bicarbonato de sódio sólido e carbonato de sódio foram adquiridos da Vetec Química Fina (Brasil), e utilizadas para fazer a solução básica no fracionamento da própolis verde.

5.2.2. Preparação dos extratos brutos

Conforme descrito no item 4.2.2 da página 37.

5.2.3. Aparelho de cromatografia em contracorrente de alta velocidade

O fracionamento de EEPV utilizando o carbonato de sódio como base foi conduzido no aparelho P.C. Inc., Potomac, MD, EUA, equipado com uma bobina tripla. A coluna de 70 mL (1,6 mm I.D.) foi usada com velocidade de rotação definida em 880 rpm. Os fracionamentos de EEPV usando bicarbonato de sódio como base foram realizados na coluna de 112 mL de um cromatógrafo de cromatografia contracorrente Quattro HT-Prep (AECS®, Bridgend, Reino Unido) equipado com duas bobinas contendo duas colunas multicamadas de politetrafluoroetileno (PTFE); (coluna 1: 26 mL, 1,0 mm I.D., coluna 2: 224 mL, 3,2 mm I.D., coluna 3: 112 mL, 2,0 mm I.D., coluna 4: 120 mL, 2,0 mm I.D.). A velocidade de rotação foi definida para 865 rpm. Ambos os sistemas HSCCC foram conectados a uma bomba de fluxo constante Waters Modelo M-45 (WATERS, MA, EUA) e a um coletor de frações Bio-Rad modelo 2110 (Bio-Rad, EUA). Uma alça de injeção de amostra PEEK de 5 mL conectada a uma válvula de injeção de 6 vias (Black, Bulkhead, Polyimide/PTFE, 1/16" OD Tubing; 1/EA, modelo V-451, IDEX Health & Science LLC, EUA) foi usada para injetar a amostra. As separações foram realizadas em temperatura ambiente.

5.2.4. Seleção do sistema de solvente para fracionamento por HSCCC

A seleção do sistema de solvente apropriado para o fracionamento de EEPV foi feita pelo teste de partição em, tubo de ensaio, onde a amostra (2 mg de EEPV) foi dissolvida em diferentes sistemas de solvente (**Tabela 5**). A estimativa visual dos valores do coeficiente de partição (K) dos compostos-alvo foi obtida pela aplicação de volumes iguais de cada fase, superior e inferior, lado a lado separadamente em placas de cromatografia em camada fina (CCD) de gel de sílica (**Tabela 6**) (Merck Art. 64271, Darmstadt, Alemanha), desenvolvidas com o sistema de solvente hexano: acetona (70:30, v/v). Os resultados foram primeiramente visualizados sob luz UV ($\lambda = 254$ nm e 365 nm) e a placa foi então pulverizada com reagente vanilina sulfúrica seguido de aquecimento.

Tabela 5. Sistemas de solventes testados pelo teste de partição em tubo de ensaio para o fracionamento de EEPV por HSCCC.

Fase Orgânica (v/v)	Solução básica aquosa (v/v)	Razão volume (v/v)
hexano	5% Na ₂ CO ₃	(1:1)
hexano- acetato de etila (1:1)	5% Na ₂ CO ₃	(1:1)
hexano- acetato de etila (8:2)	4% NaHCO ₃	(1:1)
hexano- acetato de etila (7:3)	4% NaHCO ₃	(1:1)
hexano- acetato de etila (1:1)	4% NaHCO ₃	(1:1)

O cálculo de K para a substância-alvo artepilina C, **1** no modo de eluição reversa foi realizado em todos os sistemas (**Tabela 6**). Os valores de K da substância-alvo foram calculados dissolvendo-se o resíduo obtido pela evaporação das fases dos sistemas de solventes testados em 1 mL de metanol e analisando-se por HPLC-PDA. O valor de K foi expresso como a área do pico da substância na fase orgânica estacionária dividida pela área do pico da substância na fase aquosa móvel cuja faixa de intervalo desejado para uma boa resolução é $0,5 < K < 2,5$ (BERTHOD *et al.*, 2016). Todos os valores de K resultantes para a substância **1** (artepilina C), resumidos na **Tabela 6**, foram obtidos escolhendo a área do pico correspondente para a substância prenilada.

Tabela 6. Coeficiente de partição (K) da artepilina C, **1**, no extrato etanólico de própolis verde (EEPV) calculado para o modo reverso de eluição.

Extrato	Sistema de Solvente	K_1^*
EEPV	hexano- acetato de etila (1:1)- 5% sol.aquosa Na ₂ CO ₃ (1:1)	0.99
EEPV	hexano- acetato de etila (8:2)- 4% sol.aquosa NaHCO ₃ (1:1)	1,25

^{1*} artepilina C (tempo de retenção: 25min)

5.2.5. Procedimento de separação por HSCCC

Os dois sistemas de solventes (**Tabela 6**) foram usados em todos os fracionamentos de extrato etanólico de própolis verde. O sistema bifásico foi preparado misturando-se proporções apropriadas dos solventes em um funil de separação e após o equilíbrio as fases foram separadas e desgaseificadas por sonicação por 10 min antes do fracionamento por CCC ser executado. A coluna foi primeiro preenchida inteiramente com a fase estacionária superior orgânica sem rotação e então a fase aquosa móvel foi bombeada com uma rotação de 880 (PC Inc) e 860 rpm (Quattro HT-Prep) até que o equilíbrio das duas fases fosse atingido. EEPV, dissolvido em 5 mL do sistema de solvente selecionado (1:1, v/v, **Tabela 6**) foi então introduzido na coluna através de uma válvula de injeção de amostra manual de 6 vias, usando uma alça de injeção de amostra de 5 mL.

Todos os fracionamentos foram realizados no modo de eluição reversa (sentido cabeça-cauda, com a fase aquosa inferior como fase móvel). Os fracionamentos com bicarbonato de sódio foram realizados no Quattro HT-Prep e os fracionamentos com carbonato de sódio foram realizados no aparelho Pc Inc com vazão de fase móvel de 2,0 mL.min⁻¹. Todas as frações coletadas (4 mL), após neutralizadas com HCl e extraídas acetato de etila, foram analisadas por cromatografia em camada fina (CCD) seguida de visualização sob luz UV (254 e 365 nm) e então pulverizadas com reagente

de vanilina- sulfúrica (**Figura 36**). As frações foram organizadas por similaridade em CCD e analisadas por HPLC-PDA para identificar a artepilina C nos tubos coletados do fracionamento de CCC.

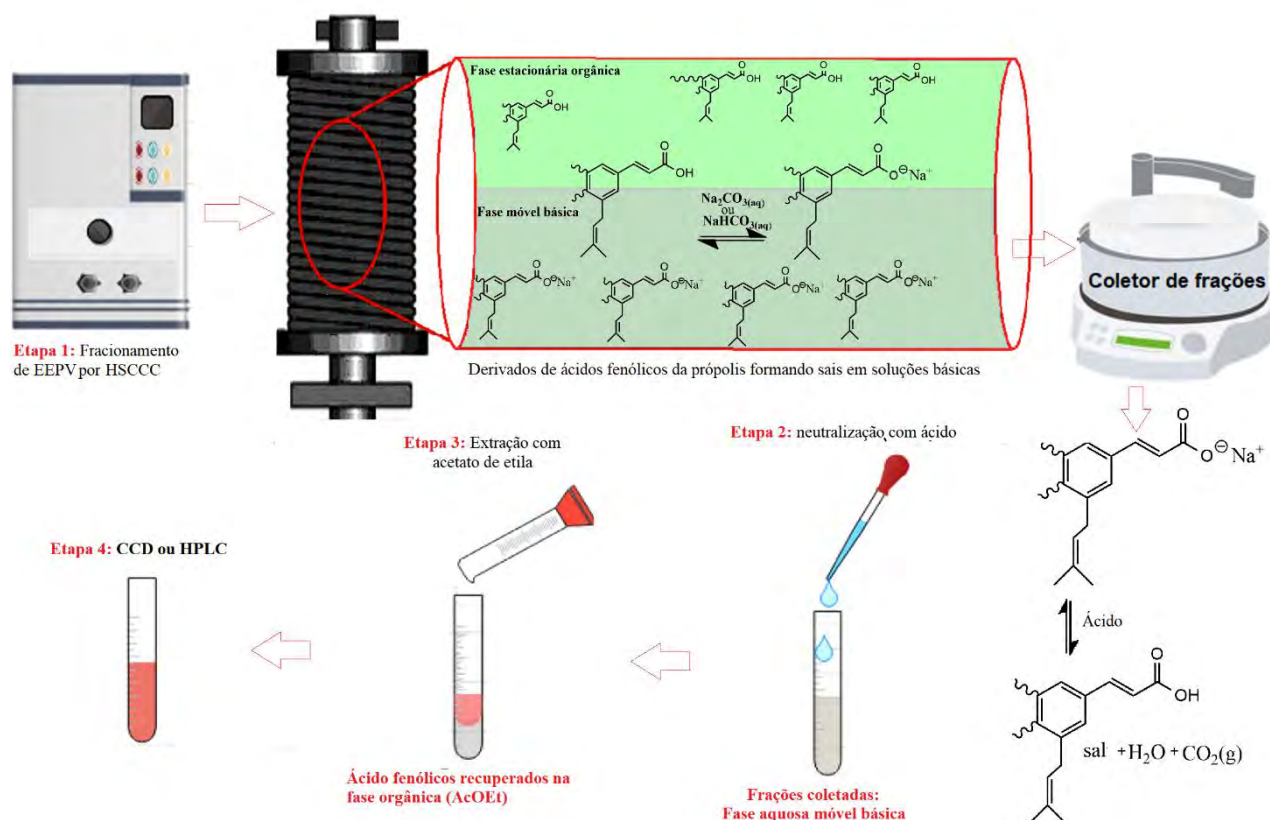


Figura 36-lustração da metodologia aplicada na extração seletiva em 4 etapas. Etapa 1: o extrato etanólico foi fracionado por HSCCC com o sistema de solvente selecionado (CCC1 a CCC3). Os derivados de ácidos fenólicos presentes em EEPV estão na forma neutra quando entram em contato com a fase estacionária orgânica mas são ionizados à medida que entram em conta com a fase móvel aquosa básica. **Etapa 2:** As frações recolhidas com a fase móvel aquosa básica são neutralizadas com o ácido. **Etapa 3:** as frações neutralizadas são extraídas com acetato de etila e os ácidos fenólicos são recuperados na fase orgânica. **Etapa 4:** as frações são analisadas por CCD e/ou HPLC.

Os parâmetros analíticos estão descritos na **Tabela 7**. Todos os fracionamentos foram realizados no modo operacional de eluição-extrusão. Todas as frações foram evaporadas até a secura (SpeedVac SPD 121P, Refrigerator Vapor Trap RVT400, Thermo Savant, EUA) e transferidas para frascos pesados. Um grande deslocamento da fase estacionária foi observado em todos os fracionamentos até o 11º tubo coletado.

Tabela 7. Parâmetros analíticos para fracionamentos de EEPV por HSCCC

Injeção	Extrato	Sistema de Solvente	Quantidade (mg)	Equipamento /coluna/extrusão	Sf (%) ^b
CCC1	EEPV	H-A ^a (1:1) -5%Na ₂ CO _{3(aq)} (1:1)	315	PC Inc/70mL/50	78.66
CCC2	EEPV	H-A ^a (8:2) - 4%NaHCO _{3(aq)} (1:1)	216	HTprep/112mL/56	89.29
CCC3	EEPV	H-A ^a (8:2) - 4%NaHCO _{3(aq)} (1:1)	464	HTprep/112mL/51	85.72

^ahexano- acetato de etila ^b Retenção da fase estacionária dentro da coluna

5.2.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

O perfil cromatográfico de EEPV, bem como o das frações obtidas nos fracionamentos CCC1 a CCC3, foi obtido conforme descrito no item 4.2.7 da página 41.

5.2.7. Análise por LC-ESI-MS/MS

As análises foram realizadas em um equipamento LC-PDA_QTOF/MS (LC Agilent 1290 Infinity II) configurado com espectrômetro de massa quadrupolo de tempo de voo (QTOF) da Agilent 6530 (Agilent, Santa Clara, CA, EUA) equipado com coluna C18 (50mm x 2,1 mm x 1.8µm, Zorbax extend, Agilent). As amostras (10 µL) foram analisadas a 40°C com um fluxo de 0,35 mL.min⁻¹. A fase móvel foi solução aquosa com 0,1% de ácido fórmico e 5mM formiato de amônio (A) e metanol com 0,1% de ácido fórmico e 5mM formiato de amônio (B). O programa de gradiente iniciado até 1 min com 35% B, depois de 35-80%B (1-20 min), 80-85% B (20-25 min), 85-90% B (25-30 min), 90%-95 B (30-35 min), 95%-100% B (35-38 min) 100% B por 7 min e, seguido por um reequilíbrio da coluna de 5 minutos. O comprimento de onda no PDA foi 254 e 360nm. Os experimentos de MS realizados com fonte de ionização por *spray* eletrônico (em inglês, ESI) no modo positivo e negativo foram utilizados com as seguintes condições de operação: vazão de gás (N₂) em 10 L.min⁻¹; temperatura do gás em 300°C; nebulizador 38 psi; tensão capilar 3500V; voltagem do fragmentador em 120V e voltagem da agulha em 1000V. O modo de varredura completa do MS foi monitorado na faixa de massa de 100 a 1000 m/z. Posteriormente, um experimento MS/MS foi realizado e os parâmetros definidos da seguinte forma: taxa de aquisição do espectro MS de 4 espectros/s, 10 íons precursores por ciclo, tolerância de erro em 20 ppm e energia de colisão de 10, 20, 40 e 60 V.

As análises de ionização química à pressão atmosférica (em inglês, APCI) no modo positivo e negativo utilizaram as mesmas condições supracitadas diferenciando apenas nas seguintes condições de operação: vazão de gás (N₂) em 8 L.min⁻¹; temperatura do gás em 300°C; nebulizador 35 psi; tensão capilar 3500V e voltagem da agulha em 4V. Todas as operações, aquisição e análise de dados foram realizadas no *software Mass-hunter acquisition* versão 11.0.

5.2.8. Análise quimiométrica usando o mass profiler professional (MPP)

Os dados obtidos foram tratados no *software Mass-hunter qualitative* com ESI no modo negativo e depois exportados no formato .cef para serem usados no software Agilent Mass Profiler Professional versão 15.5 (MPP). Um diagrama de Venn foi criado no MPP para avaliar substâncias exclusivos para EEPV e CCC3 FR 40-55, bem como aqueles compartilhados entre os dois. Os Cromatogramas de Íons Extraídos (EICs) foram alinhados no MPP. O alinhamento foi baseado no padrão espectral e no tempo de retenção. Os espectros extraídos precisavam de uma correspondência de 0,3 minutos e com erro menor que 10ppm para serem considerados o mesmo componente sem filtragem. O gráfico de massa (Da) versus tempo de retenção (minutos) produziram 2957 entidades (íons encontrados) foram identificadas em EEPV e 827 entidades CCC3 FR 40-55.

5.3. Resultados e Discussão

A própolis verde, produzida por abelhas a partir de plantas do gênero *Baccharis*, é uma mistura complexa de substâncias do metabolismo secundário, rica em derivados do ácido cinâmico, como artepilina C, **1**, bacarina, **2**, drupanina, **3**, ácido *p*- cumárico, **4**, e, culifolina, **5**, que é um produto de degradação da artepilina C (**Figura 37**) (YAMAGA *et al.*, 2021), dentre outros compostos como ácidos triterpenicos (ácido ambonico e mangiferonico) e os flavonoides aromadendrina-4-éter metílico, betuletol e canferide. Análise inicial do extrato etanólico de propolis verde (EEPV) por

HPLC-PDA (**Figura 38**) confirmou essa complexidade mostrando os compostos majoritários artepilina C, **1**, bacarina, **2**, drupamina, **3** e ácido *p*-cumárico, **5**. Nota-se ainda a presença do culifolina, **5**, considerado um produto de degradação da artepilina C, produzido pela ciclização do grupo prenila com a hidroxila fenólica. A degradação da artepilina C relatado por Arruda e pesquisadores (2020) e Shahinozzaman e colaboradores (2020) ocorre devido exposição à luz e temperaturas elevadas, e por ciclização se transforma em culifolina.

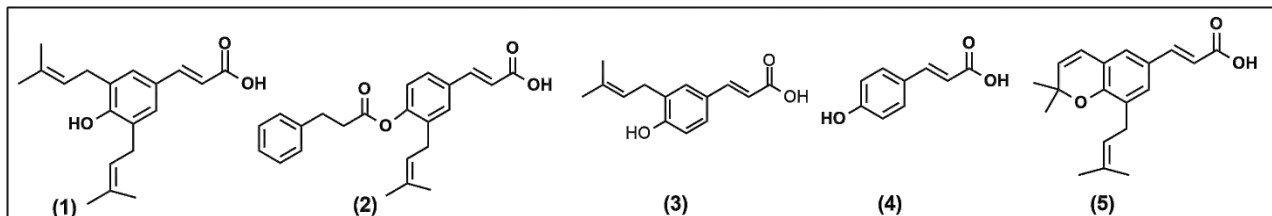


Figura 37-Estrutura das principais substâncias presentes no extrato etanólico de própolis verde (EEPV)

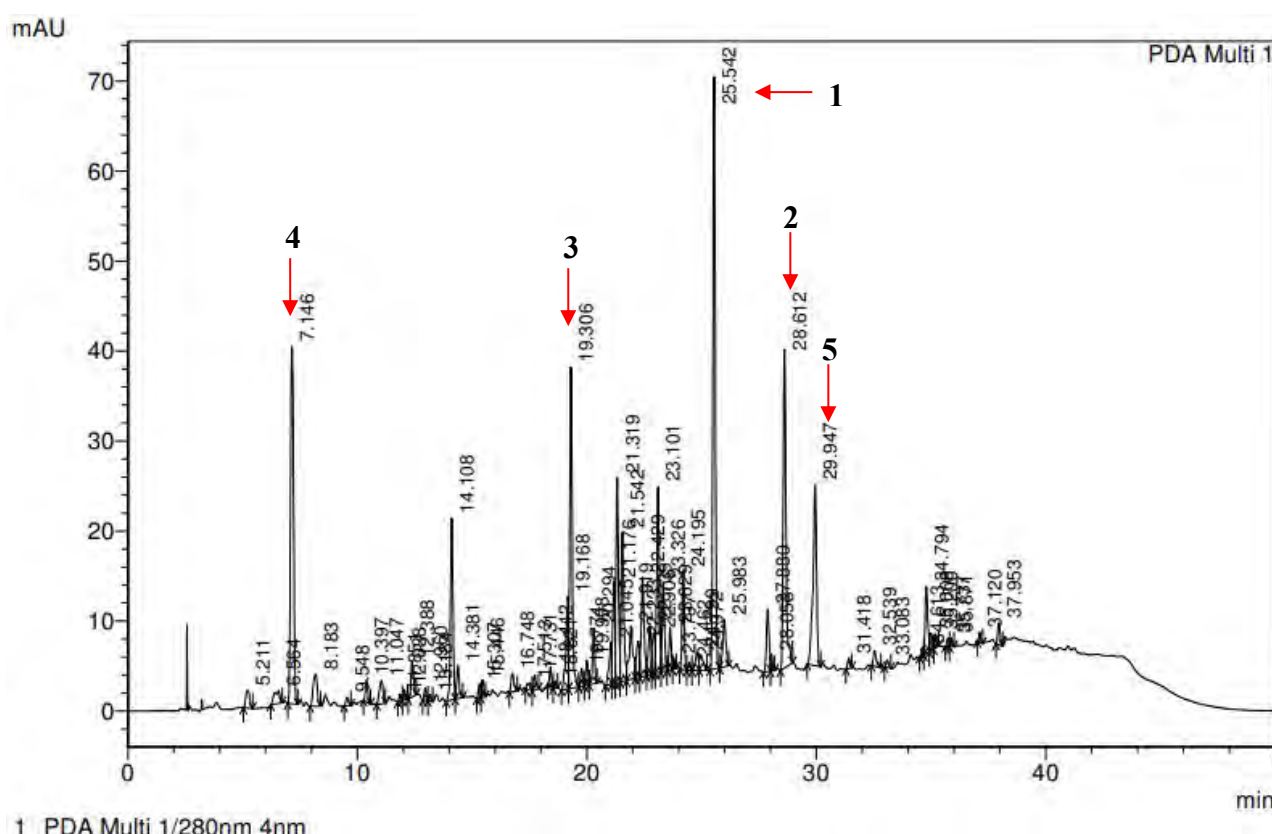


Figura 38-Perfil cromatográfico por HPLC-PDA(280 nm) de EEPV.

5.3.1. Extração seletiva da artepilina C por HSCCC com um sistema de solventes composto por solvente organico-solução aquosa de Na_2CO_3 a 5%

Métodos de extração líquido-líquido têm sido usados para a purificação de produtos naturais-alvo, seja por HSCCC ou outras técnicas, como extração contracorrente em vários estágios (MSCE) (ZHANG *et al.*, 2015). Os ácidos hidroxycinâmicos, reconhecidos por sua facilidade de ionização, possuem a capacidade de formar sais quando expostos a soluções básicas sendo eles derivados de fenilpropanoides (DIXON *et al.*, 2002, BALASUNDRAM *et al.*, 2006). Valendo-se desta capacidade

de ácidos fenólicos da própolis de formar sais em soluções básicas, o sistema de solvente hexano: acetato de etila (1:1)–5% Na₂CO₃ aquoso (1:1) foi desenvolvido visando a extração seletiva de artepilina C direto do extrato etanólico de própolis verde. A polaridade da fase orgânica foi otimizada em relação ao sistema original hexano - 5% Na₂CO₃ aquoso (1:1), desenvolvido inicialmente por nosso grupo de pesquisa para o isolamento seletivo de uma quinona diterpenica do extrato em diclorometano de folhas de *T. ripária* (MILATO *et al.*, 2018). O ajuste de polaridade foi necessário devido à natureza polar da matriz, o extrato bruto etanólico de própolis, proporcionando sua melhor solubilização no sistema, um requisito necessário ao preparo de amostras para fracionamentos por CCC (ZHOU *et al.*, 2023). Ao realizar o teste usando o SS hexano - 5% Na₂CO₃ aquoso (1:1), não houve solubilização do extrato sendo testado hexano: acetato de etila (1:1)–5% Na₂CO₃ aquoso que permitiu a solubilização

O valor de *K* calculado para a artepilina C, **1**, nesse sistema de foi 0,99, indicando uma separação rápida desse composto-alvo com um volume de coluna (*V_C* = 70ml). O EEPV foi então inicialmente fracionado no modo reverso de eluição (fase aquosa básica como fase móvel) na coluna de 70 ml do equipamento PC Inc (CCC1). Um total de 50 frações com rotação e 50 frações sem rotação foram coletadas e avaliadas por CCD (**Figura 39**), bem como por HPLC-PDA após neutralização, tubo a tubo, da fase móvel aquosa com HCl e recuperação por extração com acetato de etila (**Figura 36**). Esse procedimento forneceu a artepilina C, **1** nas frações 20-26 (**Figura 40**) com 72% de pureza (HPLC-PDA). As impurezas minoritárias foram identificadas como uma mistura de derivados de cicloartenol (ácidos ambônico e mangiferônico) previamente isolados da própolis verde por nosso grupo (SANTOS *et al.*, 2024), e outros compostos fenólicos. Essas substâncias são amplamente relatadas na literatura sobre própolis (GALEOTTI *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2005; KARDAR *et al.*, 2014; PUJIRAHAYU *et al.*, 2019; THANH *et al.*, 2021).

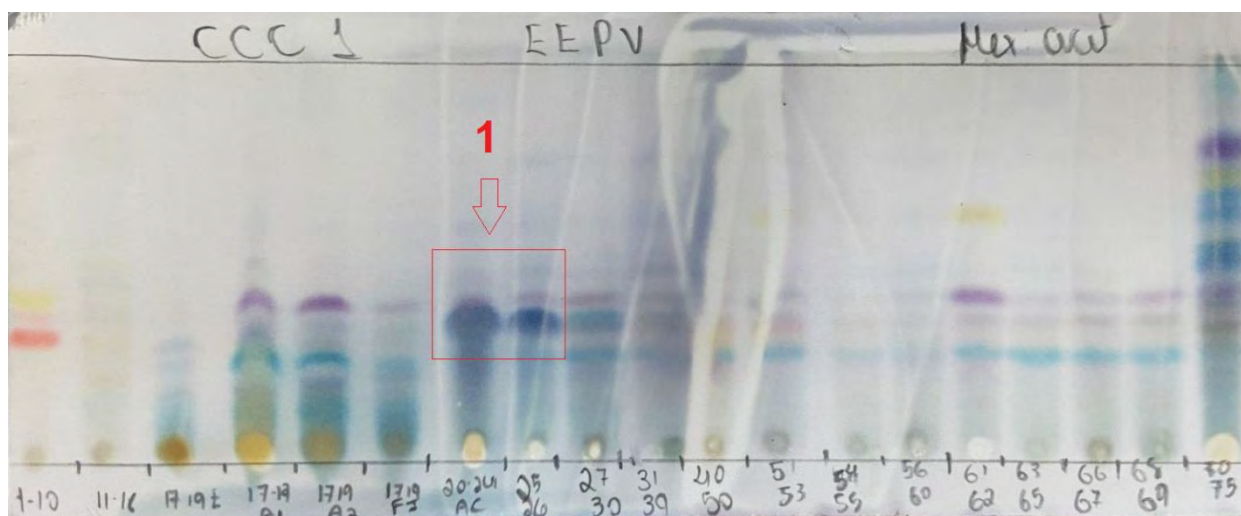


Figura 39-Perfil cromatográfico (CCD de CCC1 pulverizado com reagente vanilina- sulfúrica) das frações reunidas obtidas no fracionamento de EEPV por HSCCC com o sistema de solventes hexano-acetato de etila (1:1) – sol. aquosa de Na₂CO₃ 5% (CCC1). A seta vermelha indica as frações contendo a substancia-alvo **1**, artepilina C.

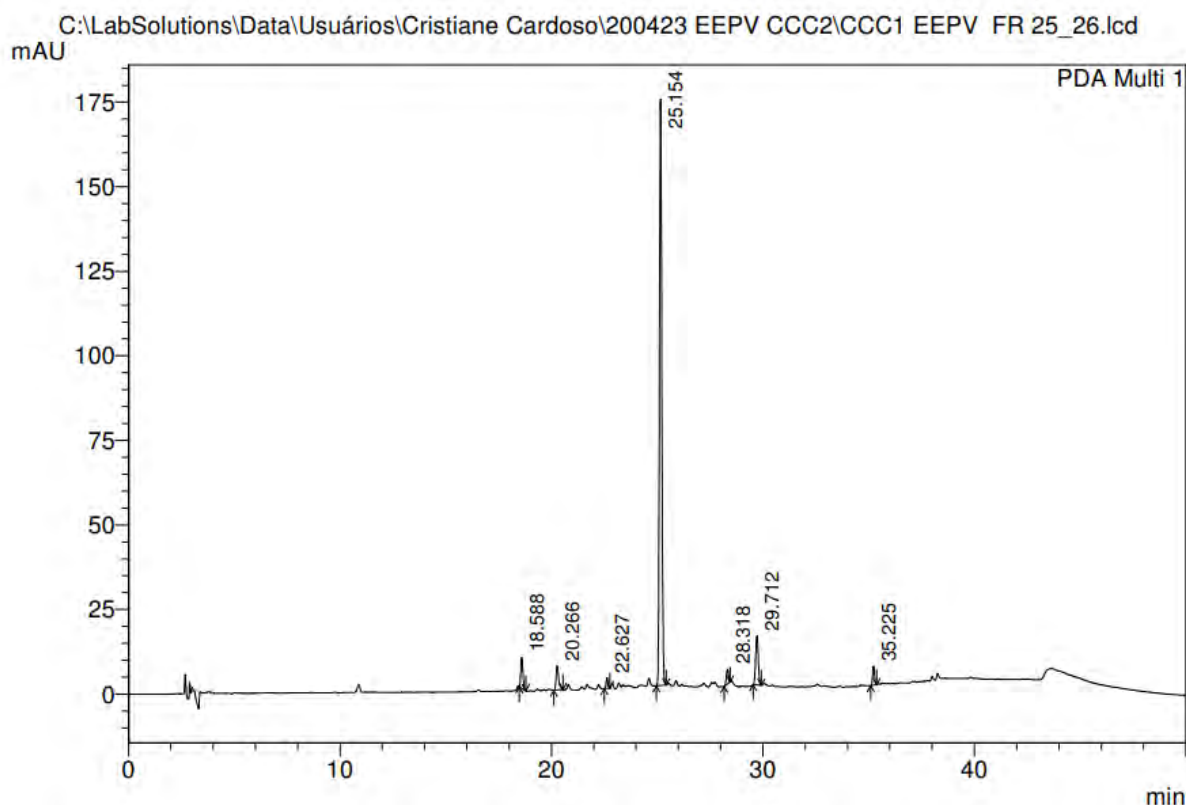


Figura 40-Perfil cromatográfico por HPLC-PDA (280 nm) das frações 20-26 do fracionamento CCC1 mostrando um pico com tempos de retenção de 25,154 min correspondentes à artepilina C, **1**.

Adicionalmente, observou-se, além de intenso sangramento de fase estacionária nas primeiras frações, acompanhadas de precipitado, uma quantidade significativa de sal inorgânico em quase todas as frações analisadas que provavelmente foi parcialmente arrastado pelo acetato de etila utilizado no sistema de solventes. Análise do precipitado revelou grande quantidade de artepilina C impura, acompanhada de sal inorgânico. Para a completa remoção do sal nas frações foi necessário realizar ressuspendar a fração em água e realizar uma nova partição, inviabilizando o cálculo da taxa de recuperação da artepilina C do extrato etanólico.

5.3.2. Extração seletiva da artepilina C por HSCCC com um sistema de solventes composto por solvente orgânico-solução de NaHCO_3 a 4%

O alto poder ionizante do carbonato de sódio no sistema hexano-acetato de etila (1:1) - 5% Na_2CO_3 aquoso 1:1 v/v provavelmente permitiu a ionização dos ácidos fenólicos e também dos triterpenos ácidos presentes em EEPV. Como forma de contornar tal problema, decidiu-se realizar a extração com solvente ativo, utilizando agora uma base mais fraca, como o bicarbonato de sódio, para que apenas os derivados de ácidos hidroxicinâmicos fossem ionizados, evitando assim, a ionização de outras substâncias menos ácidas, como ácidos triterpenos pentacíclicos.

No estudo conduzido por Juodeikait e coautores (2022), uma solução aquosa de bicarbonato de sódio a 5% foi utilizada para extrair compostos de própolis por meio de extração assistida por micro-ondas. Os resultados evidenciaram um aumento significativo na concentração total de ácidos hidroxicinâmicos após quatro ciclos de extração, indicando que o bicarbonato de sódio foi essencial para otimizar a eficiência da extração desses compostos da própolis. Dessa forma, um novo sistema composto por uma solução aquosa de bicarbonato de sódio a 4% como fase aquosa, e diferentes proporções de hexano – acetato de etila como fase orgânica foi estudada. Três proporções distintas de hexano e acetato de etila: (1:1), (8:2) e (7:3), foram testadas.

A purificação do extrato de EEPV, utilizando o bicarbonato como base, permitiu a obtenção do composto alvo, artepilina C, com mesma pureza cromatográfica do sistema de solvente utilizando

carbonato como base, conforme análise por HPLC-PDA. Além disso, a técnica resultou na presença de derivados prenilados menores nas frações 30-40, após a neutralização da fase móvel aquosa com HCl e subsequente recuperação por extração com acetato de etila.

O uso de uma solução menos básica de NaHCO_3 não favoreceu a mistura de ácido triterpênico nas frações, menor concentração de sal inorgânico e uma separação eficaz de outros constituintes da propólis verde.

Os resultados da CCD (**Figura 41**) demonstraram que o uso de uma solução menos básica de NaHCO_3 não permitiu a ionização da mistura de ácidos triterpênicos nas frações, bem como no processo de neutralização gerou menor concentração de sal inorgânico e permitiu uma melhor separação dos outros constituintes da propólis verde. Além disso, resultou que essas substâncias eluísem nas frações finais da corrida, após a extrusão. Essa eluição de triterpenos pentacíclicos ocorreu na fase estacionária orgânica, contribuiu para o aumento da pureza cromatográfica da artepilina C, bem como de outros derivados incluindo drupanina, bacarina e culifolina.

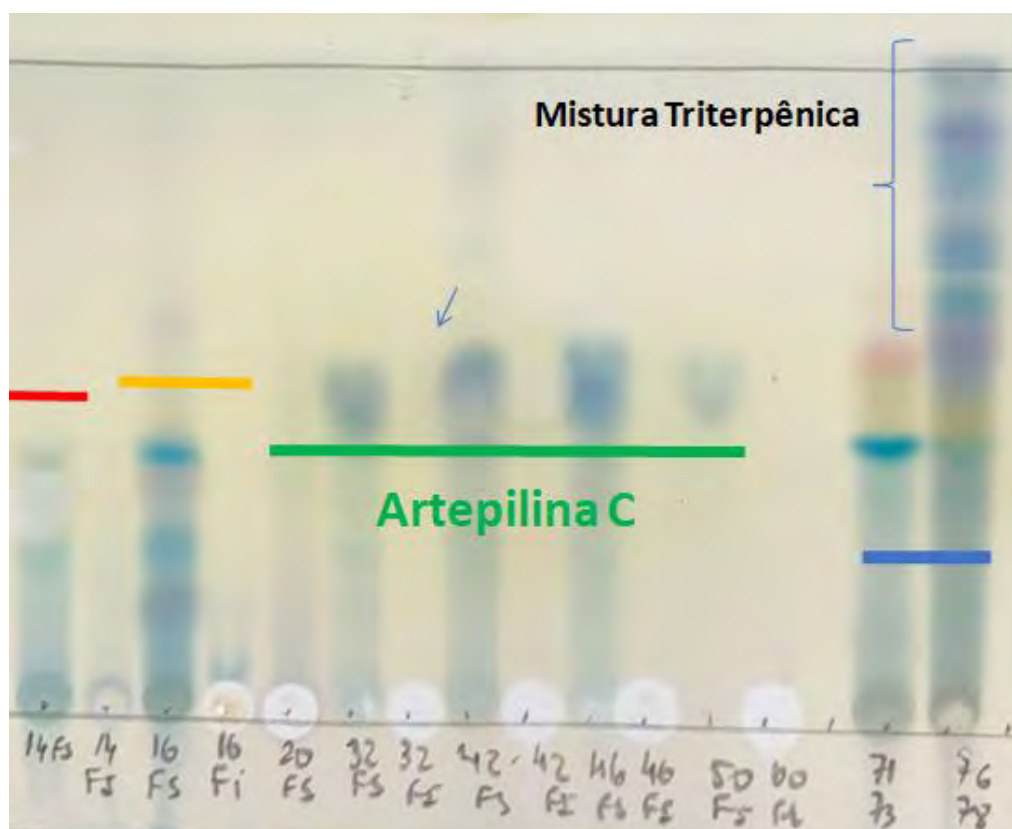


Figura 41-Composto: artepilina C, 1. Resultados da CCD de CCC2 pulverizado com reagente vanilina- sulfúrica. Linha vermelha: frações contendo ácido *p*-cumarico e outros prenilados, Linha amarela: frações contendo prenilados e flavonoide. Linha verde: artepilina C e linha azul: frações contendo flavonoides, culifolina e triterpenos pentacíclicos.

As análises de HPLC-PDA das frações iniciais obtidas em CCC2 permitiu a identificação do ácido *p*-cumárico (frações 13-17) e aromadendrina 4-metil éter(frações 18-20) e esta foi comparada com padrões disponíveis no laboratório. O perfil cromatográfico por HPLC-PDA das demais frações (**Figura 42**) demonstraram a eficiência do uso do bicarbonato de sódio (4%) no processo de extração seletiva por CCC para artepilina C, além de possibilitar a separação de outras substâncias fenólicas presentes no EEPV. As frações 24-28 mostraram uma mistura de bacarina e artepilina C. A artepilina C foi eluída nas frações 30 -40 com elevada pureza e nas frações posteriores (frações 41 a 60) foi misturada com o ácido *p*-cumárico: drupanina, bacarina e culifolina. O culifolina, produto de degradação da artepilina C, foi obtido nas frações 66 a 70. O aparecimento dessa substância pode

estar associado ao uso de um ácido forte (HCl) no processo de neutralização da fração básica recolhida da CCC.

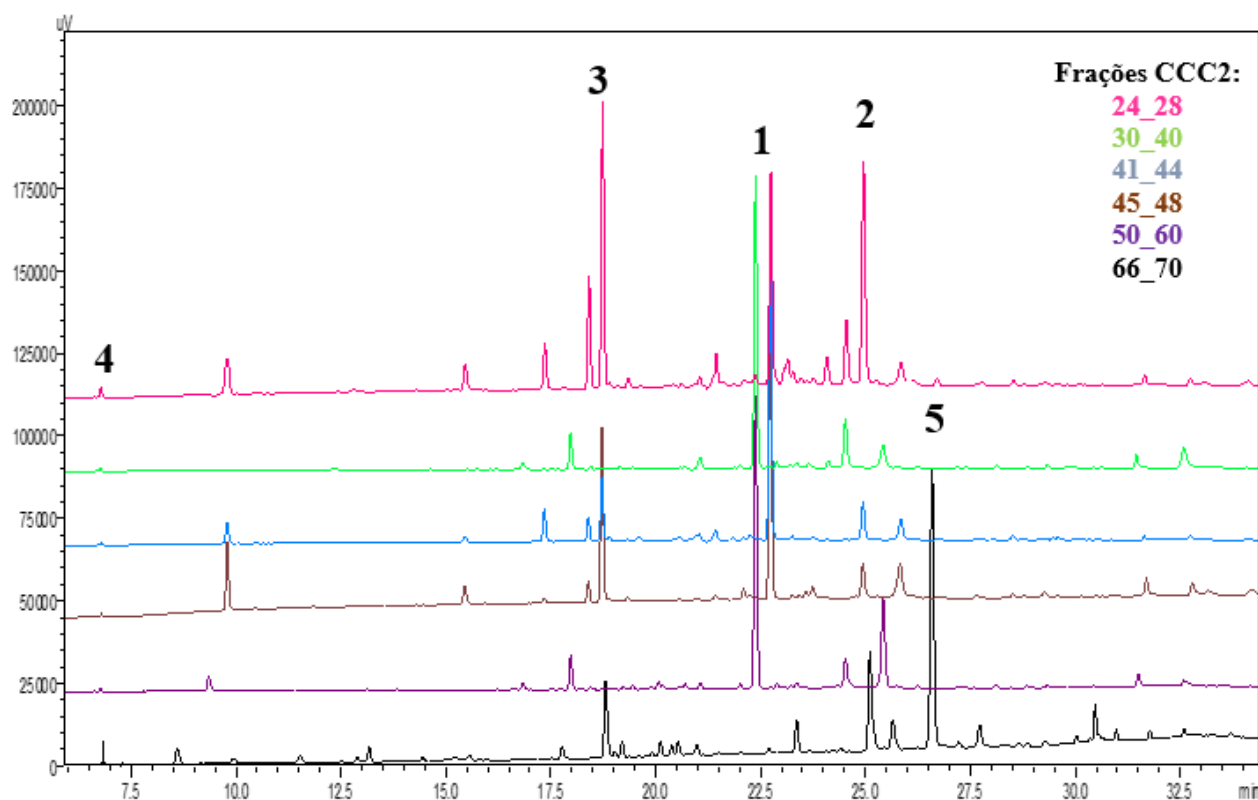


Figura 42- Perfil cromatográfico por HPLC-PDA(280 nm) das frações reunidas em CCC2. Estruturas das substâncias: artepilina C, **1**, bacarina, **2**, drupanina, **3**, e ácido p-cumárico, **4**, e culifolina, **5**.

Foi observada a presença de sal inorgânico no CCC2 em quantidades significativamente menores em comparação ao CCC1. Considerando a degradação da artepilina C e a presença, mesmo que reduzida, de sais inorgânicos, foram implementadas alterações estratégicas para o CCC3. Entre essas, destaca-se a substituição do ácido clorídrico pelo ácido acético para a neutralização do bicarbonato de sódio, visando uma neutralização mais branda para evitar alguma decomposição da artepilina C. Ademais, a neutralização passou a ser realizada também com o uso de um pHmetro, ao invés da tradicional fita de pH, garantindo maior controle na verificação do pH.

A corrida de CCC3 adotou os mesmos parâmetros analíticos de CCC2, com a única variação na quantidade de amostra, que foi dobrada (464 mg). Essas modificações resultaram em melhorias significativas nos resultados, não formando mais sais inorgânicos na amostra, além de fornecer a artepilina, nas frações 40-55, com pureza de 81% por HPLC-PDA (**Figura 43**). Nesta frações foram observados também a presença de pequenas quantidades de drupanina (7,2%) bacarina (6,6%) e culifolina (5,1%). O fracionamento continuou até o tubo 71, momento em que observou-se uma diminuição da pureza, atribuída ao aumento da eluição de drupanina, culifolina e bacarina.

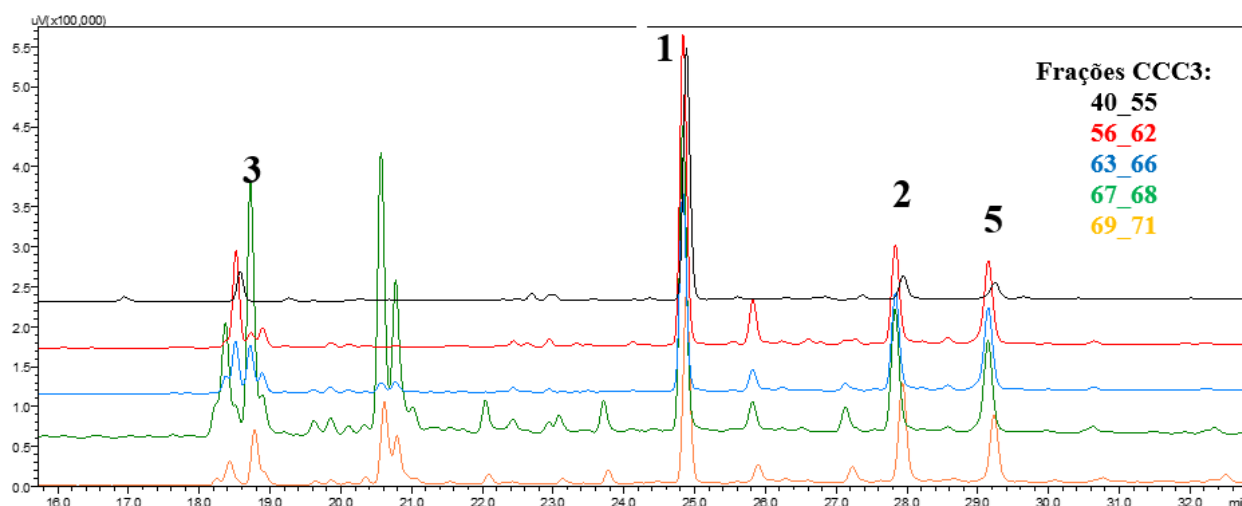


Figura 43- Perfil cromatográfico por HPLC-PDA(280 nm) das frações reunidas em CCC3. Estruturas das substâncias: artepilina C, **1**, bacarina, **2**, drupanina, **3**, e culifolina, **5**.

O culifolina, isolado a partir do tubo 44 e eluído até o tubo 71, apresentou uma pureza cromatográfica inferior (11%) quando comparado a CCC2 (60%). Em termos qualitativos, constatou-se que a substituição para o ácido acético foi eficaz para evitar a degradação da artepilina, especialmente em comparação ao uso de ácidos mais fortes, como o ácido clorídrico (caso CCC2).

Considerando que EEPV é uma matriz complexa e que geralmente separações CCC unidimensionais não são suficientes, os dados observados corroboram com o uso do equipamento CCC para o processo de separação seletiva de artepilina C. Neste trabalho foi possível mostrar uma metodologia alvo inédita para obtenção de artepilina C de EEPV usando a técnica CCC em apenas uma etapa sem a necessidade de uso de fase estacionária sólida.

No estudo quantitativo com a própolis verde realizado por Pires & Castro (2023), a própolis proveniente do mesmo apicultor utilizado nesta pesquisa, foi submetida a um fracionamento por métodos tradicionais. Nesse processo de quantificação, o teor da artepilina revelou um valor de $3,47 \pm 1,0739$ mg em 100 mg de extrato. Nessa pesquisa foi possível isolar uma fração enriquecida com artepilina C (massa de 37,70 mg, frações 40-55) a partir de 464 mg de extrato bruto, resultando em uma taxa de recuperação de 8,125% com pureza cromatográfica de 81% por conversão direta. A taxa de recuperação seria maior se fosse reunidas as demais frações impuras em que artepilina C estivesse presente. Diante desse resultado, o CCC permitiu a extração seletiva da artepilina em um curto período de separação, aproximadamente 3 horas, utilizando baixo consumo de solvente e apresentando elevada eficiência. A otimização das variáveis operacionais, incluindo a utilização de ferramentas adequadas para o controle do pH e a troca do ácido e da base, assegurou condições ideais para a realização da separação e isolamento deste biomarcador da propolis verde.

5.3.3. Perfil cromatográfico (*fingerprint*) por LC-MSMS dos metabólitos presentes na fração do EEPV por HSCCC

A hifenização de CCC para outras técnicas analíticas tem sido cada vez mais usada, especialmente cromatografia líquida-espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS), para anotar rapidamente compostos bioativos em misturas complexas derivadas de produtos naturais ((LEITÃO *et al.*, 2021). As substâncias naturais oriundas do metabolismo especial de própolis têm sido uma poderosa fonte de princípios ativos. No entanto, a caracterização de constituintes que venham a contribuir como alvos moleculares importantes necessitam de técnicas para triagem de extratos complexos; e para isso as técnicas hifenadas tem sido poderosa ferramenta analítica (SARKER & ,

NAHAR 2012). Na busca de métodos rápidos de triagem química que sejam capazes de caracterizar as substâncias presentes na matriz sem a necessidade de isolamento e caracterização estrutural posterior, as técnicas combinadas (hifenadas), como HPLC-DAD, LC-MS, LC-MS/MS, GC-MS, tem sido empregada na análise de produtos naturais, em especial para a matriz de própolis (TAMFLU *et al.*, 2019; FU *et al.*, 2019; DAR *et al.*, 2019).

Com relação à cromatografia líquida, esta é muito utilizada para o isolamento de produtos naturais e purificação de produtos de reações química ou mesmo no controle de qualidade de produtos farmacêuticos e alimentícios. Essa técnica tem sua versatilidade baseada no grande número de fases estacionárias existentes, as quais possibilitam análises e diferentes mecanismos de separações, permitindo avaliar uma gama de substâncias com alta eficiência (DAR *et al.*, 2019). Devido à sua versatilidade, a HPLC vem suprir algumas limitações da GC quanto ao tipo de substâncias que podem ser separados, uma vez que a cromatografia em fase gasosa só separa compostos voláteis ou volatilizáveis termicamente estáveis (GOMES, 2010).

O grande avanço das técnicas combinadas têm representado novas estratégias para caracterização do perfil químico (*fingerprint*) de amostras complexas de diferentes extratos, de origem animal e vegetal, e nesse contexto, estas ferramentas analíticas tem sido de grande valia (DONNO *et al.*, 2015). A separação, identificação e quantificação de constituintes em extratos vegetais complexos é uma tarefa desafiadora. No entanto, hoje uma multiplicidade de diferentes técnicas de separação, fases estacionárias específicas e detectores estão disponíveis, ajudando a atingir a seletividade, sensibilidade e velocidade desejadas para quase qualquer problema de separação. A técnica mais proeminente e popular nesta área de pesquisa é definitivamente a combinação de cromatografia líquida e espectrometria de massa. (GANZERA & STURM, 2018).

As metodologias hifenadas baseadas no uso das técnicas de LCMS e LC-MS/MS apresentam alta sensibilidade e grande potencial de informações estruturais tornam-se uma ferramenta analítica importante, tanto na identificação de novas substâncias como no mapeamento metabolômico de determinadas classes de substâncias (WANG *et al.*, 2011; STEINMANN & GANZERA, 2011). Devido às suas características inerentes de medições de massa precisas e alta resolução, a MS de tempo de voo (TOF) é bem adequada para este campo, especialmente para aplicações qualitativas (ZHOU *et al.*, 2009). Além disso, são ferramentas preferenciais usadas para mapeamento das substâncias de características mais polares (fenóis e flavonoides) em extratos vegetais e animais. Apesar das novas técnicas de análises hifenadas que se encontram disponíveis no mercado englobarem modernidade, eficiência, rapidez e, vir contribuindo substancialmente na separação e identificação de amostras complexas, ainda há limitações quanto ao seu uso, em detrimento da baixa concentração do componente nas matrizes, e em especial, o custo elevado do equipamento e seus insumos (solventes, colunas, etc) (STEINMANN & GANZERA, 2011; SISMOTTO *et al.*, 2013).

Como os componentes presentes na matriz da própolis são na sua maioria substâncias fenólicas, ácidos carboxílicos e seus derivados, os mesmos podem ser ionizados e serem analisados por a espectrometria de massas com ionização por “*electrospray*” (ESI-MS), no modo positivo ou negativo (XU *et al.*, 2020). A importância desta técnica se deve a seu uso para simples determinação do peso molecular e/ou quantificação de uma substância, mapeamento metabolômico ou mesmo em estudos de determinação estrutural (DEMARQUE *et al.*, 2020). Os métodos MS/MS fornecem uma análise rápida de fenólicos e podem, portanto, determinar e validar com sucesso a qualidade dos produtos à base de própolis (SAFTIĆ *et al.*, 2020).

No presente trabalho a vantagem do uso desta técnica hifenada, se deu, porque de maneira geral, a presença de moléculas de baixa massa molecular e contendo poucos sítios ionizáveis, produzem espectros de massas simples por ESI, e uma análise estrutural mais detalhada da composição química dos extratos foi auxiliada com o uso da espectrometria de massas sequencial MS/MS contrastada com o banco de dados de substâncias orgânicas criada pelo nosso grupo de trabalho. A vantagem de usar a técnica LC-MS/MS, o que caracteriza a espectrometria de massas sequencial (MS/MS), foi porque, assim, foi possível fazer a seleção de duas razões m/z , uma para o precursor e outra para o fragmento, resolvendo o problema na qualificação de isômeros que co-eluem, desde que possuam fragmentos com diferentes razões de m/z . O analisador usado neste trabalho foi o

analisador quadrupolo - tempo de voo (QTOF), que direciona os íons ortogonalmente do quadrupolo ao tempo de voo, através de um acelerador de íons, para análises no modo de espectrometria de massas em série (MS/MS) com varredura dos íons produtos (GUILHAUS *et al.*, 2000; SISMOTTO *et al.*, 2013).

Os extratos de própolis verde foram analisados por meio de ionização por eletronspary com espectrometria de massas (ESI-MS) e ionização por pressão atmosférica (APCI-MS) nos modos de ionização positivo e negativo. A análise dos espectros dos extratos de própolis verde indicou que o modo de ionização negativo forneceu um nível de sensibilidade mais alto que o positivo, permitindo a identificação de várias substâncias. A **Tabela 8** mostra um total de 92 substâncias possivelmente identificadas.

Dados de fragmentação MS/MS obtidos para 92 substâncias foram usados para identificação e avaliação do perfil químico (*fingerprint*) dos metabólitos oriundo do fracionamento do extrato etanólico de propolis verde, bem como para uma fração enriquecida (fração 40-55 de CCC3) com artepilina C, proveniente de cromatografia de contra corrente. O uso da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, tem sido fundamental para identificar e monitorar substâncias bioativas e contaminantes prejudiciais à saúde humana em alimentos (THEURILLAT *et al.*, 2023), plantas (RAI *et al.*, 2023) e produtos apícolas (COSTA *et al.*, 2024).

Os íons precursor e seus fragmentos obtidos nesta análise foram identificados com base na comparação de dados descritos nas referências apresentadas na **Tabela 8**. As possíveis substâncias identificadas pertencem às seguintes classes químicas: flavonoides, fenilpropanoides, terpenos, triterpenos pentacíclicos, lipídeos fenólicos, aminoácido e alcaloide. As substâncias foram identificados com base na massa exata (erro < 10 ppm) e fragmentação característica.

Tabela 8 - Perfil químico do EEPV fracionado por CCC e analisado por LC-MS /MS com ESI (modo positivo e negativo) e APCI (modo negativo e positivo).

COMPOSTO	MASSA MONO-ISOTÓPICA (Da)	NOME DA SUBSTÂNCIA	FÓRMULA MOLECULAR	FONTE	ESPÉCIE	M/Z ADQUIRIDO	ERRO (PPM)	MS/MS	REFERÊNCIA
FENILPROPANOIDES									
1	164,0480	Ácido <i>p</i> -cumárico	C ₉ H ₈ O ₃	ESI-	[M-H] ⁻	163,0407	3,8	119, 103	SUREK <i>et al.</i> , 2021
2	180,0431	Ácido cafeico	C ₉ H ₈ O ₄	ESI-	[M+HCOO] ⁻	225,0413	4,5	107	VIEIRA <i>et al.</i> , 2023
3	192,0647	Ácido quínico	C ₇ H ₁₂ O ₆	ESI-	[M-H] ⁻	191,0573	7,03	Nd*	VIEIRA <i>et al.</i> , 2023
4	194,0585	Ácido ferúlico ou isoferúlico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	ESI-	[M-H] ⁻	193,0514	3,05	134,106	SUREK <i>et al.</i> , 2021
5	230,0948	2,2-Dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano ^F	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	ESI-	[M-H] ⁻	229,0872	2,31	187,132,117	MACHADO <i>et al.</i> , 2016
6	232,1098	Drupanina	C ₁₄ H ₁₆ O ₃	ESI-	[M-H] ⁻	231,1027	-0,49	187,132	SUREK <i>et al.</i> , 2021
7	246,0897	Drupanal ^F	C ₁₄ H ₁₄ O ₄	ESI-	[M-H] ⁻	245,0823	1,9	213,199,190,175,158	TANI <i>et al.</i> , 2019
8	248,1059	3,4-dihidroxi -5- prenil ácido cinâmico ^F	C ₁₄ H ₁₆ O ₄	ESI-	[M-H] ⁻	247,0988	4,27	203,185,148	MARCUCCI <i>et al.</i> , 2008
9	248,1055	5-isoprenil do ácido cafeico	C ₁₄ H ₁₆ O ₄	ESI-	[M-H] ⁻	247,0986	2,75	203,132	XU <i>et al.</i> , 2020
10	296,1044	Cafeato de cinamoíla	C ₁₈ H ₁₆ O ₄	ESI-	[M-H] ⁻	295,0987	-1,64	251	VIEIRA <i>et al.</i> , 2023
11	298,1565	Culifolina	C ₁₉ H ₂₂ O ₃	ESI-	[M-H] ⁻	297,1492	-1,15	191	MARCUCCI <i>et al.</i> , 2008
12	300,1728	Artepilina C	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	ESI-	[M-H] ⁻	299,1662	0,7	255,244,200	SUREK <i>et al.</i> , 2021
13	302,1508	Ácido 3-prenil-4-(2-metilpropioniloxi)-cinâmico ^F	C ₁₈ H ₂₂ O ₄	ESI-	[M-H] ⁻	301,1436	-3,31	202, 132	MARCUCCI <i>et al.</i> , 2008
14	316, 1685	Capilartemisina A/B	C ₁₉ H ₂₄ O ₄	ESI-	[M-H] ⁻	315, 1611	3,44	297, 285, 271, 253, 241, 198, 186	SUREK <i>et al.</i> , 2021
15	316,1690	3- hidroxi-2,2-dimetil-8-prenil- 2H-1-benzopirano-6-ácido propenóico ^F	C ₁₉ H ₂₄ O ₄	ESI-	[M-H] ⁻	315,1619	4,96	297,285,271,253,241,198,186	SUREK <i>et al.</i> , 2021
16	328,1326	<i>p</i> -coumarato de dihidroconiferil	C ₁₉ H ₂₀ O ₅	ESI-	[M-H] ⁻	327,1252	4,66	239	FALCÃO <i>et al.</i> , 2023
17	330,1840	Derivado da artepilina C	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	ESI-	[M+HCOO] ⁻	329,1768	2,55	299,255	SUREK <i>et al.</i> , 2021
18	354,0948	Ácido clorogênico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	APCI +	[M+H] ⁺	355,1021	-0,86	163,135,117,89	SUN <i>et al.</i> , 2019

Continuação....68

19	360,0867	Ácido rosmarínico	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	ESI+	[M+H] ⁺	361,0943	6	Nd*	SALGUEIRO <i>et al.</i> , 2016
20	362,1730	Secoisolariciresinol	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	ESI-	[M-H] ⁻	361,1660	0,24	243,155	VIEIRA <i>et al.</i> , 2023
21	364,1688	Bacarina	C ₂₃ H ₂₄ O ₄	ESI-	[M-H] ⁻	363,1614	3,63	187,149	SUREK <i>et al.</i> , 2021
22	368,1116	Ácido feruloilquínico	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	ESI-	[M-H] ⁻	367,1041	2,05	193,161	CONTIERRI <i>et al.</i> , 2022
23	378,1483	<i>E</i> -Bacarina 5"- aldeído	C ₂₃ H ₂₂ O ₅	ESI-	[M+HCOO] ⁻	423,1462	4,24	Nd*	FALCÃO <i>et al.</i> , 2023
24	380,1652	Derivado de drupanina	C ₂₃ H ₂₄ O ₅	ESI-	[M-H] ⁻	379,1580	7,5	231, 211, 185,170,149, 132	FALCÃO <i>et al.</i> , 2023
25	394,1432	Éster prenildicumárico	C ₂₃ H ₂₂ O ₆	ESI-	[M-H] ⁻	393,1360	3,95	229,185,163, 145,119	SUREK <i>et al.</i> , 2021
26	394,1455	(<i>E</i>)-3-(4-(((<i>E</i>)-3-(3,4-diidroxí-5-(3-metilbut-2-en-1-yl)fenil)acrilóil)oxi)fenil) ácido acrílico	C ₂₃ H ₂₂ O ₆	ESI-	[M-H] ⁻	393,1377	9,7	349,163,145, 117	XU <i>et al.</i> , 2021
27	448,2261	(<i>E</i>)-3-{4-hidroxi-3-[(<i>E</i>)-4-(2,3-diidrocinamoiloxi)-3-metil-2-butenil]-5-prenil-fenil}-2- ácido propenoico ^F	C ₂₈ H ₃₂ O ₅	ESI-	[M-H] ⁻	447,2185	2,5	297,253,197,1 49,105	SUREK <i>et al.</i> , 2021
28	516, 1462	Ácido dicaffeoilquínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	ESI-	[M-H] ⁻	515, 1389	-3,31	353, 191, 179, 161, 135	XU <i>et al.</i> , 2020
29	614, 3247	Derivado de artepilina C2	C ₃₈ H ₄₆ O ₇	ESI-	[M-H] ⁻	613, 3184	0,57	555,511,467,2 81, 269,229	SUREK <i>et al.</i> , 2021
30	614, 3253	Derivado de artepilina C3	C ₃₈ H ₄₆ O ₇	ESI-	[M-H] ⁻	613, 3184	1,61	511, 467, 299,281,255,2 11,156	SUREK <i>et al.</i> , 2021
31	678, 1615	Ácido tricafeoil quínico	C ₃₄ H ₃₀ O ₁₅	ESI-	[M-H] ⁻	677, 1541	4,5	515, 353, 191, 179, 135	VIEIRA <i>et al.</i> , 2023
FLAVONOIDES									
32	254,0956	2-hidroxi-4-metoxichalcona	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	ESI-	[M-H] ⁻	253,0883	4,97	209,162,145,1 18	MACHADO <i>et al.</i> , 2016
33	256,0744	Liquiritigenina ou Isoliquiritigenina	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	ESI-	[M-H] ⁻	255,0671	3,17	213,171,145,1 30	SUREK <i>et al.</i> , 2021
34	256,0751	Pinocembrina	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	ESI-	[M-H] ⁻	255,0679	5,97	213	XU <i>et al.</i> , 2020
35	268,0750	Formononetina	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	ESI-	[M-H] ⁻	267,0680	5,52	252,223,195, 176	SUREK <i>et al.</i> , 2021
36	272,0699	Pinobanksina	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	ESI-	[M-H- H ₂ O] ⁻	253,0520	5,42	143,107	VIEIRA <i>et al.</i> , 2023
37	272.0706	Narigenina	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	ESI-	[M-H] ⁻	271,0631	7,68	177,151,119, 107	SUREK <i>et al.</i> , 2021

38	272,1058	Vestitol	C ₁₆ H ₁₆ O ₄	ESI-	[M-H- H ₂ O] ⁻	253,0879	3,46	145,118	VIEIRA <i>et al.</i> , 2023
39	284,1064	Homopterocarpina	C ₁₇ H ₁₆ O ₄	ESI-	[M-H] ⁻	283,0991	5,26	163,149,119	VIEIRA <i>et al.</i> , 2023
40	286,0855	Isosakuranetina (4-metil-naringenina)	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	ESI-	[M-H] ⁻	285,0782	4,66	243,201,164, 136,108	SUREK <i>et al.</i> , 2021
41	286,0854	Caempferol	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	APCI -	[M-H] ⁻	285,0781	4,42	Nd*	CHANG <i>et al.</i> , 2008
42	288,0661	Aromadendrina (diidrocaempferol)	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	ESI-	[M-H] ⁻	287,0585	9,26	259,215,177, 151,125,107	SUREK <i>et al.</i> , 2021
43	290,0800	Epicatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	ESI-	[M-H- H ₂ O] ⁻	271,0623	3,46	Nd*	VIEIRA <i>et al.</i> , 2023
44	298,0859	Éter 8-metílico de retusina	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	ESI-	[M-H] ⁻	297,0787	5,93	282,267,254, 239,211	SUREK <i>et al.</i> , 2021
45	300,0646	Canferide	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	ESI-	[M-H] ⁻	299,0572	4,01	284,255,163,1 51,132,107	MACHADO <i>et al.</i> , 2016
46	302,04410	Quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	ESI-	[M-H] ⁻	301,0368	4,71	257,179,151, 107	VIEIRA <i>et al.</i> , 2023
47	302,0810	Aromadendrina-4-metil éter	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	ESI-	[M-H] ⁻	301,0738	6,63	273,255,180 ,165	SUREK <i>et al.</i> , 2021
48	302,0817	Diidrocanferide	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	ESI-	[M-H] ⁻	301,0747	8,94	283,255,180, 152,125,107	SUREK <i>et al.</i> , 2021 VIEIRA <i>et al.</i> , 2023
49	306,0762	Epigallocatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	ESI-	[M-H] ⁻	305,0690	7,25	245,157	VIEIRA <i>et al.</i> , 2023
50	314,0805	Ermanin	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	ESI-	[M-H] ⁻	313,0733	4,66	298,283,255, 145	VIEIRA <i>et al.</i> , 2023
51	316,0597	Ramnetina	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	ESI-	[M-H] ⁻	315,0523	4,59	Nd*	VIEIRA <i>et al.</i> , 2023
52	316,0951	Violanona	C ₁₇ H ₁₆ O ₆	ESI-	[M-H] ⁻	315,0874	1,41	Nd*	MACHADO <i>et al.</i> , 2016
53	330,0761	Betuletol	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	ESI-	[M-H] ⁻	329,0688	6,41	314,299,271	SUREK <i>et al.</i> , 2021
54	332,1640	Laricitina	C ₁₆ H ₁₂ O ₈	ESI-	[M-H] ⁻	331,1570	4,98	Nd*	RIGHT <i>et al.</i> , 2013 VIEIRA <i>et al.</i> , 2023
55	346,0718	Eupatolitina	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	ESI-	[M-H] ⁻	345,0647	8,57	Nd*	VIEIRA <i>et al.</i> , 2023
56	370,1409	Pinobanksina-3-O- hexanoato	C ₂₁ H ₂₂ O ₆	ESI-	[M-H] ⁻	369,1331	-2,02	Nd*	VIEIRA <i>et al.</i> , 2023
TERPENOS									
57	286,2298	Totarol	C ₂₀ H ₃₀ O	APCI +	[M+H- H ₂ O] ⁺	269, 2265	0,31	Nd*	SUREK <i>et al.</i> , 2021
58	300,2098	Sugiol	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	ESI-	[M+HCOO-H ₂ O] ⁻	327, 1978	2,94	Nd*	SUREK <i>et al.</i> , 2021

59	316,2037	Isômero do ácido idroxidesidroabiético (II)	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	ESI-	[M+HCOO] ⁻	361, 2020	-0,35	Nd*	VIEIRA <i>et al.</i> , 2023
60	320, 2361	Ácido isocupressico	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	ESI-	[M-H] ⁻	319, 2290	2,9	275,257,204,147,119	MARCUCCI <i>et al.</i> , 2008
61	332,1998	Ácido 15,16-epoxi-19-hidroxi-1,3,13(16),14-clerodatetraen-18-óico	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	ESI-	[M+HCOO] ⁻	377,1978	3,01	287,273,229,201,146	RODRIGUES <i>et al.</i> , 2019
62	334,2126	Ácido agático	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	ESI-	[M-H] ⁻	333, 2054	-5,38	Nd*	SUREK <i>et al.</i> , 2021
63	336,2323	Ácido junicédrico (ácido diidroagático)	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	ESI-	[M-H] ⁻	335,2248	6,55	337,291,274,149,106	SUREK <i>et al.</i> , 2021
64	348,2312	Éster 15-metilico do ácido agático	C ₂₁ H ₃₂ O ₄	ESI-	[M-H] ⁻	347,2235	3,18	303,275,247,203,176,156	MACHADO <i>et al.</i> , 2016
65	362,2464	Ácido 15-acetoxi-cupressico	C ₂₂ H ₃₄ O ₄	ESI-	[M+HCOO] ⁻	407,2451	1,96	301,236,187,134	SUREK <i>et al.</i> , 2021
66	424,3685	Germanicone	C ₃₀ H ₄₈ O	ESI+	[M+H] ⁺	425,3769	-4,81	297,205,149	^{E,D} ALBUQUERQUE <i>et al.</i> , 2007
67	426,3873	β-amirina/α-amirina	C ₃₀ H ₅₀ O	ESI-	[M+HCOO] ⁻	471,3857	2,68	205	^{E,D} TAVARES <i>et al.</i> , 2010
68	454,3437	Ácido mangiferônico	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	APCI -	[M-H] ⁻	453,3361	-2,12	351	SUREK <i>et al.</i> , 2021 ^D SANTOS <i>et al.</i> , 2024
69	456,3597	Ácido mangiferólico	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	ESI-	[M-H] ⁻	455,3536	-1,52	349,283,207,189	SUREK <i>et al.</i> , 2021
70	456,3953	24-metilenocicloartano-3β,26-diol	C ₃₁ H ₅₂ O ₂	ESI-	[M+HCOO] ⁻	501,3940	-3,21	426,133,105	^{E,D} SILVA <i>et al.</i> , 2005
71	468,3602	Ácido ambônico	C ₃₁ H ₄₈ O ₃	APCI +	[M+H] ⁺	469,3676	-0,39	451,423,409,377,339,247,203,147,109	^D SANTOS <i>et al.</i> , 2024
72	470,3402	Triterpeno não identificado	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	ESI-	[M-H] ⁻	469,3326	1,18	425,357,288,207	XU <i>et al.</i> , 2020
73	470,3409	Triterpeno não identificado	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	ESI-	[M-H] ⁻	469,3335	2,71	426,311,207	^D SUREK <i>et al.</i> , 2021
74	470, 3769	Ácido ambólico	C ₃₁ H ₅₀ O ₃	ESI-	[M-H] ⁻	469, 369	1,92	425,357,273,205,133	^{E,D} SILVA <i>et al.</i> , 2005
75	472, 3546	Triterpeno não identificado	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	ESI-	[M-H- H ₂ O] ⁻	453, 3352	1,42	457,427,393,327,246,205	SUREK <i>et al.</i> , 2021
76	472, 3554	Triterpeno não identificado	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	ESI-	[M-H] ⁻	471,3502	0,2	471,409,393,377	SUREK <i>et al.</i> , 2021
ÁCIDOS GRAXOS									
77	256,2410	Ácido palmítico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	ESI-	[M-H] ⁻	255,2338	2,86	Nd*	SUREK <i>et al.</i> , 2021
78	282,2565	Ácido oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	ESI-	[M-H] ⁻	281,2493	2,31	255	SUREK <i>et al.</i> , 2021

79	284,2721	Ácido esteárico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	ESI-	[M-H] ⁻	283,2649	1,96	Nd*	SUREK <i>et al.</i> , 2021
80	304,2411	Ácido araquidônico	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	ESI-	[M+HCOO- H ₂ O] ⁻	331,2289	2,94	Nd*	SUREK <i>et al.</i> , 2021
LIPÍDEOS FENÓLICOS									
81	346,2520	Ácido anacárdico (15:1)	C ₂₂ H ₃₄ O ₃	ESI-	[M-H] ⁻	345,2446	3,47	317,299,276, 219,150,122, 105	^D SUREK <i>et al.</i> , 2021
82	348,2675	Ácido anacárdico (15:0)	C ₂₂ H ₃₆ O ₃	ESI-	[M-H] ⁻	347,2601	3,08	303,106	^D SUREK <i>et al.</i> , 2021
83	372,2676	Ácido anacárdico (17:2)	C ₂₄ H ₃₆ O ₃	ESI-	[M-H] ⁻	371,2602	3,13	345,327,303, 233,189,150, 106	^D SUREK <i>et al.</i> , 2021
84	374,2834	Ácido anacárdico (17:1)	C ₂₄ H ₃₈ O ₃	ESI-	[M-H] ⁻	373,2760	3,38	329,161,106	^D SUREK <i>et al.</i> , 2021
85	402, 3139	Ácido anacárdico (19:1)	C ₂₆ H ₄₂ O ₃	ESI-	[M-H] ⁻	401, 3073	1,13	357,189,106	^D SUREK <i>et al.</i> , 2021
OUTRAS CLASSES QUÍMICAS									
86	152,0474	Vanilina	C ₈ H ₈ O ₃	ESI-	[M-H] ⁻	151,1080	0,48	107	MARCUCCI <i>et al.</i> , 2008
87	166,0627	Veratraldeído	C ₉ H ₁₀ O ₃	ESI-	[M-H- H ₂ O] ⁻	147,0449	-1,78	121,108	RODRIGUES <i>et al.</i> , 2020
88	170,0221	Ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅	ESI-	[M-H] ⁻	169,0148	3,16	Nd*	SUREK <i>et al.</i> , 2021
89	234,0896	Viscidona	C ₁₃ H ₁₄ O ₄	ESI-	[M-H] ⁻	233,0824	1,53	189,173,147, 119	MACHADO <i>et al.</i> , 2016
90	339,2182	Lobelanidina	C ₂₂ H ₂₉ NO ₂	ESI-	[M-H ₂ O] ⁻	321,2082	-4,66	Nd*	^D VIEIRA <i>et al.</i> , 2023
91	462,1181	Cinamoil-galoil-hexosídeo	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	ESI+	[M+H- H ₂ O] ⁺	445,1168	4,12	Nd*	SUREK <i>et al.</i> , 2021
92	748, 2226	Leucina-aspartato-lisina	C ₁₆ H ₃₅ N ₅ O ₇	ESI-	[M-H] ⁻	747, 2150	1,56	Nd*	VIEIRA <i>et al.</i> , 2023

*Nd: não detectado no MS/MS por não estar entre os 10 íons mais abundantes por ciclo (set precursor ion per cycle = 10) ^D Dados experimentais observados em GC-MS e confirmados na biblioteca NIST2023; ^ESubstância isolada na referência indicada mas não realizado LCMS/MS. ^F Estrutura da substância na **Figura 44**.

Os derivados de ácidos cinâmicos prenilados são característicos da própolis verde (MARCUCCI *et al.*, 2008) e a fonte ESI no modo de ionização negativa é preferencialmente a melhor forma de identificação dessas substâncias (XU *et al.*, 2020; SUREK *et al.*, 2021; VIEIRA *et al.*, 2023). O modo de ionização positiva em ESI permitiu a identificação de duas substâncias e em APCI permitiu a identificação de três substâncias (**Tabela 8**). No modo de ionização negativa foram encontradas 85 substâncias sendo apenas duas substâncias, kaempferol e o ácido mangiferólico, encontrado em APCI. Das 92 possíveis substâncias identificadas no extrato de própolis verde, a maioria pertence à classe dos flavonoides e fenilpropanoides. Em um estudo comparativo de própolis verde de diferentes estados brasileiros, Righi e colaboradores (2013) e Vieira e colaboradores (2023) relataram substâncias fenólicas e flavonoides como as principais classes químicas, o que corrobora o perfil químico encontrado no presente estudo.

As substâncias apresentadas na **Figura 44** foram escolhidas aleatoriamente para serem apresentadas, e assim, como as demais da **Tabela 8**, foram detectadas nessa matriz e confirmadas em diversas pesquisas científicas. No trabalho realizado por Tani e colaboradores (2019) foi descrito o isolamento e a identificação de um novo derivado do ácido cinâmico, denominado drupanal (composto 7), a partir do extrato etanólico da PVB, utilizando técnicas como participação líquido-líquido, cromatografia em coluna e CLAE preparativa. Além disso, os pesquisadores realizaram a quantificação simultânea de 20 constituintes, incluindo 10 derivados de ácido cinâmico, 7 flavonoides e 3 derivados de ácido cafeoilquínico, empregando LC-MS/MS.

Em uma investigação paralela, Machado e colaboradores (2016) compararam a composição química da própolis amarela originária do Mato Grosso do Sul com a própolis verde, marrom e vermelha, além de uma amostra de própolis amarela de Cuba, constatando perfis químicos qualitativos distintos entre elas. A presença da substância 2,2-Dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano (composto 5) foi observada nas própolis verde de São Paulo e Minas Gerais.

Por sua vez, Surek e colaboradores (2021) identificaram ácidos cinâmicos prenilados, como o 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-ácido propenóico (composto 15) e o (*E*)-3-{4-hidroxi-3-[(*E*)-4-(2,3-di-hidrocinaoiloxi)-3-metil-2-butenil]-5-prenil-fenil}-2-ácido propenoico (composto 27) em extratos de própolis verde e tubuna (oriundo de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona bipunctata*). Além disso, Marcucci e colaboradores (2008) também conduziram uma análise de componentes principais (PCA) entre diferentes tipos de própolis, constatando, entre outras substâncias, a presença do ácido 3-prenil-4-(2-metilpropioniloxi)-cinâmico (composto 13) na própolis do Sudeste, que também foi encontrado no presente trabalho. Destaca-se ainda a confirmação da *E*-Baccharin 5"-aldeído (composto 23) que foi identificada nos estudos realizados por Rodrigues e pesquisadores (2020) e Falcão e colaboradores (2023). Neste estudo, a substância foi detectada na forma de aduto com *m/z* igual 423. Contudo, esse íon produto além de outros não puderam ser identificados na análise MS/MS, uma vez que não fizeram parte dos dez íons mais abundantes por ciclo, o que indica a necessidade de um aprimoramento metodológico para possibilitar a observação dos íons ainda não detectados.

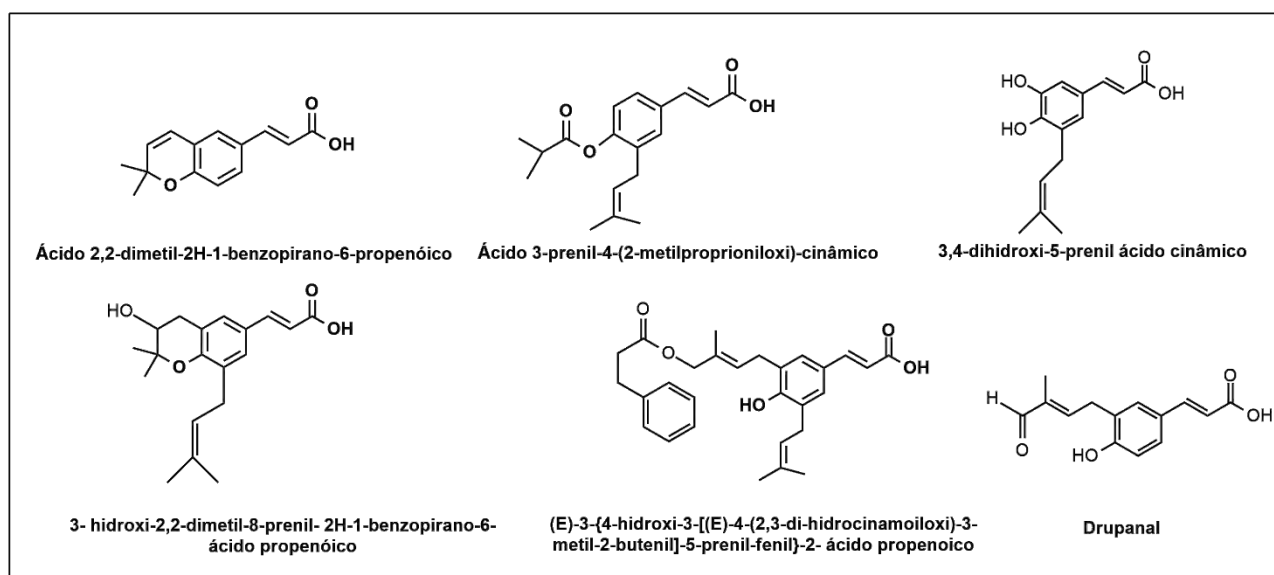


Figura 44-Estruturas químicas de algumas substâncias detectadas no EEPV por LC-MS/MS.

No presente estudo, composto 26 pertencente à classe dos fenilpropanóides foi identificado por Xu e colaboradores (2020) em um estudo que analisaram o perfil químico da própolis identificando 28 principais substâncias. Os autores também enfatizaram que a artepilina C é o principal marcador e identificou os flavonóides quercetina, pinobankisina e canferide na própolis verde. A pesquisa de Chang e colaboradores (2008) avaliaram os extratos etanólico e diclorometano da própolis verde utilizando HPLC-APCI-MS (modo positivo) e GC-MS, fornecendo valiosas informações sobre a composição química da amostra de própolis verde, encontrando 78 substâncias, muitas dessas sendo ácido benzoico e alguns benzoatos, e ésteres alifáticos, sendo valioso estudo para o entendimento das substâncias apolares.

No que diz respeito a classe de substâncias mais lipofílicas, como os triterpenos pentacíclicos, foi observado nas referências consultadas (SUREK *et al.*, 2021; XU *et al.*, 2020; VIEIRA *et al.*, 2023, CONTIERI *et al.*, 2022) pouca ou nenhuma informação sobre essas classes contidas na própolis verde. Sendo assim, a busca na literatura de dados para contrastar com os resultados aqui apresentado, ficou limitada.

Para a identificação das substâncias contidas na **Tabela 8** (linhas dos terpenos) da classe dos triterpenos pentacíclicos no EEPV, foi utilizado resultados obtidos com estudo prévio realizado com o extrato hexânico de própolis verde por CCC (capítulo I). Por exemplo, os ácidos ambônico (composto 71) e mangiferônico (composto 68) foram isolados e identificados como mistura por GC-MS em frações obtidas por CCC do extrato hexânico da própolis verde no presente trabalho (SANTOS *et al.*, 2024), e puderam ser utilizados como referências para auxiliarem no monitoramento e identificação em frações obtidas também por CCC, agora no extrato etanólico de própolis. Esta análise comparativa, permitiu identificar no EEPV a presença também desses mesmos dois ácidos triterpenicos, além dos compostos germanicone (composto 66), amirina (composto 67) e 24-metilenocicloartano-3 β ,26-diol (composto 70).

Contieri e colaboradores (2022) conduziram um controle de qualidade em 17 extratos comerciais de própolis brasileiras da região Sudeste, incluindo 8 extratos etanólicos de própolis verde. A análise revelou a presença de 23 substâncias, destacando-se a artepilina (composto 12) e a bacarina (composto 21), sendo a artepilina C o principal marcador químico nos extratos etanólicos conforme evidenciado nesse estudo.

Após o tratamento dos dados no programa MasHunter (Agilent), foi possível avaliar os dados por meio da análise de conjunto. Assim, via diagrama de Venn (**Figura 45**), desenvolvido no MPP, foi possível analisar os íons exclusivos do EEPV e da fração CCC3 FR 40-55 em ESI no modo negativo, assim como os íons compartilhados entre as duas amostras. A escolha do modo ESI negativo

foi fundamentada no fato de que este proporcionou uma identificação maior de íons conhecidos, conforme apresentado na **Tabela 8**. No total, o extrato bruto revelou 2957 íons, dos quais 312 foram identificados entre as duas amostras. Para a fração CCC3 FR 40-55, foram observados 827 íons, destacando que 515 novos íons foram detectados nessa fração. Esses íons não estavam entre os dez mais abundantes do ciclo no extrato, mas surgiram durante o processo de enriquecimento da amostra.

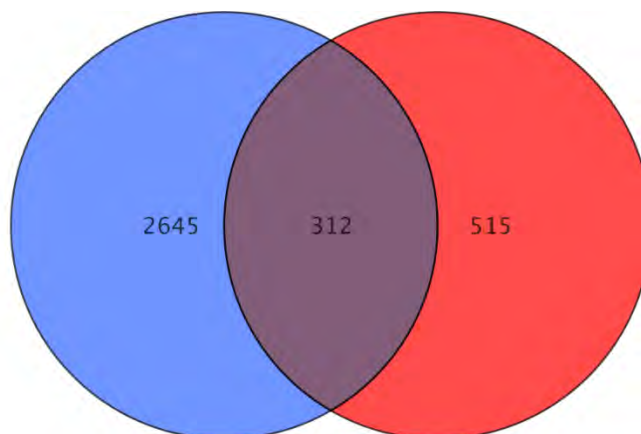


Figura 45-Diagrama de Venn de análises pareadas pelo MPP (versão 15.5). (Azul) íons identificados para EEPV; (vermelho) íons identificados para fração 40-55 (CCC3); (Roxo) íons compartilhados entre ambas amostras.

Esses resultados evidenciam o potencial da técnica de CCC na separação e no isolamento de substâncias, associado ao uso da técnica de LC-MS/MS, foi possível observar que 70% dos íons apresentados no extrato não estavam presentes na fração enriquecida. A CCC aplicada ao extrato etanólico de própolis verde possibilitou o enriquecimento e isolamento de substâncias minoritárias, que anteriormente eram difíceis de isolar através de métodos cromatográficos tradicionais, como demonstrado pelo caso da drupanina. O monitoramento e a identificação das diferentes classes de substâncias apresentadas neste trabalho, foi realizado por meio de um banco de dados elaborado no equipamento LC-MS/MS (Agilent) da CAM-UFRRJ e que foi comparados com dados da literatura.

Contudo, para avaliar a eficácia dessa metodologia aplicada a investigação de substâncias desconhecidas e, mesmo, conhecidas, foram analisados no software MPP, o total de íons gerados no extrato etanólico bruto da própolis verde e na fração 40-55 (CCC3) em termos de massa (Da) dos íons gerados *versus* o tempo de retenção (**Figura 46**). Os círculos vermelhos representam os 827 íons presentes na fração enquanto os círculos azuis representam os 2957 íons totais presente em EEPV e sua massa observada. Pode ser observado que a fração enriquecida obtida por CCC possui uma abundância de íons entre 300 a 600 Da, correspondente em tempo de retenção de 20-30 minutos. Além disso, as substância apolares presentes EEPV cuja massas ultrapassam 600 Da e com tempo de retenção depois de 30 min bem como as substâncias polares antes de 10 min tem pouca relevância na fração enriquecida.

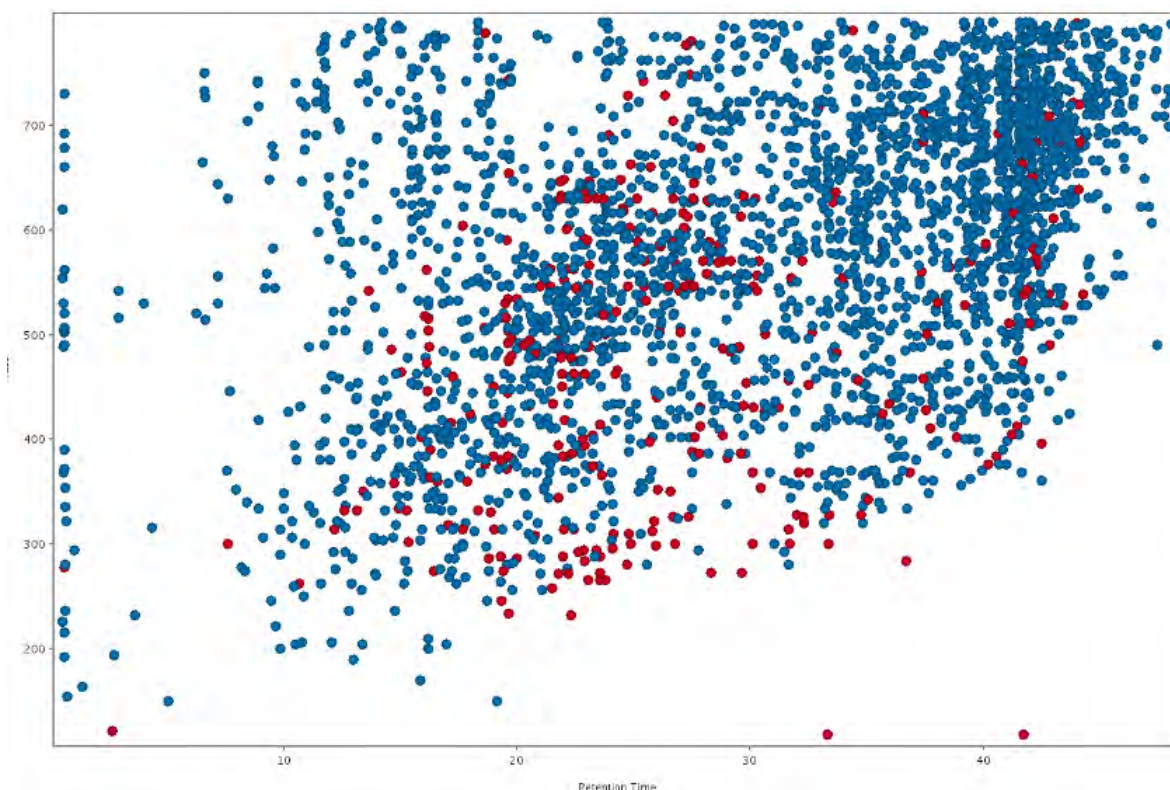


Figura 46–Gráfico de entidades em termos de abundância em massas (Da) *versus* tempo de retenção (minutos) produzidos em MPP (versão 15.5). (Azul) íons identificados para EEPV; (vermelho) íons identificados para fração 40-55 (CCC3).

Os resultados apresentados no gráfico da **Figura 46** indicam a análise da quantidade total de íons conhecidos e desconhecidos observados no extrato (2957), que apresenta uma distribuição mais consolidada entre as classes de massa de 200 a 600 Da, revela que apenas 3% desses íons foram identificados como pertencentes a 92 substâncias listadas na **Tabela 8**. Esses dados ressaltam um notável empobrecimento das informações disponíveis sobre a composição da própolis, em especial no que tange às substâncias com massas superiores a 600 Da, as quais são ainda pouco estudadas e documentadas. Além disso, a comparação entre o total de íons observados na fração proveniente de CCC (círculos vermelhos) e aqueles detectados no extrato (círculos azuis) demonstra uma quantidade, consideravelmente, inferior de substâncias nos círculos vermelhos, corroborando o potencial da estratégia de CCC para o fracionamento dessa matriz complexa.

5.4. Conclusões

Com o uso do sistema de solvente hexano-acetato de etila (8:2): 4% NaHCO₃ em CCC foi possível obter artepilina C do EEPV com elevada pureza cromatográfica (81%), conforme análise por HPLC-PDA. Este sistema de solvente é considerado "ecologicamente correto", uma vez que a mistura hexano-acetato de etila pode ser recuperada na fase estacionária, e o sódio contido na solução de carbonato e bicarbonato não é tóxico para o meio ambiente após neutralização. Em comparação com métodos cromatográficos tradicionais, como cromatografia em coluna convencional ou CLAE semipreparativa, a CCC demonstrou ser superior como técnica de separação e isolamento, requerendo menos tempo, pode ser realizado em uma única etapa e minimizou perdas da substância. Neste estudo, um total de 92 substâncias incluindo fenilpropanoides (31), flavonoides (25), terpenos (20), ácidos graxo (4), derivados de lipídeo fenólico (5) e outras classes químicas que incluem aminoácidos (2) e alcaloides (1) foram rastreadas e confirmadas por LC-MS/MS-QTOF. A triagem desses compostos fornecerá uma contribuição significativa para o entendimento da composição química da própolis.

CAPÍTULO III

EMPREGO DA CROMATOGRAFIA CONTRACORRENTE MULTIDIMENSIONAL NO ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA

6. CAPÍTULO III – EMPREGO DA CROMATOGRAFIA CONTRA CORRENTE MULTIDIMENSIONAL NO ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA

Resumo

A cromatografia contracorrente multidimensional (MDCCC) é uma técnica versátil que tem se tornado cada vez mais comum na purificação de substâncias bioativas em matrizes complexas, como é o caso da própolis verde brasileira (PVB). Esse produto apícola produzido pelas abelhas *Apis mellifera* L., é reconhecido por sua rica composição fitoquímica que inclui fenilpropanoides, flavonoides, triterpenos, derivados de lipídeos fenólicos, e uma variedade de outros constituintes ainda pouco explorados. Para isolar os constituintes químicos dessas matriz complexa foi utilizado um método geral útil de estimativa de sistemas de solventes (GUESS), baseado, previamente, na análise do extrato por CCD com diferentes sistemas de solventes aquosos e não aquosos. O extrato etanólico da própolis verde (EEPV) foi inicialmente fracionado por MDCCC (cromatografia contracorrente multidimensional) utilizando um sistema de solventes bifásico aquoso constituído por hexano-acetato de etila-etanol-água (1:0,8:1:1, v/v), em modo de eluição isocrática normal. Este método permitiu obter diretamente do extrato etanólico constituintes químicos usuais na própolis verde, entre eles a artepilina C, bacarina, diidrokaempferida, os isômeros da capilartermisina A/B e o ácido *p*-cumárico. Para ao isolamento da drupanina e do betuletol de uma fração contendo uma mistura de betuletol, canferide, drupanina e isosakuranetina, foi necessário realizar, após a HSCCC, a cromatografia de permeação em gel utilizando Sephadex LH-20. Posteriormente, para isolar uma mistura do ácidos anacárdicos presente em frações combinadas menos polares foi utilizado MDCCC com um novo sistema de solvente, hexano-clorofórmio-acetonitrila (1:0,1:1, v/v), associado a cromatografia de exclusão utilizando Sephadex LH-20. O estudo fitoquímico do extrato etanólico foi conduzido com rapidez e eficiência, e os principais constituintes presentes nas frações obtidas (betuletol, canferide, ácido anacárdico 17:1 e 19:1, culifolina, bacarina, artepilina C, mistura triterpênica dos ácidos ambônicos e mangiferônicos, drupanina, aromadendrina -4-metil éter, capilatermisina e ácido *p*-cumárico) por MDCCC foram submetidos a um estudo bioguiado em modelos de câncer de mama (linhagens MCF-7 e MDA-MB-231), ressaltando assim, a importância da PVB como uma fonte promissora para a pesquisa em tratamentos oncológicos.

Palavras-chave: Extrato etanólico de propolis verde; composição química, cromatografia contracorrente multidimensional.

Abstract

Multidimensional countercurrent chromatography (MDCCC) is a versatile technique that is increasingly being used to purify bioactive compounds in complex matrices, such as Brazilian green propolis (BGP). This bee product, produced by *Apis mellifera* L. bees, is known for its rich phytochemical composition, which includes phenylpropanoids, flavonoids, triterpenes, phenolic lipid derivatives and a variety of other constituents that are still poorly understood. In order to isolate the chemical constituents of these complex matrices, a generally useful estimation of solvent systems (GUESS) method was used, based on the previous analysis of the extract by TLC with different aqueous and non-aqueous solvent systems. The ethanol extract of green propolis (EEGP) was first fractionated by MDCCC using an aqueous biphasic solvent system consisting of hexane-ethyl acetate-ethanol-water (1:0.8:1:1, v/v), in normal isocratic elution mode. This method allowed us to obtain directly from the ethanol extract the usual chemical constituents of green propolis, including artepillin C, baccharin, dihydrokaempferide, capillartemisin A/B isomers and *p*-coumaric acid. To isolate drupanin and betuletol from a fraction containing betuletol, kaempferide, drupanin and sakuranetin, it was necessary to perform gel permeation chromatography on Sephadex LH20 after HSCCC. Subsequently, for the purification of less polar combined fractions, MDCCC with a new solvent system hexane-chloroform-acetonitrile (1:0.1:1, v/v) combined with exclusion chromatography on Sephadex was used to isolate a mixture of anacardic acid. The present phytochemical study of the ethanol extract was carried out quickly and efficiently, and the major constituents present in the fractions obtained (betuletol, kaempferide, anacardic acid 17:1 and 19:1, culifolin, baccharin, artepillin C, triterpene mixture of ambonic and mangiferonic acids, drupanin, aromadendrin methyl ether, capillathermisin and *p*-coumaric acid) were subjected by MDCCC to a bioguided study in breast cancer models (MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines), highlighting the importance of BGP as a promising source for research in oncological treatments.

Keywords: Brazilian green propolis; drupanin, countercurrent chromatography, anacardic acid

6.1. Introdução

A própolis brasileira, especialmente a própolis verde, destaca-se como uma das mais estudada no mundo (TAMFLU *et al.*, 2019). Originada a partir da coleta dos botões florais e dos exudatos de *Baccharis dracunculifolia* pelas abelhas *Apis mellifera* (QUEIROGA *et al.*, 2014; HERRERA-LÓPEZ *et al.*, 2020) para defender a colmeia de intrusos e manter a temperatura das colônias (SON *et al.*, 2022). Essa resina natural é um recurso de grande valor para a apicultura brasileira e o Brasil é um dos maiores produtores de própolis no mundo (RIBEIRO *et al.*, 2023; RIBEIRO *et al.*, 2024; STURM & ULRIH, 2020). A própolis tem sido amplamente utilizada devido às suas propriedades farmacológicas, como antioxidante (COSTA *et al.*, 2019; PIRES & CASTRO, 2023), antifúngico (BEZERRA *et al.*, 2020), antiinflamatória (ALMEIDA-JUNIOR *et al.*, 2024), antimicrobiana (HOSSAIN *et al.*, 2022), antiparasitárias (SFORCIN *et al.*, 2012), as quais estão relacionadas, na maioria das vezes, com a composição química, influenciada pela flora local na qual as abelhas buscam o substrato para fazer a própolis (SFORCIN *et al.*, 2012).

A avaliação dos constituintes químicos da própolis e a caracterização de seu perfil químico apresentam desafios significativos, especialmente em um país como o Brasil, que abriga uma vastidão de biomas e, consequentemente, uma diversidade botânica (FRANCHIN *et al.*, 2024). A própolis verde, em particular, tem sido objeto de atenção devido à sua composição, onde se destacam os derivados prenilados do ácido *para*-cumárico, como artepilina C, bacarina, drupanina e capilartemisina (Substâncias 4, 1, 2, 5 e 6, respectivamente contidas na **Figura 53**) reconhecidos por suas propriedades terapêuticas (CONTIERI *et al.*, 2022; MOITA *et al.*, 2022; COSTA JR *et al.*, 2020; FIORINI *et al.*, 2021; CUI *et al.*, 2022), incluindo atividades cicatrizante, antioxidante e antitumorais (SIMANJUNTAK *et al.*, 2024; RANA & BAJWA, 2023). Estudos recentes reforçam a eficácia da apiterapia, apontando a artepilina C como promissora no combate ao câncer de próstata e ao câncer de mama (OTA *et al.*, 2023; MEIRELLES *et al.*, 2024; YAMAGA *et al.*, 2024; WANG *et al.*, 2024), enquanto a bacarina demonstrou ser promissora no combate à progressão tumoral (RODRIGUES, 2022; LI *et al.*, 2024; OLIVEIRA *et al.*, 2014; GASTALDELLO *et al.*, 2021; AKAO *et al.*, 2003).

Além das substâncias preniladas, também estão presentes na própolis (incluindo a própolis verde) os triterpenos pentacíclicos, classe de produtos naturais que apresenta potencialidades terapêuticas (SILVA *et al.*, 2005; KARDAR *et al.*, 2014; PUJIRAHAYU *et al.*, 2019; THANH *et al.*, 2021; EL-DAWY *et al.*, 2022). Como exemplo, pode ser citado o caso do lupeol, investigado por MITRA e colaboradores (2023) no combate ao câncer de mama triplo negativo. Alguns flavonoides, como aromadendrina-4-metil éter (SOUZA *et al.*, 2011; SIMÕES-AMBROSIO *et al.*, 2010), diidrocanferide, isosakuranetina, canferide (MARUYAMA *et al.*, 2009) e o betuletol também foram reconhecidos como potentes agentes antitumorais (RUBIO *et al.*, 2009). Derivados de lipídeos fenólicos também estão presentes na própolis verde, como misturas de ácidos anacárdicos, que tem se destacado por suas ações contra *Helicobacter pylori* (CASTILLO-JUÁREZ *et al.*, 2007; UMEHARA *et al.*, 2020; SAWAYA *et al.*, 2007).

Os produtos naturais consistem em uma vasta gama de compostos com diferentes polaridades, tornando o estudo de sua composição uma tarefa complexa. A separação completa de amostras de produtos naturais utilizando cromatografia unidimensional convencional é muitas vezes inviável. A cromatografia contracorrente multidimensional (MDCCC) é uma técnica poderosa que tem se tornado cada vez mais útil ou versátil para purificar misturas complexas de substâncias bioativas (LIN *et al.*, 2023). A MDCCC envolve a integração da CCC com outras técnicas analíticas, como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), espectrometria de massa (MS) e cromatografia gasosa (GC). Uma técnica multidimensional, na qual uma mistura específica é submetida a inúmeras processos cromatográficos, pode auxiliar na separação necessária dos constituintes da mistura. Isso inclui o uso de múltiplas colunas, otimização de sistemas de solventes ou técnicas de monitoramento *on-line* (MUHIRE *et al.*, 2024).

A cromatografia contracorrente (CCC) é uma técnica de separação amplamente utilizada na separação e purificação de produtos naturais porque o HSCCC oferece vantagens únicas, como nenhuma adsorção irreversível, alta taxa de recuperação de amostra, ampla capacidade preparativa, alta eficiência e processamento em larga escala (WANG *et al.*, 2024; RENAULT *et al.*, 2002; MELLO & LEITÃO, 2023). A fase estacionária líquida sem suporte sólido é retida por gravidade e forças centrífugas. Fundamenta-se na partição de um analito entre fases líquidas imiscíveis sem matrizes sólidas, utilizando sistemas de solventes bifásicos, o que facilita a análise de componentes de traço em extratos complexos de produtos naturais e um enriquecimento desses metabólitos vegetais bioativos sob condições não destrutivas (PAN & LU, 2007; KOSTANYAN *et al.*, 2020).

A escolha de um sistema de solvente adequado para a cromatografia contracorrente (CCC) é uma etapa fundamental na purificação de produtos naturais, conforme destacado por Friesen e Pauli (2005). O modelo GUESS (Método geral útil de estimativa de sistemas de solventes, do inglês, *Generally Useful Estimate of Solvent Systems*) oferece uma abordagem prática para a previsão dos valores de coeficientes de partição, K , de substâncias em sistemas bifásicos líquidos para utilização em CCC a partir da cromatografia em camada fina (CCD). Os autores enfatizam que a capacidade de separação da CCC é otimizada quando os valores de K variam entre 0,4 e 2,5, atendendo a critérios como sistematicidade, versatilidade, flexibilidade, eficiência temporal, adaptabilidade para ajustes finos e aplicabilidade a misturas de composições conhecidas e desconhecidas.

A variabilidade química da PVB apresenta significativos desafios para sua padronização e controle de qualidade, conforme destacado por KASOTE *et al.* (2022). Sendo assim, reconhecendo a complexidade e a variação da composição química da própolis, este estudo propõe uma abordagem fitoquímica voltada para a separação, isolamento e purificação de substâncias do extrato etanólico da própolis verde por cromatografia contracorrente multidimensional. O método de estimativa geralmente útil de sistemas de solventes (GUESS) aplicados a MDCCC para o estudo do extrato etanólico da própolis verde, foi baseado na CCD utilizando diferentes sistemas de solventes aquosos e não aquosos, e algumas das frações obtidas e enriquecidas com alguns compostos bioativos, foram testadas *in vitro* em modelos de câncer de mama.

6.2. Materiais e métodos

6.2.1. Solventes e Reagentes

Conforme descrito no item 4.2.1 da página 37.

6.2.2. Preparação dos extratos brutos da própolis verde

Conforme descrito no item 4.2.2 da página 37.

6.2.3. Equipamento de cromatografia contracorrente de alta velocidade

Conforme descrito no item 4.2.3 da página 38.

6.2.4. Seleção do sistema de solvente para fracionamento por HSCCC

A seleção do sistema de solvente apropriado para os fracionamentos da primeira corrida do extrato etanólico (CCC1) foram feitos pelo teste de partição em tubo de ensaio, onde o extrato etanólico de própolis verde (2 mg) foi dissolvida em diferentes sistemas de solvente (**Tabela 9 e 10**). A estimativa visual dos valores do coeficiente de partição (K) das substâncias alvo (artepilina C e baccarina) foi obtida pela aplicação de volumes iguais de cada fase lado a lado separadamente em placas de cromatografia em camada fina (CCD) de gel de sílica (Merck Art. 64271, Darmstadt,

Alemanha), eluída com o sistema de solvente hexano: acetona (70:30, v/v). Os resultados da CCD (**Figuras 47 e 49**) foram primeiramente visualizados sob luz UV ($\lambda = 254$ nm e 365 nm) e então pulverizados com reagente vanilina sulfúrica, seguido de aquecimento.

Tabela 9. Sistemas de solvente testados para o fracionamento do extrato etanólico de própolis verde por HSCCC (CCC1)

Experimento	Sistemas de solventes (SS)	Proporções dos solventes (v/v)
1	hexano-acetato de etila-metanol-água	1:2:2:1
2	hexano-acetato de etila-etanol-água	1:2:2:1
3	hexano-acetato de etila-etanol-água	1:1:1:1
4	hexano-acetato de etila-etanol-água	1:0,8:1:1

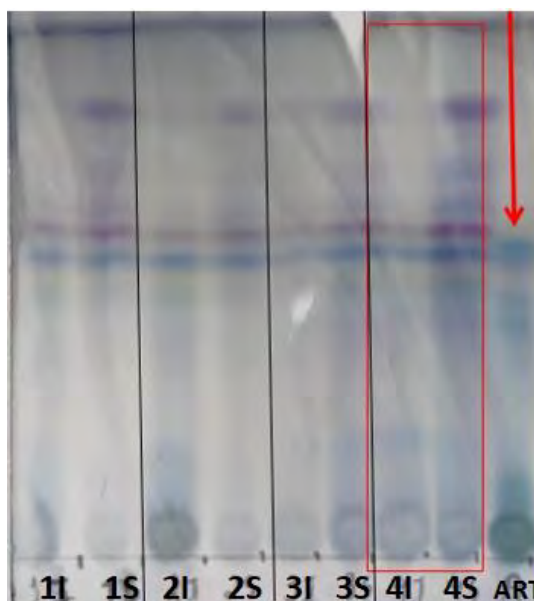


Figura 47-CCD da seleção do SS pelo teste de partição em tubo de ensaio para o fracionamento de EEPV por CCC1. Sistemas de solventes testados onde (S) significa fase superior e (I) significa fase inferior e a numeração de acordo com a Tabela 8. (ART) artepilina.

O sistema hexano- acetato de etila-etanol-água (1:0,8:1:1, experimento 4 da **Tabela 9**) foi selecionado após o resultado de CCD (**Figura 47**) e o valor de K calculado para artepilina C, no modo de eluição normal e reversa. Os valores de K foram calculados pela dissolução dos resíduos obtidos pela evaporação de cada uma das fases (fases superior e inferior) dos sistemas de solventes testados, em 1 mL de metanol e analisados por HPLC-PDA. valor de K foi expresso como a área do pico do composto na fase estacionária dividida pela área do pico do composto na fase móvel (CONWAY, 1990). O valor de K foi expresso em $K=0,86$ e obtido pela escolha da área do pico correspondente para artepilina C dentro do cromatograma do extrato de etanólico. Esse sistema de solvente utilizado no fracionamento unidimensional de EEPV foi denominado **CCC1** e os parâmetros ajustados, inicialmente, aumentando o carregamento da amostra de 107 mg (**CCC1.1**) para 301,30 mg (**CCC1.2**) e depois para 636,40 mg (**CCC1.3**) conforme **Tabela 11**.

Adicionalmente, na MDCCC foi utilizada uma segunda dimensão CCC x CCC nas frações apolares reunidas de CCC1 sendo denominado CCC2 e na purificação de algumas substâncias foram utilizadas CCC x Sephadex conforme ilustrado no **Esquema 48**.

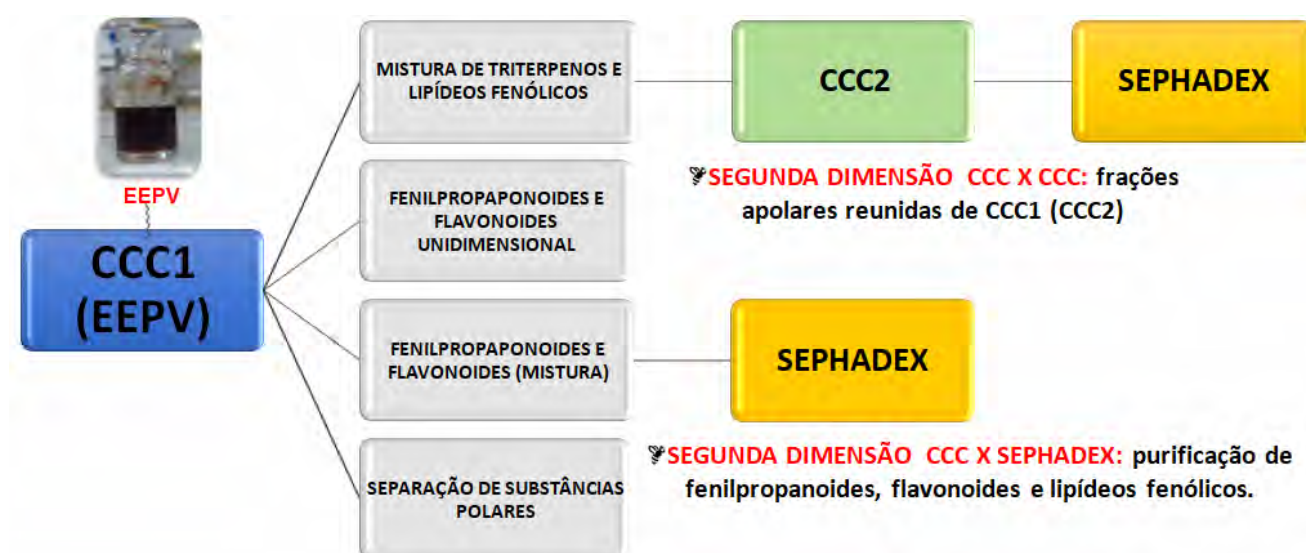


Figura 48-Ilustração do estudo fitoquímico de EEPV.

A seleção do sistema de solvente apropriado para os fracionamentos das substâncias apolares (**CCC2**) foram feitos pelo teste de partição em tubo de ensaio, onde as frações apolares reunidas (2 mg) foram dissolvidas em diferentes sistemas de solvente (**Tabela 10**). A estimativa visual dos valores do coeficiente de partição (*K*) das substâncias alvo (ácidos anacárdicos) foi obtida pela aplicação de volumes iguais de cada fase lado a lado separadamente em placas de cromatografia em camada fina (CCD) de gel de sílica (Merck Art. 64271, Darmstadt, Alemanha), eluída com o sistema de solvente hexano: acetona (70:30, v/v). Os resultados da CCD (**Figuras 49**) foram primeiramente visualizados sob luz UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$ e 365 nm) e então pulverizados com reagente vanilina sulfúrica, seguido de aquecimento.

Tabela 10. Sistemas de solvente testados para o fracionamento das frações apolares por HSCCC (**CCC2**)

Experimento	Sistema de solvente (SS)	Proporção de solvente (v/v)	FS/FI*	Referência
1	hexano- acetato de etila- etanol-água	1:1:1:1	70/30	d
2	hexano- acetato de etila- etanol- água	4:6:4:6	60/40	d
3	hexano- acetato de etila- acetonitrila	1:0,5:1	20/80	a
4	éter de petróleo-acetato de etila- etanol- água	1:1:1:0,8	40/60	b
5	éter de petróleo-acetato de etila- metanol- água	1:0,8:1,1:0,6	40/60	b
6	hexano- acetonitrila-metanol	1:1:0,5	20/80	a
7	hexano-acetato de etila-acetonitrila	1:0,1:1	30/70	a
8	hexano-clorofórmio-acetonitrila	1:0,1:1	30/70	c

FS/FI* - Proporção entre as fases superior (FS) e a fase inferior (FI)

^aMARQUES *et al.*, 2018; ^bZHAO *et al.*, 2019; ^cWANG *et al.*, 2020; ^dLUAN *et al.*, 2024

O sistema hexano-clorofórmio-acetonitrila (1:0,1:1, experimento 8 da **Tabela 10**) foi selecionado após o resultado de CCD (**Figura 49**) e o valor de *K* avaliado visualmente pela distribuição do ácido anacárdico entre as fase superior (S) e inferior (I).

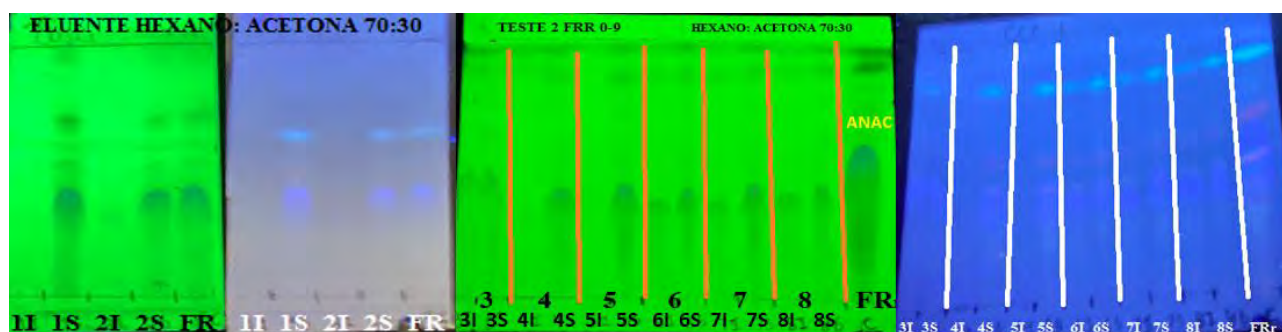


Figura 49-CCD da seleção do SS pelo teste de partição em tubo de ensaio para o fracionamento HSCCC de EEPV. Sistemas de solventes testados onde (S) significa fase superior e (I) significa fase inferior e numeração de acordo com a **Tabela 10**. (ANAC) mistura de ácidos anacárdicos.

6.2.5. Procedimento de separação por HSCCC

Os sistemas de solventes escolhidos (**Tabelas 9 e 10**) foram usados misturando-se proporções apropriadas de solventes em um funil de separação e após o equilíbrio as fases foram separadas e degaseificadas por sonicação por 10 min antes do fracionamento por CCC ser executado. A coluna foi primeiro preenchida inteiramente com a fase estacionária sem rotação e então a fase móvel foi bombeada com uma rotação de 860 rpm (Quattro HT-Prep) até que o equilíbrio das duas fases fosse atingido. EEPV (**CCC1**, **CCC1.2** e **CCC1.3**) e as frações apolares (**CCC2**), dissolvidos em 5 mL do sistema de solventes selecionados (1:1, v/v, **Tabelas 9 e 10**) foram então introduzidos na coluna através de uma válvula de injeção de amostra manual de 6 vias, usando uma alça de injeção de amostra de 5 mL. O fracionamento CCC1 foi realizado no modo de eluição normal e o fracionamento CCC2 foi realizado no modo de eluição reverso (cabeça-cauda, modo de eluição reverso, com a fase aquosa inferior como fase móvel) com vazão de fase móvel de 2,0 mL.min⁻¹. Todas as frações de 4 mL foram coletadas e analisadas por cromatografia em camada fina (CCD) seguida de visualização sob luz UV (254 e 365 nm) e então pulverizadas com reagente de vanilina- sulfúrica. Os parâmetros analíticos estão descritos nas **Tabelas 11 e 12**. Todos os fracionamentos foram realizados no modo operacional de eluição-extrusão. Todas as frações foram evaporadas até a secura (SpeedVac SPD 121P, Refrigerator Vapor Trap RVT400, Thermo Savant, EUA) e transferidas para frascos pesados.

Tabela 11. Parâmetros analíticos para fracionamentos de EEPV (**CCC1**) em modo de eluição normal em HTprep (coluna 112mL) com fluxo 2mL.min⁻¹ e recolhimento de 4mL por tubo

Injeção	Extrato	Sistema de solvente	Proporção de solvente (v/v)	Quantidade (mg)	Extrusão	Sf (%) ^b
CCC1.1	EEPV	HEEWAT ^a	(1:18:1:1)	107,00	50	80,83
CCC1.2	EEPV	HEEWAT ^a	(1:0.8:1:1)	301,30	56	91,07
CCC1.3	EEPV	HEEWAT ^a	(1:0.8:1:1)	636,40	56	90,60

^aHexano-acetato de etila-etanol-água ^b Retenção da fase estacionária na coluna

O sistema de solvente escolhido (**Tabelas 9**) foi utilizado conforme parâmetro supracitados. As frações apolares (**CCC2**) foram obtidas através da reunião das frações provenientes do fracionamento de EEPV (**Tabela 12**). As frações da corrida **CCC1.2** FR 18_21 e as frações da corrida **CCC1.33** FR 10_15 foram reunidas (230,50mg) e dissolvidas em 5 mL do sistema de solvente

selecionado (1:1, v/v, **Tabelas 10**) foram então introduzidos na coluna através de uma válvula de injeção de amostra manual de 6 vias, usando uma alça de injeção de amostra de 5 mL. O fracionamento CCC2 foi realizado no modo de eluição reverso (cabeça-cauda, modo de eluição reverso, com a fase aquosa inferior como fase móvel) com vazão de fase móvel de 2,0 mL.min⁻¹. Todas as frações de 4 mL foram coletadas e analisadas por cromatografia em camada fina (CCD) seguida de visualização sob luz UV (254 e 365 nm) e então pulverizadas com reagente de vanilina-sulfúrica. Os parâmetros analíticos estão descritos nas **Tabelas 12**. Todos os fracionamentos foram realizados no modo operacional de eluição-extrusão. Todas as frações foram evaporadas até a secagem (SpeedVac SPD 121P, Refrigerator Vapor Trap RVT400, Thermo Savant, EUA) e transferidas para frascos pesados.

Tabela 12. Parâmetros analíticos para fracionamentos das frações apolares obtidas de CCC1 (CCC2) em modo de eluição normal no equipamento HTprep (coluna 112mL) com fluxo 2mL.min⁻¹ e recolhimento de 4mL por tubo

Injeção	Amostra	Sistema de solvente	Proporção de solvente (v/v)	Quantidade (mg)	Extrusão	Sf (%) ^b
CCC2	CCC1.2 FR 18_21+ CCC1.33 FR 10_15	Hex ^a : CHCl ₃ :ACN	(10:0,1:1)	230,50	60	88,90

^aHex- hexano ^b Retenção da fase estacionária na coluna

6.2.6. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-PDA)

Os extratos e as frações obtidas por HSCCC foram avaliadas conforme descrito no item 4.2.7 da página 41. Adicionalmente, os perfis cromatográficos para análise dos ácidos anacárdicos foram avaliados em um cromatógrafo líquido Prominence Shimadzu série LC-20A equipado com uma bomba (LC-20AT), desgaseificador *on-line* (DGU-20A), forno de coluna (CTO-20A), amostrador automático (SIL-20AC) e detector PDA (SPD-M20A). A aquisição de dados foi processada pelo software LCSolution (versão 1.24, Shimadzu, Kyoto, Japão). As análises foram realizadas em uma coluna de fase reversa C18 (250 mm x 4,6 mm I.D. x 5 µm, LichroCART Merck), mantida a 35 °C. A fase móvel utilizada foi água acidificada com 1% de ácido acético (solvente A) e acetonitrila acidificada com 1% de ácido acético (solvente B), com vazão constante de 1,5 mL.min⁻¹ e volume de amostra injetado de 10 µL. O gradiente iniciou com 90% de solvente B, mantendo em 90% de B até 5,8 min, depois 93% de B em 8 min, 95% de B em 10 min, 100% de B em 11 min, 100% de B em 24 min, retornando para 90% de B após 24 min. As amostras (2 mg.mL⁻¹) foram dissolvidas em acetonitrila de grau espectroscópico, e a solução foi filtrada através de um filtro (13 mm x 0,45 µm, PVDF, Analítica).

6.2.7. Análise LC-ESI-MS/MS

As análises foram realizadas em um equipamento LC-PDA_QTOF/MS (LC Agilent 1290 Infinity II) configurado com espectrômetro de massa quadrupolo de tempo de voo (QTOF) da Agilent 6530 (Agilent, Santa Clara, CA, EUA) equipado com coluna C18 (50mm x 2,1 mm x 1.8µm, Zorbax extend, Agilent). As amostras (10 µL) foram analisadas a 40°C com um fluxo de 0,35 mL.min⁻¹. A fase móvel foi solução aquosa com 0,1% de ácido fórmico e 5mM formiato de amônio (A) e metanol com 0,1% de ácido fórmico e 5mM formiato de amônio (B). O programa de gradiente iniciado até 1 min com 35% B, depois de 35-80% B (1-20 min), 80–85% B (20–25 min), 85–90% B (25–30 min), 90%–95 B (30-35 min), 95%–100% B (35-38 min) 100% B por 7 min e, seguido por um reequilíbrio da coluna de 5 minutos. O comprimento de onda no PDA foi 254 e 360 nm. Os experimentos de MS foram realizados com fonte de ionização por spray eletrônico (ESI) no modo positivo ou/e negativo

com as seguintes condições de operação: vazão de gás (N₂) em 12 L.min⁻¹; temperatura do gás em 300°C; nebulizador 38 psi; tensão capilar 3500V; voltagem do fragmentador em 120V. O modo de varredura completa do MS foi monitorado na faixa de massa de 100 a 800 *m/z*. Posteriormente, um experimento MS/MS foi realizado e os parâmetros definidos da seguinte forma: taxa de aquisição do espectro MS de 4 espectros/s e energia de colisão de 10, 20, 40 e 60 V. Todas as operações, aquisição e análise de dados foram realizadas no software *Mass-Hunter* acquisition versão 11.0.

6.2.8. Cromatografia de permeação em gel (CPG)

Cerca de 100g de fase estacionária (Sephadex LH-20, Sigma-Aldrich) foi mantida em metanol e após a transferência do adsorvente para a coluna (82 cm × 3 cm), as frações obtidas do fracionamento de EEPV (CCC1.2 FR 35-47, 40 mg) e a mistura de ácidos anacárdico (46,80 mg) proveniente do CCC2 foram dissolvidas em 5ml metanol, e aplicada no topo da coluna cromatográfica. A eluição foi realizada inicialmente no modo isocrático, com metanol:clorofórmio (75:25, v/v), em um fluxo de 3,5 ml/min, para a separação dos derivados fenilpropanoides e flavonoides. Para os derivados de ácido anacárdico, a separação se deu com uma mistura de CH₂Cl₂:acetona (3:2). O eluato resultante foi coletado manualmente em frascos de vidro (6 ml), sendo coletadas frações com 3 ml cada que foram monitoradas por CCD e reunidas conforme semelhança (fator de retenção, R_f), evaporadas em rota evaporador (Buchi, r-210, EUA) e transferidas para frascos pesados.

6.2.9. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)

Conforme descrito no item 4.2.6 da página 41.

6.2.10. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Conforme descrito no item 4.2.8 da página 41.

6.2.11. Ensaio de viabilidade celular por redução de MTT dos extratos de própolis brasileira e substâncias isoladas dos fracionamentos em CCC

Os ensaios foram realizados pela doutoranda Raissa Eduardo dos Santos em colaboração com a Profa Luciana Pereira Rangel (Faculdade de Farmácia, UFRJ). As células MCF-7 (câncer de mama luminal) e MDA-MB-231 (câncer de mama triplo negativo) foram semeadas em placas de 96 poços para aderência por 24h até atingir 70% - 90% de confluência. As células foram tratadas com 100 µg/mL com o extrato hexânico de própolis verde (EHPV), extrato etanólico de própolis verde (EEPV), betuletol, canferide, ácido anacárdico 17:1, ácido anacárdico 19:1, culifolina, bacarina, artepilina C, mistura triterpênica dos ácidos ambônicos e mangiferônicos, drupanina, aromadendrina metil éter, capillatersina e ácido *p*-cumárico. Após 72 horas de tratamento, 30 µL de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) a 0,5 mg/mL, diluído em PBS, foram adicionados e as placas foram incubadas em uma incubadora a 37°C e 5% de CO₂ por 2h. Os cristais de formazano formados foram solubilizados em 100 µL de DMSO e as placas foram analisadas com um leitor de microplacas multimodo SpectraMax Paradigm (Molecular Devices) a 570 e 650 nm.

6.3. Resultados e Discussão

6.3.1. Separação dos metabólitos especiais do extrato etanólico de própolis por CCC1 com sistemas aquosos

O fracionamento da própolis verde envolve diversas etapas, muitas das quais utilizam a técnica de fase reversa-HPLC semipreparativa ou preparativa, conhecida por sua eficiência para o isolamento de substâncias com alta pureza. Contudo, o tempo e os custos elevados associados à operação, incluindo a compra de solventes graus espectroscópicos e as perdas por adsorção, frequentemente tornam esses métodos tradicionais uma solução pouco atrativa.

Em CCC, os sistemas de solventes quaternários hexano-acetato de etila-etanol-água (HEEWat) e hexano-acetato de etila-metanol-água (HEMWat) têm demonstrado eficiência no fracionamento de substâncias com polaridade média a moderada. A polaridade destes sistemas pode ser ajustada por meio da variação nas proporções dos componentes dos solventes (LUAN *et al.*, 2024). Diante da riqueza em substâncias com essas características (**Figura 50**), o extrato etanólico de própolis verde foi alvo de investigação utilizando a cromatografia contracorrente, visando aprofundar o estudo fitoquímico desta matriz complexa.

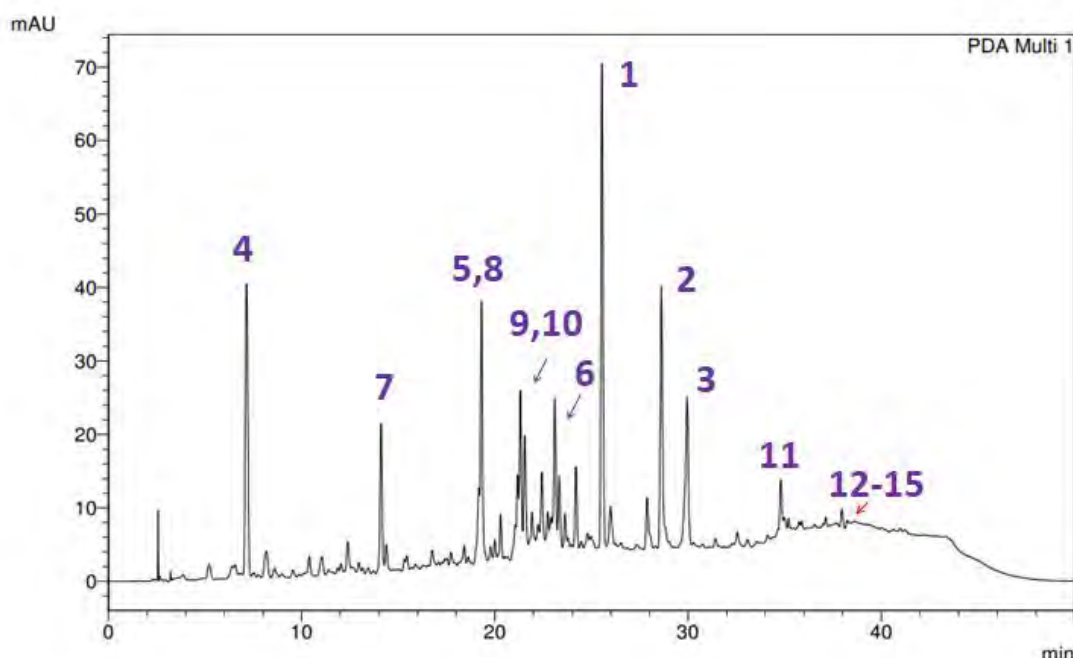


Figura 50- Perfil cromatográfico por HPLC-PDA (280 nm) em fase reversa do EEPV. Substâncias: 1: artepilina C, 2: bacarina, 3: culifolina, 4: ácido *para*-cumárico, 5: drupanina, 6: capilartemisina A/B, 7: aromadendrina-4-metil éter, 8: isosakuranetina, 9: betuletol, 10: canferide, 11: mistura triterpênica dos ácidos ambônico e mangiferônico e 12 a 15: derivados de ácido anacárdico

Comparando-se visualmente por CCD a distribuição das substâncias-alvo de EEPV nos sistemas 1 a 4 (**Tabela 9**), observou-se que ambos deram valores de K semelhantes (próximo do valor de $K = 1$) ($0,5 < K < 2,5$) (BERTHOD *et al.*, 2016), significando uma purificação com pelo menos um volume de coluna ($K=1$) da artepilina C. Pode-se observar pelos dados da **Figura 47** que as substância com R_f próximo da artepilina C (1) estão bem distribuídas em ambas as fases mas a mancha roxa típica de mistura de triterpenos ácidos (ácido ambônico e mangiferônico) estão mais retidas na fase estacionária (SANTOS *et al.*, 2024).

O sistema com metanol, conforme evidenciado na **Tabela 9 (linha 1)**, apresentou um tempo de decantação superior a 30 segundos causando a formação de um precipitado (provavelmente ceras) durante a solubilização da amostra, não atendendo a alguns requisitos básicos descritos na literatura para seleção de sistemas de solventes (SANTOS *et al.*, 2024), sendo, portanto, excluídos como uma

opção para o fracionamento de EEPV. Em contrapartida, os sistemas que utilizaram etanol, descritos na **Tabela 9 (linhas 2 a 4)**, demonstraram uma rápida separação entre as fases do sistema bifásico imiscível. Notadamente, o sistema com etanol, no qual a presença de acetato de etila foi reduzida (sistema 4), resultou em uma distribuição da artemilina C otimizada, o que levou à sua escolha para o fracionamento de EEPV por CCC

Com base nesses resultados, o sistema hexano-acetato de etila-etanol-água (1:0,8:1:1, v/v) foi selecionado para o fracionamento de EEPV no modo de eluição-extrusão em modo normal, onde o valor do K para a artemilina C foi 0,86. O recolhimento de 4ml por tubo indicaria teoricamente que a saída da artemilina C ocorreria a partir do tubo 28 com o uso da coluna de 112mL ($K=1$; $V_C=112$ mL) fato este confirmado na prática.

A purificação do extrato bruto de própolis verde (EEPV) por CCC sem qualquer tipo de pré-tratamento para injeção da amostra foi feita em primeira dimensão e foi realizada em **CCC1.1** com HEEWat e posterior escalonamento com maior carregamento de amostra **CCC1.2** e **CCC1.3**. Após o fracionamento **CCC1.1** (107 mg) a avaliação dos resultados da CCD (**Figura 51**) demonstraram que a mistura triterpênica (ácido ambônico e mangiferônico), já descrita por Santos e colaboradores (2024), foi eluída nas frações iniciais da corrida (frações de 9 a 10 com 11,50 mg) e comparadas com as substâncias isoladas e identificadas no fracionamento de EHPV (SANTOS *et al.*, 2024).

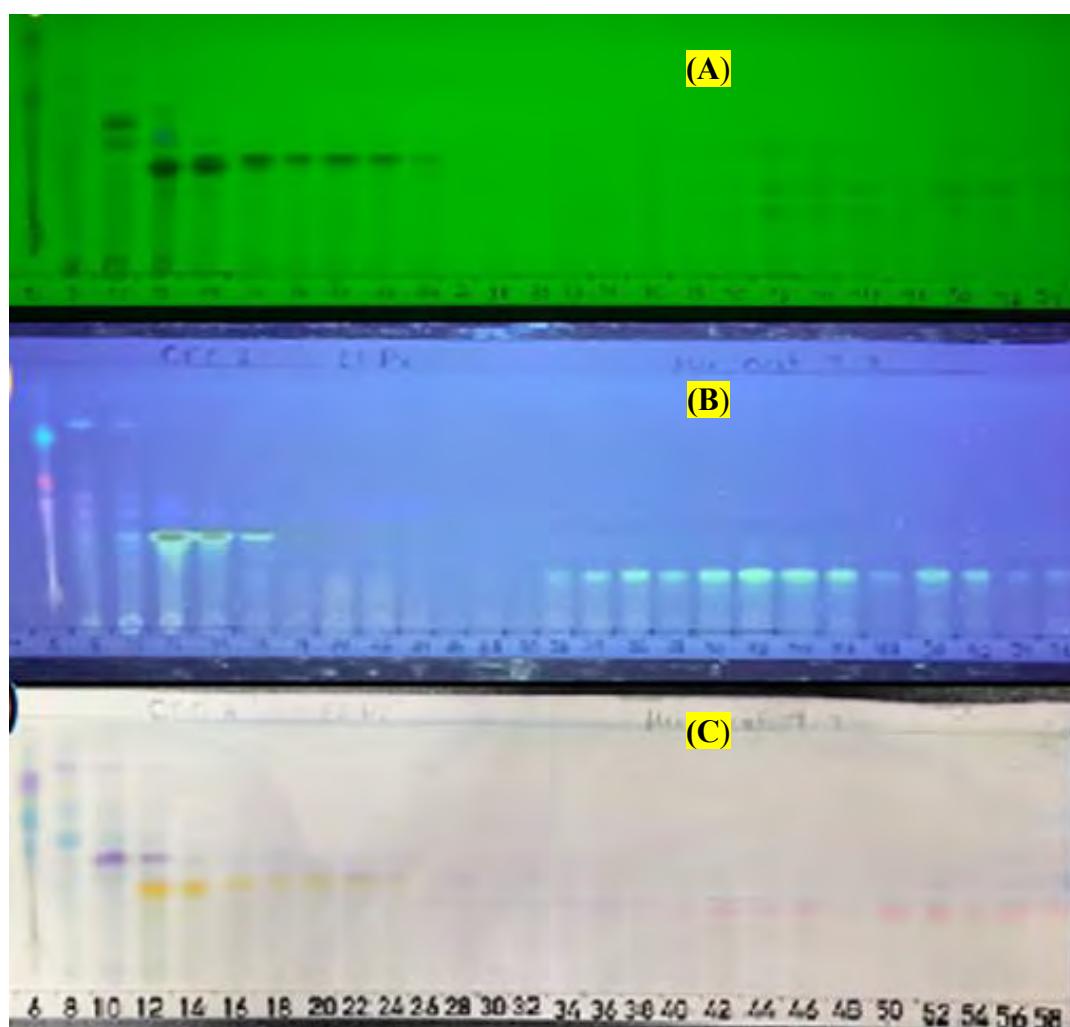


Figura 51- (A-C) Visualização dos resultados do fracionamento **CCC1.1** por CCD (gel de sílica F254). (A). CCD visualizada sob luz UV ($\lambda = 254$ nm). (B) CCD visualizada sob luz UV ($\lambda = 365$ nm). (C) Placas pulverizadas com reagente vanilina-sulfúrica.

As frações reunidas 13 a 23 possuíam uma coloração amarelada e foram reveladas com uma solução de N-PEG, (difenilboriloxietilamina a 1,0% em metanol, seguida de uma solução de polietilenoglicol 4000 a 5,0% em etanol), permitindo a detecção de flavonoides nessas frações (WAGNER & BLADT, 2001). A fração 32-57 (1,5 mg), cuja fluorescência é observada sob luz UV a 365 nm sem a utilização de reveladores, foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção por arranjo de diodos (HPLC-PDA), resultando em uma pureza cromatográfica de 71% com absorção a 290 nm. A referida fração foi comparada com um padrão de hesperidina, utilizando HPLC-PDA, o que evidenciou que não se tratava do mesmo flavonoide. Devido à quantidade reduzida de massa nas frações reunidas obtidas em CCC1.1, não foi possível identificar as substâncias presentes nesse fracionamento. Assim, foi necessário realizar um escalonamento com aproximadamente o triplo da massa injetada (CCC1.2, 301,30 mg), mantendo-se as mesmas condições de análise.

O fracionamento em escala do EEPV foi realizado com parâmetros CCC1.1 ajustados (**Tabela 11**), inicialmente, aumentando a quantidade de amostra a ser injetada 107 mg (CCC1.1) para 303,30 mg (CCC 1.2) e depois para 636, 40 mg (CCC1.3), em mesma coluna (112 mL, 2,0 mm de diâmetro interno no equipamento HTprep) e mesma vazão de 2,0 mL.min⁻¹. Conforme afirmado por Wood e colaboradores (2007), uma separação eficaz deve ser avaliada com base em três critérios fundamentais: pureza, rendimento e tempo. Para otimizar a produtividade, é imprescindível processar quantidades maiores de amostra simultaneamente, garantindo purezas e cromatogramas consistentes. Essa abordagem não apenas agiliza o procedimento analítico, mas também assegura resultados mais robustos e confiáveis. Valores mais altos de *Sf* foram obtidos (**Tabela 11**), no maior carregamento de amostra sendo o *Sf* aproximadamente 80% (CCC1.1) e *Sf* aproximadamente 91% escalonado (CCC 1.2 e CCC 1.3). Os resultados obtidos com a metodologia aplicada ao fracionamento de EEPV em CCC1.2 e CCC1.3 foram os mais eficientes para a purificação de fenilpropanoides, purificando diversas substâncias artepilina C (39,80 mg) obtida com 75% de pureza por HPLC-PDA, ácido *para*-cumárico (12mg) isolado com 85% de pureza por HPLC-PDA e a capilartemisina (ácido 4-hidroxi-3(*E*)-(4-hidroxi-3-metil-2-butenil)-5-prenil cinamico) com 72% de pureza por HPLC-PDA (12,80 mg) sem o uso de nenhuma outra técnica de purificação. Isso pode ser explicado em parte pela maior retenção da fase estacionária.

Os resultados obtidos por CCD do fracionamento CCC1.2 demonstraram uma separação eficaz dos componentes da própolis verde, incluindo fenilpropanoides, flavonoides e da mistura triterpênica, além da purificação de várias substâncias, conforme ilustrado na **Figura 52**. No total, foram coletados 157 tubos de 4 ml em cada fracionamento (CCC1.1, CCC1.2 e CCC1.3), evidenciando excelente reprodutibilidade. No fracionamento CCC1.2, 21 frações foram agrupadas com base na análise de CCD após a aplicação do reagente vanilina-sulfúrica. A artepilina C,1, biomarcador principal da própolis verde, começou a ser eluída nas frações apolares a partir do tubo 19, sendo reunida nas frações 25 a 30 (52,70mg) junto com bacarina,2, e o produto de degradação culifolina,3, apresentando pureza visual. A presença de uma intensa mancha azulada na CCD nas frações 63 a 67 (11,70mg) foi reunida e enviada para identificação por RMN e LCMS/MS. O ácido *para*-cumárico foi isolado com elevada pureza nas frações 85 a 98 (5,0mg).

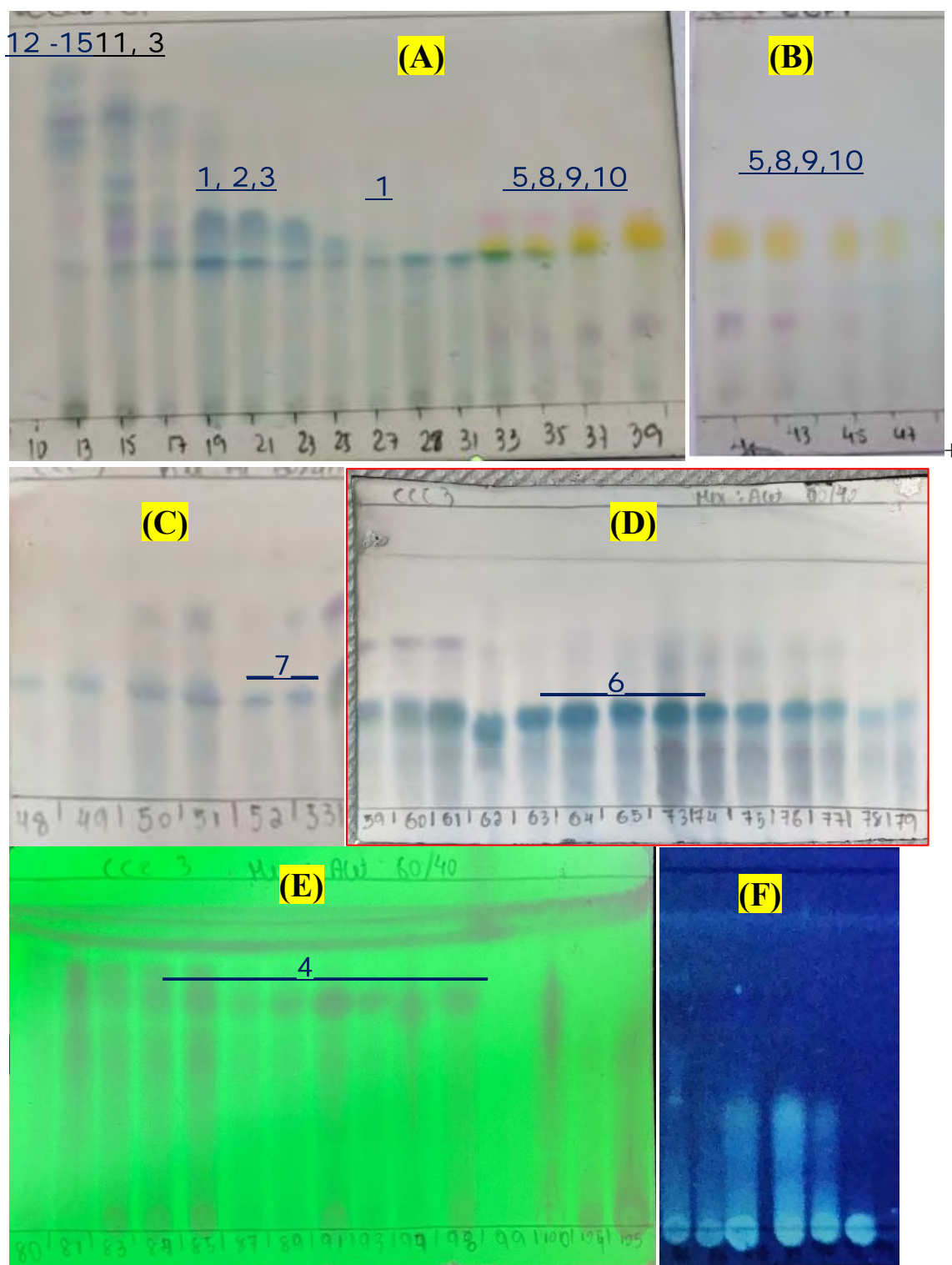


Figura 52- (A-D) Visualização dos resultados do fracionamento CCC1.2 por CCD (gel de sílica F254). Placas pulverizadas com reagente vanilina-sulfúrica. (E). CCD visualizada sob luz UV ($\lambda = 254$ nm). (F) CCD visualizada sob luz UV ($\lambda = 365$ nm). Substâncias: **1:** artepilina C, **2:** bacarina, **3:** culifolina, **4:** ácido *para*-cumárico, **5:** drupanina, **6:** capilartemisina A/B, **7:** aromadendrina-4-metil éter, **8:** isosakuranetina, **9:** betuletol, **10:** canferide, **11:** mistura triterpênica de ácidos ambônico e mangiferônico e **12 a 15:** derivados de ácido anacárdico.

Conforme relatado por Muhire e coautores (2024), os produtos naturais são compostos por uma diversidade de componentes de grande relevância. A complexidade dessas misturas torna inviável sua separação eficaz utilizando apenas a técnica de CCC unidimensional em um tempo

razoável. Entretanto, se uma técnica multidimensional for utilizada, onde uma mistura complexa é separada por uma dimensão inicial, frações menores dessa separação são reunidas. Cada fração é estudada individualmente; misturas complexas podem ser resolvidas relativamente rápido.

Nesse contexto, o fracionamento multidimensional MDCCC de EEPV (**Esquema 48**) foi realizado nas frações de 33 a 47 (43,30 mg) de CCC1.2. Essa fração foi previamente classificada no fracionamento CCC1.1 com o revelador NPPEG, constituíram uma mistura de flavonoides. O mesmo ocorreu com as frações iniciais de 11 a 17 (62 mg), que apresentavam uma composição de triterpenos pentacíclicos e derivados de lipídios fenólicos que necessitaram de uma segunda etapa de separação e purificação. O fracionamento por MDCCC foi realizado em duas dimensões: CCC x CCCC para a fração enriquecida com triterpenos pentacíclicos e CCC x Sephadex para a fração enriquecida com flavonoides, resultando em um eficiente isolamento de diversas substâncias. Na primeira dimensão, substâncias como artepilina **1**, bacarina **2**, culifolina **3**, capilartemisina A/B **6** e **6a**, aromadendrina-4-metil éter **7**, e o ácido *para*-cumárico **4**, foram obtidas com elevada pureza cromatográfica, enquanto, na segunda dimensão CCC x Sephadex, foram isoladas isosakuranetina **8**, betuletol **9**, canferide **10**, e drupanina **5**. Adicionalmente, os fracionamentos em CCC x CCCC possibilitaram a identificação de derivados de ácidos anacárdicos, **12 a 15**, como também da mistura triterpênica com ácido ambônico e mangiferônico, **11** e **11a** (**Figura 53**).

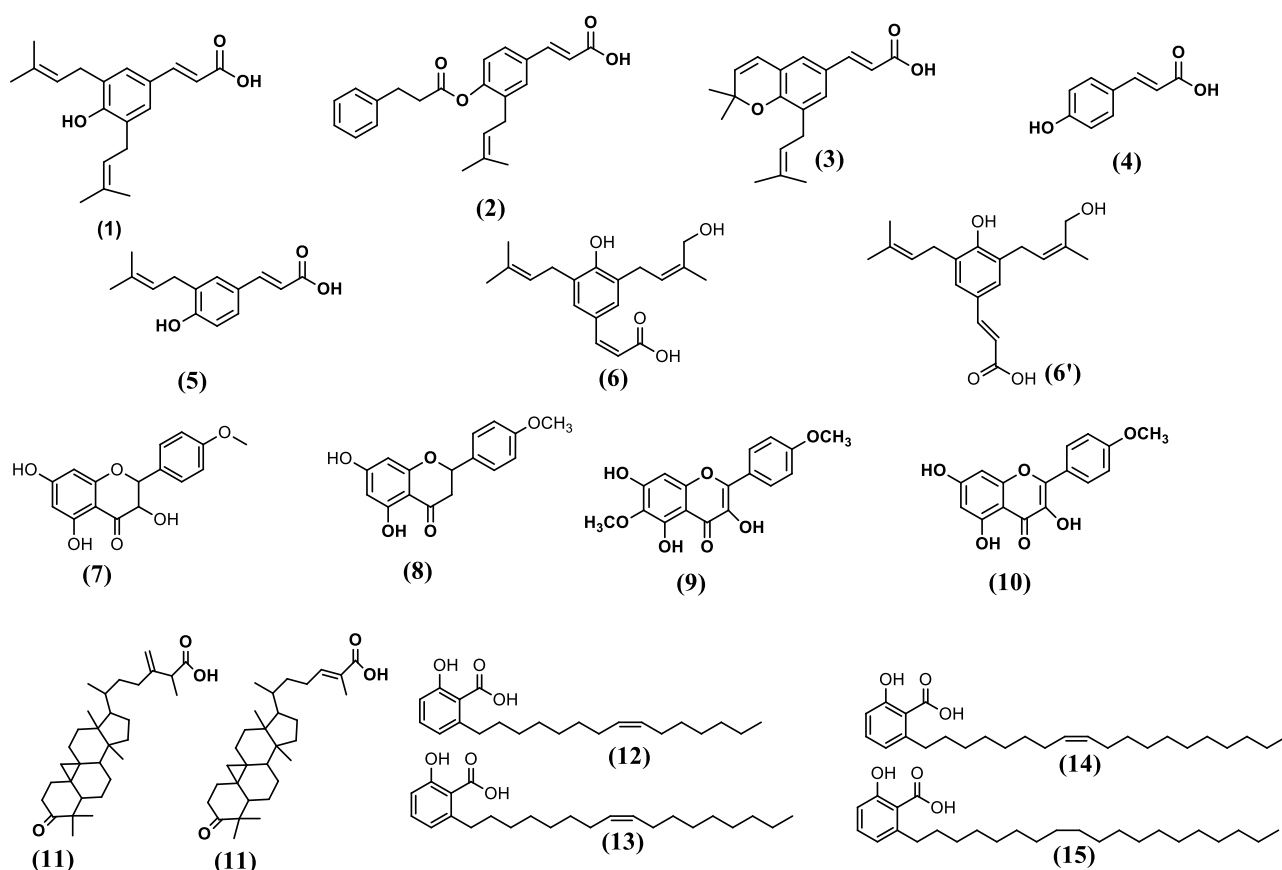


Figura 53- Estruturas das substâncias isoladas de EEPV por CCC com o sistema de solvente bifásico HEEWat. Substâncias **1**: artepilina C, **2**: bacarina, **3**: culifolina, **4**: ácido *para*-cumárico, **5**: drupanina, **6**: capilartemisina A, **6a**: capilartemisina B, **7**: aromadendrina-4-metil éter, **8**: isosakuranetina, **9**: betuletol, **10**: canferide, mistura triterpênica de **11**: ácido ambônico e **11a**: ácido mangiferônico e derivados de ácidos anacárdicos: **12**: ácidos anacárdicos 15:1; **13**: ácidos anacárdicos 17:1; **14**: ácidos anacárdicos 19:1 e **15**: ácidos anacárdicos 19:0.

O processo de MDCCC foi realizado por meio de uma segunda etapa de separação, que incorporou fracionamento por cromatografia contracorrente (CCC) e cromatografia em permeação em gel, utilizando Sephadex LH 20, conforme ilustrado no esquema da **Figura 48**.

6.3.2. Isolamento, purificação e identificação dos fenilpropanoides das frações obtidas em CCC1

Os derivados do ácido *para*-cumárico identificados como: artepilina **C,1**, bacarina, **2**, culifolina, **3**, ácido *para*-cumárico, **4**, capilartemisina A/B, **6 e 6a**, foram isolados diretamente do equipamento (unidimensional) em todas as corridas realizadas (CCC1.1, CCC1.2 e CCC1.3) (**Figura 53**). As substâncias **1 a 4** foram analisadas e identificados por HPLC-PDA, por meio da comparação de seus tempos de retenção e as curvas no UV com padrões autênticos disponíveis no laboratório. Os biomarcadores artepilina **C,1**, bacarina, **2**, e o produto de degradação culifolina, **3**, foram eluídos conjuntamente nas frações de 25 a 30 de CCC1.2, totalizando 52,70 mg (**Figura A12**). A artepilina **C** destacou-se, sendo obtida nos demais tubos com 75% de pureza por HPLC-PDA, totalizando 39,80 mg. O ácido *para*-cumárico foi isolado com 85% de pureza por HPLC-PDA (Frações 85 a 98, 12mg).

Segundo trabalho descrito por Jang e colaboradores (2015), a capilartemisina é um constituinte de *Artemisia capillaris*, conhecida como absinto, que pertence ao gênero *Artemisia*, englobando mais de 500 espécies. Neste trabalho os autores ressaltam a ação dessa substância no câncer de fígado e em cirrose hepática, sugerindo seu potencial uso para outras patologias tumorais. A mistura dos isômeros de capilartemisina (ácido 4-hidroxi-3(*E*)-(4-hidroxi-3-metil-2-butenil)-5-prenil cinâmico), foi obtida nas frações 62 a 72, totalizando 12,80 mg com 72% de pureza por HPLC-PDA (**Figura A13**). A identificação foi corroborada por RMN (**Figura A17 a A30, Tabela A2**) e LC-ESI-MS (**Figura A14 a A16**). Na **Tabela A2** estão listados os valores de deslocamentos químicos obtidos para os espectros de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) para a capilartemisina, em comparação com os dados relatados na literatura Ribnicky e colaboradores (2021) e Surek e coautores (2021).

De acordo com os δH obtidos para o espectro de ^1H RMN, foi possível a elucidação estrutural de capilartemisina ($\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_4$, **Figura A17 a A19**) e a presença dos seus isômeros *cis* (**6**) e *trans* (**6a**) foi confirmada por ressonância magnética de ^1H pelas constantes de acoplamento. Foi observada primeiramente a presença dos sinais característicos de sistemas cinâmicos *cis* H-7 e H-8 com 8,13 ppm (J 8,2 Hz) e 7,01 ppm (J 8,4 Hz), respectivamente, bem como sistemas cinâmicos *trans* H-7 e H-8 com 7,52 ppm (J 16 Hz) e 6,32 ppm (J 16 Hz), respectivamente, ambos apresentados como um dubleto. Esses deslocamentos representam respectivamente os hidrogênios olefinicos do sistema, sendo o maior deslocamento do hidrogênio beta-carboxila (H7 – mais desprotegido) e o menor deslocamento referente ao hidrogênio alfa-carboxila (H8 – mais protegido), valores relacionados ao efeito retirador por ressonância do grupo carboxílico alfa-beta insaturado. O simpleto mau resolvido observado a 7,21 ppm foi atribuído aos hidrogênios H2 e H6, o que caracteriza um sistema aromático tetrasubstituído e simétrico. Os deslocamentos encontrados em 1,65-1,70 ppm (4H' e 5H'') caracterizam dois simpletos de integração para 6 hidrogênios em cada sinal, sendo esses os hidrogênios metílicos característicos de grupos prenila. O deslocamento encontrado em 1,65ppm (5H') caracterizou um simpleto de hidrogênios metílicos e o deslocamento encontrado em 3,82ppm (4H'') caracterizou um simpleto dos hidrogênios metilênicos ligados à hidroxila.

Os deslocamentos químicos obtidos no espectro de ^{13}C RMN (DEPT-Q, **Figura A20 e A21**) indicaram a presença de seis carbonos quaternários (C3, C4, C5, C9, C3' e C3'') e a ausência do sinal de C-1, pouco intenso, foi devido ao tempo de relaxação necessário para esse tipo de núcleo gerar um sinal. Os carbonos quaternários foram utilizados para caracterizar o carbono do ácido carboxílico em 168,38 ppm (C9), além dos carbonos ipso no sistema aromático com deslocamentos em 129,28 ppm (C3) e 126,00 ppm (C5) e 155,13 (C4-OH). Ao carbono metilênico ligado ao grupo hidroxil foi atribuído o deslocamento em 66,74 ppm (C4') e aproximadamente no deslocamento de 28 ppm foram correspondente a C1' e C1''. Os carbonos olefinicos do sistema cinâmico foram confirmados pelos deslocamentos em 130 ppm (C7 em conformação *cis*) e 145,01 ppm (C7 em conformação *trans*) não

sendo encontrado diferenciação no deslocamento de C8 (115 ppm). Já aos carbonos C3' e C3'' foi atribuído o deslocamento em 136,08ppm e 132,27ppm respectivamente, o que caracteriza os carbonos quaternários presentes nos dois grupos prenila e nos grupos com hidroxil. Aos carbonos metílicos dos grupos prenila, foram atribuídos os deslocamentos presentes em 26 ppm (C4') e 18,18 ppm (C5''). Já o carbono metílico de C5' (14,10ppm) tem uma diferença entre os deslocamentos químicos que correspondem aos carbonos metílicos da prenila que nos indica que tais grupos estão em ambientes químicos diferentes.

A análise espectrométrica da fração enriquecida de capilartemisina, realizada por LC-ESI-MS (**Figura A14 a A16**), foi comparada com o banco de dados desenvolvido no *software* PDCL, permitindo confirmar a fórmula molecular $C_{19}H_{24}O_4$. A massa mono-isotópica da capilartemisina de m/z 316,1661 e a medida de massa desprotonada foi de m/z 315,1588 (diferença de 4.33 ppm.) O ESI(-)- MS/MS (**Figura A15**) do íon precursor revelou m/z 297, 285, 271, 253, 241, 198, 186 e 146 conforme evidenciado por Surek e colaboradores (2021), mostrando uma perda neutra inicial de 18 (H_2O). Uma outra substância eluída na mesma fração permitiu confirmar a fórmula molecular $C_{16}H_{12}O_7$. A massa mono-isotópica correspondeu com a rhamnetina de m/z 316,0583 e a medida de massa desprotonada foi de m/z 315,0510 (diferença de - 0,08 ppm). O ESI(-)- MS/MS do íon precursor (**Figura A16**) revelou m/z 287, 271, 255, 243, 223, 215 e 204 conforme evidenciado por Viera e pesquisadores (2023).

A visualização da placa de CCD (**Figura 52**) indicou que as frações de 73 a 79, totalizando 12,60 mg, apresentavam níveis elevados de rhamnetina (**Figura A31**), inviabilizando a combinação com a fração enriquecida de capilartemisina e comprometendo, assim, a pureza do composto prenilado. Esses resultados demonstram a eficiência da cromatografia contracorrente (CCC) na separação de fenilpropanoides.

Adicionalmente, o fracionamento em segunda dimensão CCCxSephadex foi realizado em 40 mg das frações reunidas de coloração amarelada do CCC1.2. A fração 35-47 (**Figura 52**) foi submetida à cromatografia em Sephadex LH-20, utilizando a mistura de solventes Metanol: $CHCl_3$ (75:25, v/v), resultando na obtenção de 4 mg de drupanina com 70% de pureza (**Figura 54**), a qual foi comparada com padrões disponíveis no laboratório (**Figura A32**), corroborando a eficácia da cromatografia de permeação em gel (GPC) com HSCCC a partir de matrizes complexas (SEGER *et al.*, 2006).

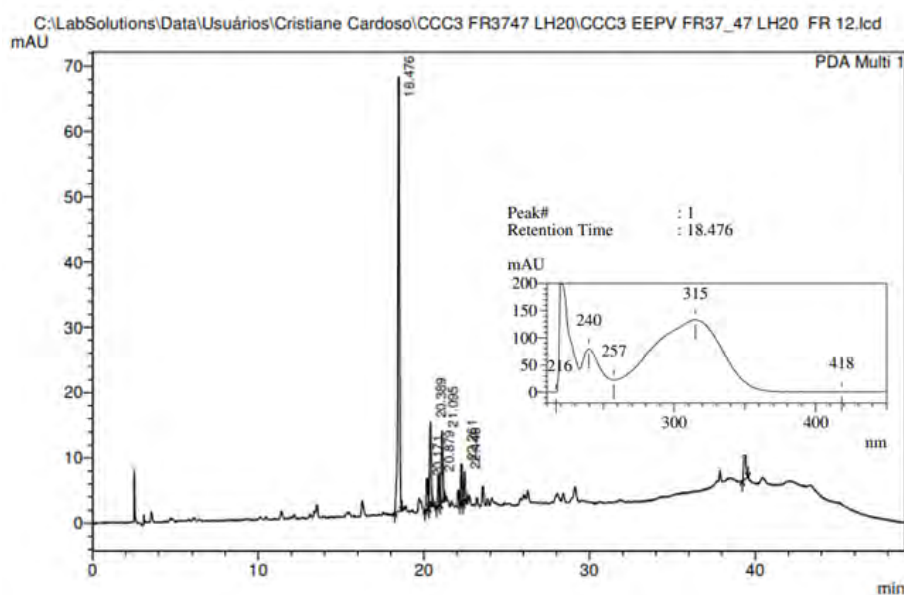


Figura 54-Perfil Cromatográfico por HPLC-PDA (280nm) em fase reversa da drupanina

Os resultados preliminares das frações polares obtidas nos tubos de 100 a 157 do fracionamento de CCC1.2 foram analisadas por HPLC-PDA revelando a presença de substâncias

como ácidos cafeico e ácidos cafeoilquínicos, comuns na própolis verde, cuja comparação foi realizada com padrões disponíveis no laboratório.

6.3.3. Separação, isolamento e identificação de flavonoides das frações obtidas em CCC1

A mistura dos flavonoides aromadendrina-4'-ó-éter metílico e diidrocanferide, **7**, obtido na fração 54-57 de CCC1.2 (**Figura A33**) foi isolado por CCC unidimensional (**Figura A37**), enquanto os demais flavonóides (**8 a 10**) foram separados com eficiência através de uma coluna de filtração em gel em modo isocrático por MDCCC. As substâncias isosakuranetina (**8**) e canferide (**10**) foram identificados por meio da comparação com padrões autênticos comerciais (Sigma-Aldrich), que permitiu identificar os flavonoides pela similaridade do tempo de retenção e da curva de absorção no UV além da confirmação por LC-ESI_QTOF. Os flavonoides aromadendrina-4-éter metílico, **7**, e betuletol, **9**, foram identificados por RMN (**Figura A34 a A40 e Tabela A3 para composto 7; Figura A51 e A52 e Tabela A4 para composto 9**) e LC-ESI_QTOF (**Figura A41 e A42 para composto 7**), em conformidade com a literatura de Ribnicky e pesquisadores (2021) e Surek e colaboradores (2021).

O uso de CCC unidimensional para o isolamento do composto **7** demonstrou ser eficaz, possibilitando a obtenção dos isômeros diidrocanferide e aromadendrina-4-metil éter (AME) com uma pureza de 60%, conforme evidenciado pelos dados de HPLC-PDA (**Figura A33**). A caracterização dos isômeros foi realizada por espectrometria de massas de alta resolução (LC-QTOF) (**Figura A41 e A42**) e ressonância magnética nuclear (RMN) (**Figura A34 a A40 e Tabela A3**).

O espectro de RMN de ^1H (**Figura A35**) do flavonol, **7**, mostrou sinais de seis prótons aromáticos, incluindo um sistema A_2B_2 [δH 6.97ppm (2H, d, $J = 8.8$, H-3'e 5'), δH 7.44 ppm (2H, d, $J = 8.8$, H-2'e 6')] e dois dupletos com acoplamento meta em δH 5.87 ($J = 4.0$, H-6) e δH 5.92 ($J = 2.2$, H-8) típico de flavonóides com anel "A" substituídos nas posições 5 e 7, ou seja, flavonoides 5, 7-di-hidroxi. O grupo hidroxila quelado intramolecular em δH 11.90 (OH-5) confirma a substituição na posição 5 e o singlete do grupo metoxi em δH 3.77 (OCH_3 -4') confirma a posição no anel B. Os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento spin-spin de prótons nas posições H-2 e H-3 são indicativos de posições *trans* e *cis* dos prótons H-2 e H-3 e, portanto, sugerem estruturas com diferença em centros assimétricos (2*S*,3*R*)-diidrocanferide e (2*S*,3*S*)-aromadendrina-4-metil éter. AME apresentou δH 5.87 ($J = 4.3$, H-3) enquanto (2*S*,3*R*)-diidrocanferide δH 5.11 ($J = 11.3$, H-3) e na região de hidrogênios alifáticos em δH 4.61 (dd: 11,5 Hz) para H-2 para o anel C. O espectro de RMN em COSY (**Figura A37**) mostra o acoplamento entre H-2*S* e H3*R* (diidrocanferide) como também entre o acoplamento entre H-2*S* e H3*S* (aromadendrina-4-éter metílico).

A análise espectrométrica da fração enriquecida de (2*S*,3*R*)-diidrocanferide e (2*S*,3*S*)-aromadendrina-4-metil éter, realizada por LC-ESI-MS (**Figura A41 e A42**), foi comparada com o banco de dados desenvolvido no *software* PDCL, permitindo confirmar a a formula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_6$. A massa mono-isotópica de (2*S*,3*R*)-diidrocanferide e (2*S*,3*S*)-aromadendrina-4-metil éter foi de 302,0790 e a medida de massa desprotonada foi de m/z 301,0724 (diferença de 2,11 ppm). O ESI(-) MS/MS do íon precursor revelou m/z 283, 268, 240, 227, 212, 176, 152 (**Figura A42**) conforme evidenciado por Surek e colaboradores (2021) confirma a aromadendrina-4-metil éter.

A fração 35-47 de CCC1.2 (40 mg) foi submetida à cromatografia em Sephadex LH-20, seguindo as mesmas condições utilizadas anteriormente para a separação da drupanina (fração 10-12), resultando em um total de 33 frações. Dessas frações, foi obtida um fração amarelada nos frascos reunidos 13 a 15, contendo 4 mg, foi identificada como isosakuranetina (70% pureza por HPLC-PDA, **Figura A43**). Após comparação com padrão comercial de sakuranetina disponível no laboratório (**Figura A44**) aplicado na técnica de HPLC-PDA, foi observado o mesmo tempo de retenção e curva que a fração enriquecida (**Figura A44**). No entanto, ao avaliar o padrão comercial foi observado um perfil de fragmentação em MS/MS diferente da análise espectrométrica da fração enriquecida, realizada por LC-ESI-MS (**Figura A45 e A46**). Essa análise foi comparada com o banco de dados desenvolvido no *software* PDCL, permitindo confirmar a a formula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$ podendo ser sakuranetina ou isosakuranetina. A própolis verde possui diversas substâncias isôbaras que podem

eluir juntas, o que destaca a necessidade de uma investigação mais aprofundada utilizando técnicas cromatográficas adicionais além da HPLC-PDA. A massa mono-isotópica foi de 286,0841 e a medida de massa desprotonada foi de m/z 285,0734 (diferença de -12,05 ppm). O ESI(-)-MS/MS do íon precursor revelou m/z 164,151,136,108 (**Figura A46**) conforme evidenciado por Surek e colaboradores (2021) confirmou a isosakuranetina.

Cristais amarelos (**Figura 55**) obtidos das frações 17-21 (10,1 mg) foram identificados como betuletol (3,5,7-trihidroxi-6,4'-dimetoxiflavona) com 93% de pureza, conforme RMN (**Figura A49 a A52**) e HPLC-PDA (**Figura A53**). O betuletol, já isolado do extrato etanólico da própolis verde (SHAHA *et al.*, 2022; HATTORI *et al.*, 2011), é destacado em estudos como um potencial agente antitumoral (RUBIO *et al.*, 2006). Adicionalmente, o sólido amarelo amorfo (6 mg) com 87% de pureza nas frações 22 a 30 (**Figura A47, A48 e A54, Tabela A4**) foi identificado como canferide (3,5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona) e eluiu no mesmo tempo de retenção que o betuletol (**Figura A47**) porém com curva de UV discretamente diferentes conforme relatado por Maruyama e colaboradores (2009).



Figura 55-Betuletol isolado da combinação das técnicas cromatográficas: HSCCC e GPC

A comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 3 com aqueles obtidos para betuletol e canferide mostrou que os anéis B e C são idênticos para as duas substâncias, diferindo apenas quanto ao padrão de substituição do anel A. O espectro de RMN de ^1H do betuletol e da canferide (**Figura A50 e A54 e Tabela A4**) mostrou, para o anel B, sinais típicos de um sistema AA'BB' para betuletol com $\delta\text{H} 7,13$ (2H, d, H-3'e 5') e $\delta\text{H} 8,13$ (2H, d, H-2'e 6'), além de, $\delta\text{H} 7,17$ (2H, d, H-3'e 5') e $\delta\text{H} 8,24$ (2H, d, H-2'e 6') para canferide, além da presença de um singlete do grupo metoxi em $\delta\text{H} 3,84$ (OCH_3 -4') e $\delta\text{H} 3,92$ (OCH_3 -4') respectivamente. Adicionalmente, dois dupletos com meta-acoplamento em $\delta\text{H} 6,29$ (d, H-6) e $\delta\text{H} 6,56$ (d, H-8) típico de flavonóides com anel "A" substituídos nas posições 5 e 7, ou seja, flavonoides 5,7-di-hidroxi estão presentes na canferide. A presença de um singlete do grupo metoxi em $\delta\text{H} 3,75$ (OCH_3 -6) apenas para o betuletol confirma sua estrutura. O espectro de RMN de ^1H mostrou um singlete característico de OH-5 em ponte de hidrogênio com carbonila da posição 4 de flavonas (δ 12,53 para betuletol e δ 12,12 para canferide), sugestão reforçada pela presença de carbono metínico em δ 104,18 e δ 104,41 para os carbonos da posição 3. O espectro de RMN de ^{13}C , experimento DEPTQ, das substâncias betuletol (**Figura A49**) e canferide (**Figura A54**) apresentou dois sinais para carbonos metílicos em δ 60,39 de 6- OCH_3 e δ 55,74 de 4'- OCH_3 para betuletol e um sinal em δ 55,04 para 4'- OCH_3 para canferide.

A análise espectrométrica para o betuletol, realizada por LC-ESI-MS, foi comparada com o banco de dados desenvolvido no *software* PDCL, permitindo confirmar a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$. Sua massa mono-isotópica foi de 330,0761 e a medida de massa desprotonada foi de m/z 329,0688 (diferença de 6,41 ppm). O ESI(-)-MS/MS do íon precursor revelou m/z 314, 299 e 271 conforme evidenciado por Surek e colaboradores (2021) confirma a estrutura. A análise espectrométrica para o canferide, realizada por LC-ESI-MS, foi comparada com o banco de dados

desenvolvido no *software* PDCL, permitindo confirmar a fórmula molecular $C_{16}H_{12}O_6$. Sua massa mono-isotópica foi de 300,0646 e a medida de massa desprotonada foi de m/z 299,0572 (diferença de 4,01 ppm). O ESI(-)- MS/MS do íon precursor revelou m/z 284,255,163,151,132 e 107 conforme evidenciado por Surek e colaboradores (2021) confirma a estrutura.

Diversos estudos, como o de Yang e coautores (2008), evidenciam a eficácia da cromatografia de permeação em gel (GPC) associada à cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC) para a purificação de matrizes complexas. Essa combinação metodológica permite uma separação mais precisa e eficiente de compostos, aprimorando a purificação e caracterização de substâncias em uma ampla gama de aplicações científicas.

6.3.4. Separação, isolamento e identificação substâncias apolares das frações reunidas por CCC2 multidimensional

Com o intuito de otimizar a separação de substâncias apolares, foram reunidas frações iniciais das corridas CCC1.1 a CCC1.3, totalizando 231 mg de material injetado. Ao analisar por GC-MS (**Figura A55**) essa fração foi observado um enriquecimento significativo de triterpenos pentacíclicos do tipo lupano (t_r a partir de 33 minutos, **Figura A56**) e um pico base proeminente com m/z 108 (t_r entre 22-26 minutos), característico de derivados do ácido salicílico (**Figura Apêndice A61 e A62**) conforme evidenciado por Walters e pesquisadores (1988) e Negri e coautores (2019). Oito sistemas de solventes aquosos e não aquosos foram testados (**Tabela 10**), com destaque para os sistemas quaternários hexano-acetato de etila-etanol-água (**SS 1 e 2**) e éter de petróleo-acetato de etila-etanol-água (**SS 4 e 5**), que são utilizados com frequência no fracionamento de substâncias de polaridade média a moderada (LUAN *et al.*, 2024).

Sistemas de solventes aquosos, identificados como SS 1, 2, 4 e 5, além do sistema de solvente 3, não-aquoso, foram submetidos a testes para avaliar sua eficiência na separação de substâncias. Durante os experimentos, todos esses sistemas deslocaram as substâncias para a fase superior, o que resultou na decisão de não escolher essas opções para o fracionamento. Comparando-se os sistemas 6, 7 e 8, observa-se que ambos deram valores de K estimados para os lípideos fenólicos semelhantes visualmente em CCD (**Figura 49**, próximo do valor de $K = 1$) (BETR HOD *et al.*, 2016), significando uma purificação com pelo menos um volume de coluna ($K=1$). O sistema contendo metanol (SS 6) apresentou uma distribuição não otimizada entre as fases superior e a fase inferior onde havia uma proporção de 80% de fase inferior no sistema bifásico (20/80), resultando em sua exclusão. Assim, o sistema 8, composto por hexano-cloroformio-acetonitrila (1:0,1:1), foi escolhido para a fracionamento dos componentes apolares da própolis verde, organizando as frações com base na similaridade em CCD e posteriormente submetendo-as à análise por GC-MS.

Com base nos resultados obtidos, foi implementado o sistema 8 na separação por CCC para os componentes apolares de EEPV, utilizando eluição-extrusão no modo normal, conforme os parâmetros analíticos especificados na **Tabela 12**. A corrida CCC2 apresentou uma separação satisfatória, permitindo a organização das frações por similaridade em CCD, representadas na **Figura 56**, após a pulverização do reagente vanilina-sulfúrica. Ao final da corrida, foram coletados um total de 81 tubos de 4ml cada.

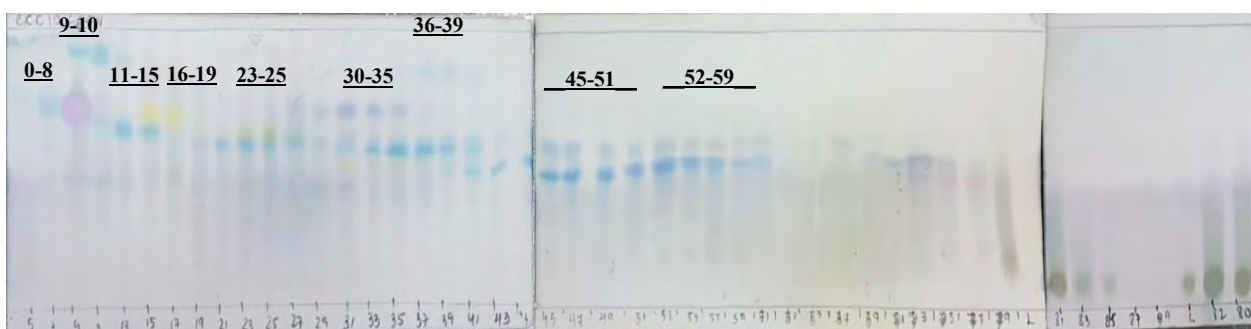


Figura 56-Resultados de CCD de CCC2 pulverizado com reagente vanilina-sulfúrica.

A purificação dos componentes apolares de EEPV com o sistema de solventes não-aquosos selecionado resultou no isolamento de triterpenos pentacíclicos, que se concentraram nas frações 0 a 10, além de derivados de lipídeos fenólicos, presentes nas frações 11 a 25. Também foi possível identificar derivados de lipídeos fenólicos nas frações 45 a 59. Neste contexto, o fracionamento das substâncias apolares da própolis demonstrou ser eficaz na separação de derivados de cicloartenol e derivados de lipídeos fenólicos, conforme avaliado por GC-MS e pelas comparações com a biblioteca do equipamento NIST 2023. Nas frações reunidas 0 a 8, foram identificadas misturas de hidrocarbonetos alifáticos como nonadeceno e octadecano, além de triterpenos pentacíclicos do tipo lupano, como o acetato de alfa amirina e ácido mangiferônico. As frações 9-10 apresentaram estearato de metila e elaidato de metila, como também os triterpenos anteriormente identificados por nosso grupo (SANTOS *et al.*, 2024) como ácido ambônico e mangiferônico (composto 11). As frações 11 a 25 exibiram cromatogramas com tempo de retenção variados com m/z 108, indicando presença de lipídeos fenólicos, enquanto a fração 30 a 35 continha acetato de cicloartenol. Além disso, nas frações 36 a 39, foi detectado novamente o ácido ambônico.

Para purificar a mistura de lipídios fenólicos (**Figura 57A**), as frações foram submetidas à cromatografia de permeação em gel (Sephadex LH 20, fluxo de 3,5 mL/min), utilizando uma mistura de CH_2Cl_2 :acetona (3:2), resultando em 17 frações de 3mL, denominadas de A a Q. A fração K+L (10 mg) e a fração I+J (10 mg) apresentaram uma mistura de ácido anacárdico com aspecto gelatinoso (**Figura 57C**), que foram grupadas com base na similaridade observada em CCD (**Figura 58**), cuja análise molecular indicou a descarboxilação desses ácidos anacárdicos ocorrida durante o aquecimento do injetor na análise do GC-MS (**Figura 59**) (BRAGA *et al.*, 2021).

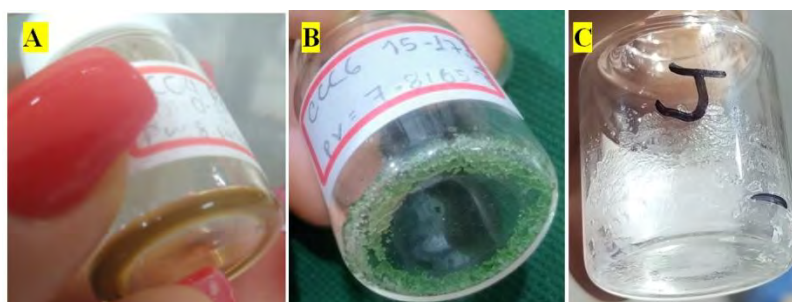


Figura 57-Isolamento do ácido anacárdico 19:1. A- amostra injetada em CCC2; B- frações reunidas do CC2 e C- Ácido anacárdico purificado em cromatografia de permeação em gel.



Figura 58-Resultados de CCD de ácido anacárdico purificado visualizados sob luz UV ($\lambda = 254$ nm) e luz UV ($\lambda = 365$ nm).

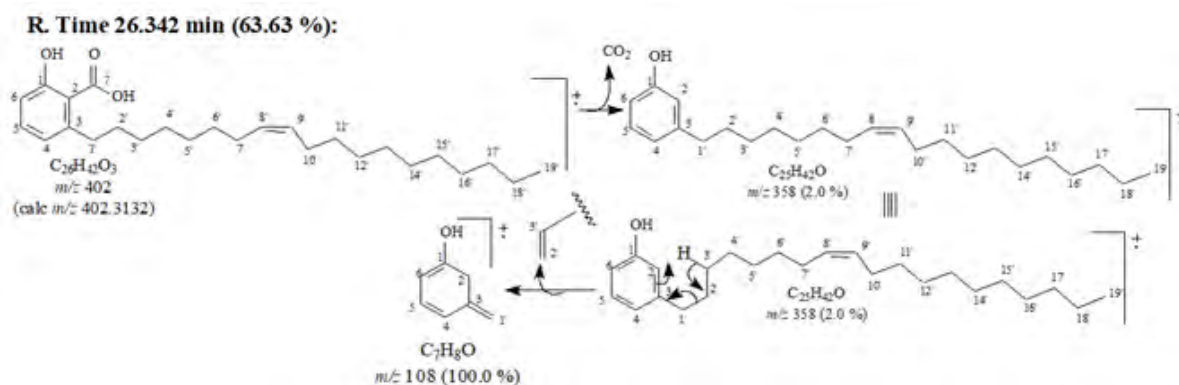


Figura 59-Proposta de fragmentação do ácido anacárdico purificado

Este resultado evidencia a eficácia do uso da cromatografia contracorrente (CCC) e da filtração em permeação em gel com Sephadex LH 20 na purificação de derivados de ácido anacárdico. As frações foram avaliadas por GC-MS (**Figura A57 e A59**), HPLC-PDA (**Figura A58**), RMN (**Figura A60 a A62, Tabela A5**) e LC-ESI-MS (**Figura A63 a A67**). A metodologia empregada nas frações dos ácidos anacárdicos por HPLC-PDA (**Figura A58**) foram modificadas apartir do trabalho desenvolvido por Oiram e colaboradores (2018, 2023) e a curva de UV indicava a presença de ácido anacárdico.

A atribuição do sinal do próton de ácidos anacárdicos foi discutida no trabalho de Araújo e coautores (2020), Moraes e colaboradores (2017) e Umehara e pesquisadores (2020). O Espectro de RMN de ^1H de ácidos anacárdicos foi elucidado com o auxílio deste estudo (**Figura A61, Tabela A5**). O espectro de RMN de ^1H mostrou sinais atribuídos a um anel aromático em δH 7.35 (t, $J = 7,8$ Hz, H-5), δH 6.77 (d, $J = 7,8$ Hz, H-4) e δH 6.86 (d, $J = 7,6$ Hz, H-6). Além disso, a presença de uma cadeia lateral não saturada foi proposta devido aos sinais no intervalo δH 1.34 – 1.27 (m, H-3'-6' e H-11'-18'), δH 2.97 (m, H-1'), δH 1.59 (m, H-2'), δH 2.04 (m, H-7' e H-10'). O espectro de ^{13}C mostrou o pico atribuído a um carbono carbonílico em δ 175.12, a um anel aromático em δ 163.51–110.70 (C-1 a C-6), a uma longa cadeia lateral em δ 29,77–29,03 (C-3' – C-6' e C-11' – C-16') e um grupo metil em δ 14,11 (C-19'). Além disso, sinais de carbonos sp^2 foram observados em δ 130,03 e 129,84, atribuídos aos carbonos da ligação dupla cis não conjugada (C-8' e C-9') permitindo a identificação do ácido 3-(8'Z)-nonadecaenil-salicílico, um derivado C19:1 do ácido anacárdico, como mostrado na **Figura 60**.

Os dados adquiridos por LCMS (**Figura A63 a A67**) confirmam na mistura os ácidos anacárdico de cinco ácidos 3-alkilsalicílicos diferentes, com, como substituintes alquil, C17:1, C19:0, C19:1, C20:0, C20:1 que estão representadas na **Figuras 60**. O ácido anacárdico, com massa 402, foi detectado por Surek e coautores (2021), porém não foi possível sua completa identificação pelos autores. A análise LC-MSQTOF indicou uma mistura com o pico de íon $[\text{M}-\text{H}]^-$ desprotonado em m/z 373, 2731, correspondendo à fórmula molecular $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_3$ para o ácido anacardico 17:1, o pico de íon mais abundante $[\text{M}-\text{H}]^-$ desprotonado em m/z 401, 3043, correspondendo à fórmula

molecular $C_{26}H_{41}O_3$ para o ácido anacárdico 19:1 identificado por RMN, o pico de íon $[M-H]^-$ desprotonado em m/z 403,3167, correspondendo à fórmula molecular $C_{26}H_{43}O_3$ para o ácido anacárdico 19:0, o pico de íon $[M-H]^-$ desprotonado em m/z 415,2825, correspondendo à fórmula molecular $C_{27}H_{43}O_3$ para o ácido anacárdico 20:1 e pico de íon $[M-H]^-$ desprotonado em m/z 417,2983, correspondendo à fórmula molecular $C_{26}H_{45}O_3$ para o ácido anacárdico 20:0.

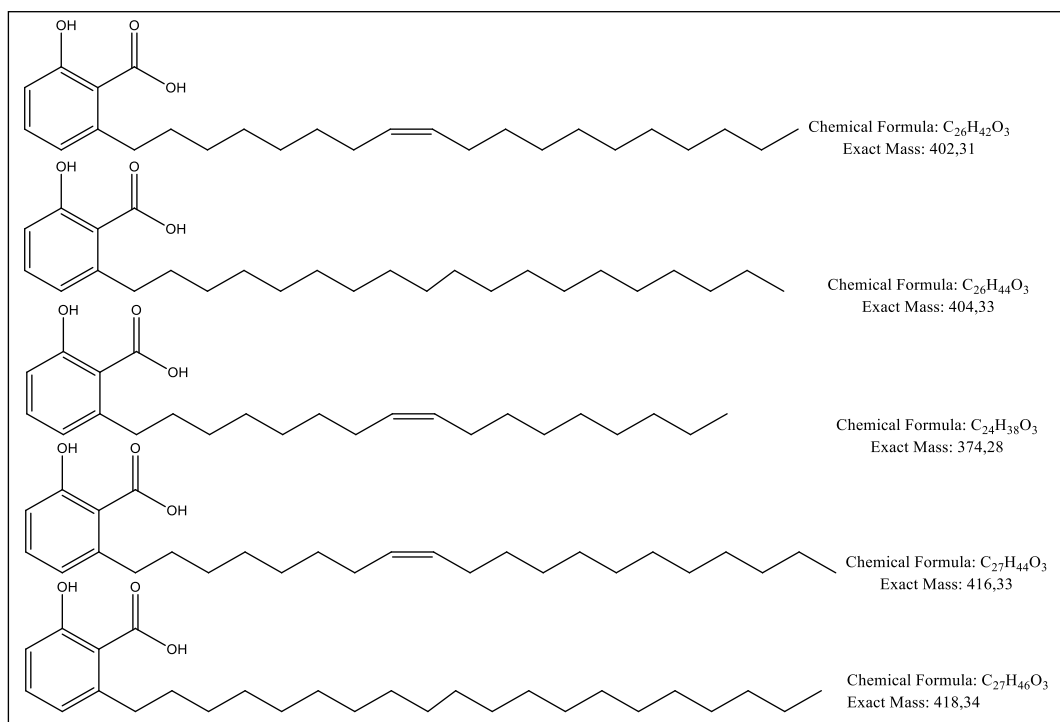


Figura 60-Estruturas químicas dos ácidos anacárdicos presentes em EEPV

A investigação acerca da presença de triterpenos ácidos e derivados de lipídeos fenólicos na própolis verde levantou a suspeita de que tais substâncias poderiam ser integrantes das ceras extraídas no processamento deste produto (PIRES & CASTRO, 2023; CASTRO & SALGUEIRO, 2016). Em resposta a essa hipótese, a cera foi submetida a uma análise por GC-MS para confirmar a presença dessas substâncias ou descartar possíveis erros experimentais. A cromatografia gasosa, realizada tanto no modo *scan* (**Figura 61**) quanto no modo *syn* (para o ácido anacárdico, m/z 108, **Figura Apêndice A68**), mostrou que as referidas substâncias são, de fato, da própolis e não estão presentes na cera extraída durante refrigeração no preparo do extrato. Além disso, a cera analisada revelou-se rica em ácidos graxos de cadeia longa, sendo o ácido palmítico (eluída em 33min) a substância de maior peso molecular, conforme evidenciado pela comparação com a biblioteca NIST23.

A **Figura 61** apresenta o perfil cromatográfico em modo *scan* dos diferentes materiais analisados, incluindo a cera, o ácido anacárdico 19:1 purificado e a mistura triterpênica dos ácidos ambônicos e mangiferônicos (obtidos de SANTOS *et al.*, 2024), além dos extratos hexânico e etanólico. Observa-se que os triterpenos derivados de cicloatr enol estão ausentes na cera, mas presentes em ambos os extratos. A presença do ácido anacárdico em ambos os extratos é evidenciada pela fragmentação correspondente a m/z 108 (**Figura A59**) nos mesmos tempos de retenção detectáveis por GC-MS e, verifica-se um enriquecimento do ácido anacárdico através da cromatografia contracorrente, permitindo sua identificação e testes biológicos subsequentes. Este estudo corrobora a relevância da família *Anacardiaceae* como uma fonte botânica para abelhas *Apis*, destacando a necessidade de uma avaliação mais aprofundada acerca de quais das espécies, *Mangifera* ou *Schinus*, estariam disponíveis nas proximidades do apiário de Paracambi.

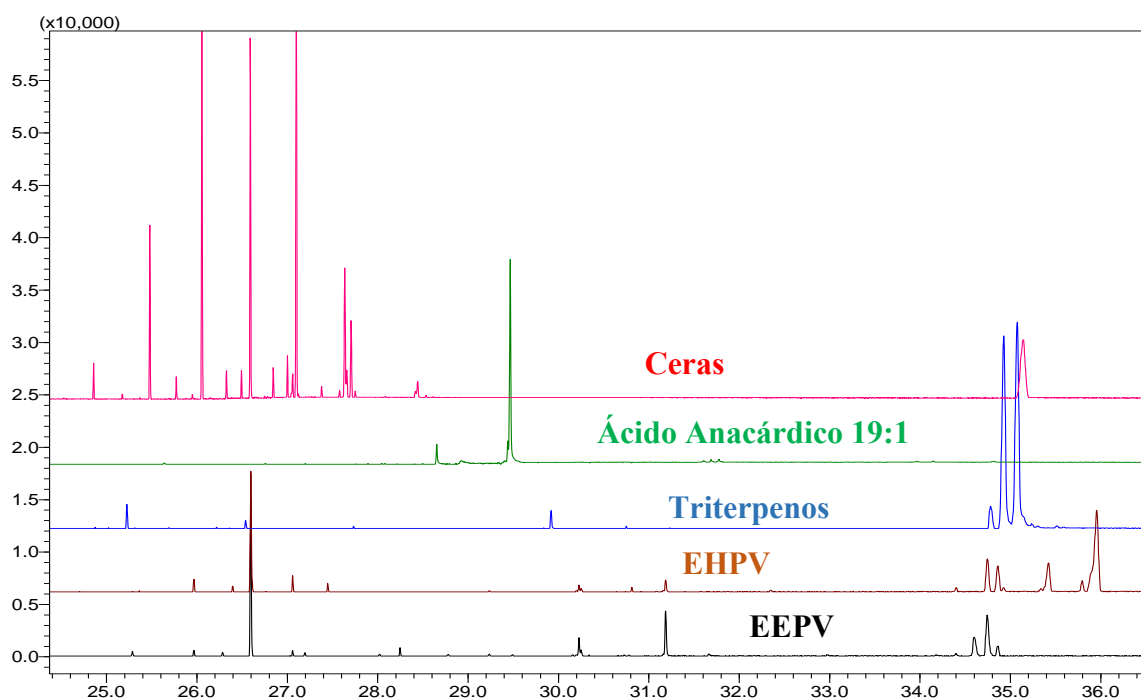


Figura 61-Perfil GC-MS obtido por impacto de elétrons para ceras (vermelho), ácido anacárdico (verde), mistura triterpênica dos ácidos ambônicos e mangiferônicos (azul), extrato hexânico de própolis verde (marrom) e extrato etanólico de própolis verde (preto).

6.3.5. Substâncias isoladas do Própolis Verde reduzem a viabilidade de linhagens celulares de carcinoma de mama que expressam p53 selvagem e mutante.

Com base em dados da literatura sobre o potencial antitumoral da própolis verde (FORMA *et al.*, 2021), decidiu-se investigar o efeitos dos extratos hexânico e etanólicos, bem como as substâncias isoladas no presente extrato de própolis verde sobre a viabilidade celular de células da linhagem de adenocarcinoma de mama. Para isso as quatorze substâncias isoladas neste trabalho foram avaliada em linhagens celulares de câncer de mama MCF-7 (**Figura 62A**) e MDA-MB-231 (**Figura 62B**). A saber: betuletol (91% pureza em HPLC-PDA), canferide (87% pureza em HPLC-PDA), ácido anacárdico 17:1 (ANAC 17:1; 89% pureza em HPLC-PDA), ácido anacárdico 19:1 (ANAC 19:1; 79% pureza em HPLC-PDA), culifolina (91% pureza em HPLC-PDA), bacarina (baccharin, 73% pureza em HPLC-PDA), artepilina C (91% pureza em HPLC-PDA), mistura triterpênica dos ácidos ambônicos e mangiferônicos (triterpene), drupanina (58% pureza em HPLC-PDA), aromadendrina 4- metil éter (AME, 59% pureza em HPLC-PDA), capilatermisina (CAP A/B; 72% pureza em HPLC-PDA) e ácido *p*-cumárico (83% pureza em HPLC-PDA).

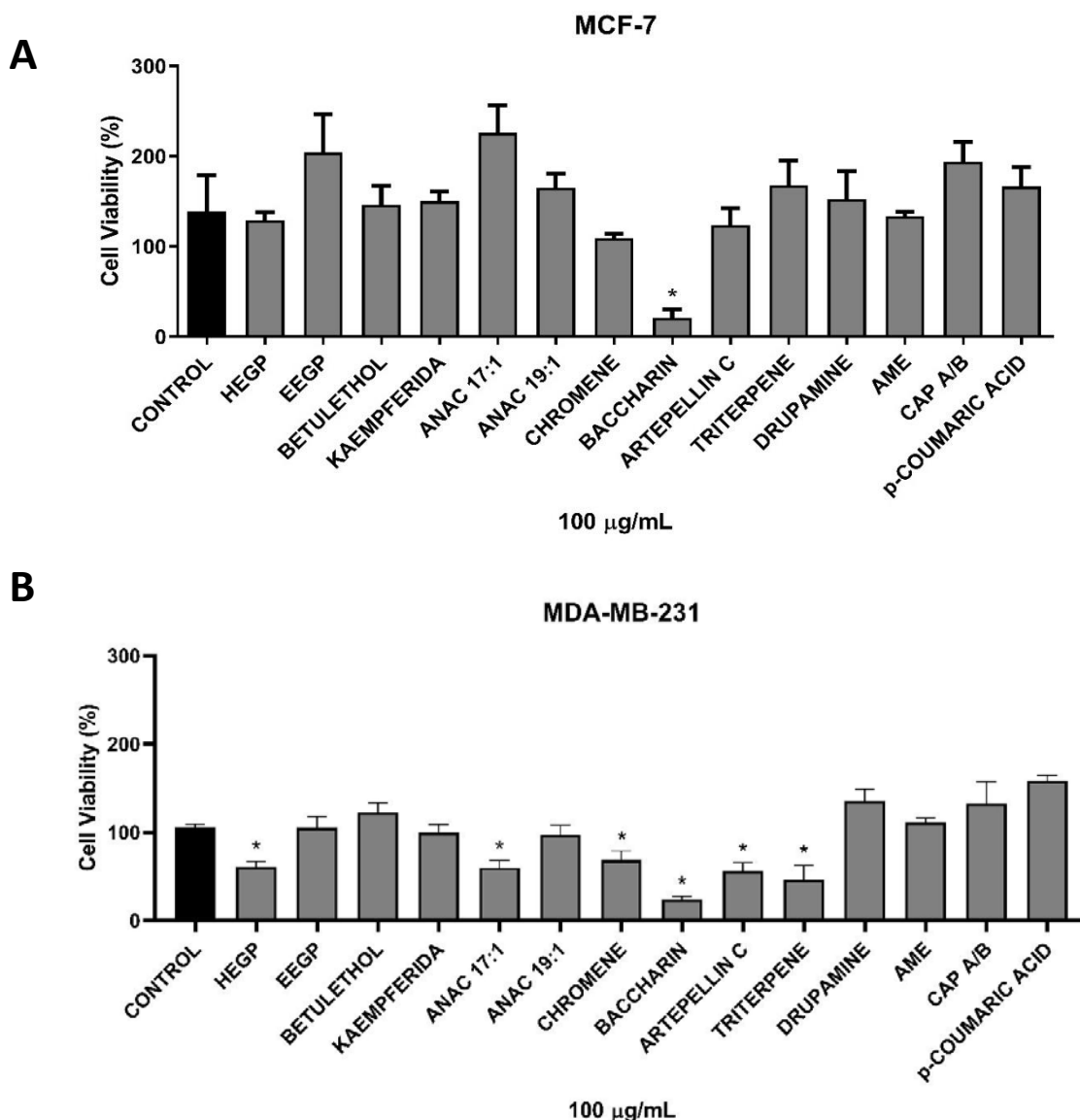


Figura 62- Teste das substâncias isoladas da própolis verde com inibição nas linhagens de células de câncer de mama. As linhagens MCF-7 (A) e MDA-MB-231 (B) foram tratadas com 100 µg/mL de cada substância isolada da própolis verde por 72h e analisadas por MTT. Análise estatística em relação ao controle * $p < 0,05$). $n=3$. Substâncias: Controle (control), extrato hexânico de própolis verde (HEGP), extrato etanólico de própolis verde (EEGP). Betuletol, canferide, ácido anacárdico 17:1 (ANAC 17:1), ácido anacárdico 19:1 (ANAC 19:1), culifolina, bacarina (baccharin), atr epilina C, mistura triterpênica dos ácidos ambônicos e mangiferônicos (triterpene), drupanina, aromadendrina metil éter (AME), capillatersina (CAP A/B) e ácido p-cumárico.

As células foram tratadas com cada substância isolada na concentração de 100 µg/mL. A viabilidade celular da linhagem de células de câncer de mama luminal MCF-7 foi significativamente inibida apenas pela substância bacarina, enquanto a linhagem de células de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231 teve sua viabilidade celular significativamente inibida pelo extrato hexânico de própolis verde (EHPV), ácido anacárdico 17:1, culifolina, bacarina, artepilina C e a mistura dos triterpenos ácidos (ácido ambônico e mangiferônico). Conforme evidenciado nos estudos de Pires e Castro (2023) e Santos e colaboradores (2024), o extrato hexânico apresenta uma rica composição em bacarina, além de uma significativa mistura de triterpenos. Essa constituição química pode ter sido responsável pelo seu potencial anti-tumoral, evidenciando sua eficácia superior em comparação ao extrato etanólico. Os resultados preliminares fornecem evidências da atividade antitumoral dessas substâncias no câncer de mama.

Sendo assim, o presente estudo e os resultados preliminares podem servir como base para a utilização do extrato de própolis e/ ou de algumas das substâncias isoladas como alternativa no tratamento do cancer de mama. Serão necessários uma investigação mais aprofundada para saber quais constituintes são os responsáveis pela atividade antitumoral, bem como o mecanismo de ação. Logo, esse estudo abre uma perspectiva relevante acerca do papel da própolis verde e seus constituintes, como constituintes viáveis como um novo agente terapêutico. A continuidade dessa pesquisa é fundamental para o avanço no tratamento e na compreensão desta patologia.

6.4. Conclusões

A técnica de CCC (Cromatografia Contracorrente) revelou-se altamente eficiente e superior em termos de rendimentos e rapidez na análise fitoquímica dos extratos de própolis verde, quando comparada às abordagens que empregam cromatografia com fase estacionária sólida. Esta metodologia permitiu não apenas o enriquecimento de substâncias presentes em quantidades menores nos extratos de própolis, mas também o isolamento de substâncias, como fenilpropanoides, flavonoides e derivados lipídicos, o que ampliou significativamente o conhecimento fitoquímico sobre o extrato, utilizando tanto sistemas aquosos quanto não-aquosos. Ademais, o escalonamento das corridas foi apresentado como reprodutível, o que é fundamental para garantir a consistência e a confiabilidade dos resultados obtidos. A separação eficaz dos metabólitos facilitou a identificação de quatorze substâncias (betuletol, canferide, ácido anacárdico 17:1 e 19:1, culifolina, bacarina, artepilina C, mistura triterpênica dos ácidos ambônicos e mangiferônicos, drupanina, aromadendrina -4-metil éter, capilatermisina A e B e ácido *p*-cumárico), revelando um potencial promissor para o uso dessas substâncias isoladas no tratamento de doenças, como o câncer. Os dados obtidos indicam que as substâncias isoladas da própolis verde (ácido anacárdico 17:1, culifolina, bacarina, artepilina C e a mistura dos triterpenos ácidos) possuem a capacidade de exercer um efeito antitumoral em linhagens celulares específicas, destacando-se a linhagem celular MDA-MB-231, associada ao câncer de mama triplo negativo, uma forma agressiva da doença que apresenta opções terapêuticas limitadas e taxas de sobrevida reduzidas. Em vista desses resultados, torna-se imperativo que estudos adicionais sejam realizados para aprofundar a compreensão dos efeitos antitumorais observados, investigando de maneira minuciosa os mecanismos de ação subjacentes a essas interações bioquímicas, o que pode abrir novas possibilidades para intervenções terapêuticas inovadoras e eficazes no combate ao câncer.

7. CONCLUSÕES FINAIS

Neste trabalho, foram desenvolvidas três metodologias distintas de separação por HSCCC, visando isolar os metabólitos especiais contidos em uma matriz complexa, como a própolis verde brasileira (PVB). Essa pesquisa representou uma contribuição significativa para a literatura, uma vez que há escassez de relatos sobre metodologias de separação aplicadas especificamente a extratos de própolis. A aplicação da cromatografia de contra corrente propicia um avanço no entendimento e aproveitamento das substâncias bioativas presentes na própolis.

A pesquisa realizada avaliou diferentes sistemas de solventes e modos de eluição aplicados à cromatografia em contracorrente (CCC) para o fracionamento dos extratos hexânico e etanólico da PVB. Os métodos propostos oferecem uma abordagem inovadora para a purificação de biomarcadores dessa própolis, utilizando tanto HSCCC de fase reversa quanto de fase normal, com elevado rendimento. Os resultados demonstram eficiência no escalonamento dos extratos, favorecendo a reprodutibilidade e a obtenção de maiores quantidades de amostras puras, o que viabiliza ensaios biológicos e abre novas perspectivas para pesquisas futuras.

A menor complexidade do extrato hexânico da própolis, com um perfil químico mais simples em substâncias fenólicas analisado por HPLC-PDA e/ou CCD, possibilitou fracionamento eficaz do EHPV utilizando modos de eluição-extrusão de fase normal (CCC1 e CCC2, com eluição estendida) e reversa (CCC3). A escolha do sistema de solvente hexano-etanol-água na proporção de 4:3:1 revelou-se extremamente eficaz para o isolamento de compostos bioativos, resultando na obtenção de 89,9 mg de artepilina C com uma pureza de 93% (analisada por HPLC-PDA), 52,7 mg de bacarina com pureza de 83% e 26,6 mg de culifolina apresentando 88% de pureza, com baixo custo operacional e excelente reprodutibilidade. Além disso, a análise permitiu a identificação de ácido ambônico e mangiferônico em uma mistura de triterpenos pentacíclicos, que estavam presentes tanto no extrato hexânico, quanto no etanólico e ausentes nas ceras obtidas durante a extração atuando como contaminantes. Essa abordagem destaca não apenas a eficiência do sistema de solventes utilizado, mas também a necessidade de considerar a presença de contaminantes na otimização de processos de extração e purificação.

Um estudo visando a obtenção da artepilina C por meio da técnica de CCC foi desenvolvido, explorando diferentes sistemas de solventes. O sistema composto por hexano-acetato de etila (1:1) com 5% de Na_2CO_3 permitiu não apenas o isolamento da artepilina C, mas também a extração de uma mistura de triterpenos, sendo necessário a troca para uma base mais fraca. Um novo sistema de solvente inédito foi avaliado para a extração seletiva da artepilina C, utilizando hexano-acetato de etila (8:2) com 4% de NaHCO_3 , o qual apresentou um valor de K dentro da faixa recomendada pela literatura (WANG *et al.*, 2024). Este novo sistema demonstrou ser vantajoso ao possibilitar isolar a artepilina C de forma seletiva, além de ser economicamente viável e ambientalmente sustentável, visto que a mistura hexano-acetato de etila pode ser recuperada na fase estacionária. Adicionalmente, os sais de sódio presentes nas soluções de carbonato e bicarbonato tornam-se atóxicos após neutralização. O resultado final foi a obtenção da artepilina com uma pureza cromatográfica de 81% por HPLC-PDA, após a neutralização da fase móvel e a recuperação com acetato de etila.

A cromatografia contracorrente multidimensional (MDCCC) aplicada ao conhecimento fitoquímico do extrato etanólico da PVB demonstrou ser uma técnica eficaz para a separação de metabólitos secundários, utilizando tanto sistemas aquosos, quanto não-aquosos. O fracionamento de EEPV por MDCCC em um sistema de solventes bifásico aquoso composto por hexano-acetato de etila-etanol-água em proporções de 1:0,8:1:1 (v/v) e em modo de eluição isocrática normal, permitiu a obtenção direta de diferentes constituintes, como artepilina C, bacarina, diidrokaempferide, isômeros capilartemisina A/B e ácido *p*-cumárico. Para o isolamento da drupanina e betuletol, foi necessário empregar um modelo de segunda dimensão (CCC x Sephadex) por MDCCC, o que possibilitou o isolamento e a identificação de betuletol, kaempferide canferide, drupanina e isosakuranetina. A purificação de frações menos polares foi realizada com um modelo CCC x CCC,

utilizando o sistema de solvente hexano-clorofórmio-acetonitrila (1:0,1:1, v/v) e cromatografia de exclusão em Sephadex LH-20, visando isolar uma mistura de ácidos anacárdicos. O estudo fitoquímico conduzido revelou-se ágil e eficiente, destacando a reprodutibilidade das análises realizadas após escalonamento.

As substâncias isoladas da própolis verde brasileira, incluindo ácido ambônico, ácido mangiferônico, betuletol, canferide, capilatermisina, diidrocaemferide, aromandendrina 4-metil éter e ácidos anacárdicos, foram caracterizadas espectroscopicamente utilizando técnicas como RMN ^1H e ^{13}C (uni e bidimensional), HPLC-PDA, GC-MS e LCMS. Adicionalmente, por meio da técnica de *fingerprinting* com LC-MS/MS-QTOF, foi possível identificar 92 substâncias no extrato etanólico. Essas análises revelaram a complexidade química dessa matrix, e evidenciou a necessidade de uma investigação minuciosa na tentativa de padronização do extrato etanólico que apresenta, apenas, cerca de 3% de substâncias conhecidas.

Estudos futuros deverão ser realizados na tentativa de isolar e purificar outras substâncias, incluindo àquelas já fracionadas nesse trabalho com a utilização de MDCCC. Adicionalmente, a metodologia utilizada no *fingerprint* de EEPV deverá ser aprimorada para a detecção dos íons não identificados por MS/MS neste estudo preliminar, avançando assim, para o conhecimento químico relacionado à própolis.

Essa pesquisa permitiu avaliar a atividade biológica dos extratos e das substâncias isoladas em CCC na inibição da interação entre o domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína *spike* e o receptor da proteína ACE2 pelo imunoensaio LumitTM. Além disso, foi possível realizar um estudo bioguiado em linhagens celulares específicas, destacando-se a linhagem celular MDA-MB-231, associada ao câncer de mama triplo negativo. Estes estudos corroboraram para demonstrar o potencial da própolis verde nas atividades antivirais e antitumorais.

8. REFERÊNCIAS

ACITO, Mattia; VARFAJ, Ina; BRIGHENTI, Virginia; CENGIZ, Emine Ceren; RONDINI, Tommaso; FATIGONI, Cristina; RUSSO, Carla; PIETRELLA, Donatella; PELLATI, Federica; BARTOLINI, Desirée. A novel black poplar propolis extract with promising health-promoting properties: focus on its chemical composition, antioxidant, antiinflammatory, and anti-genotoxic activities. **Food & Function**, [s. l.], v. 15, p. 4983, 2025.

AGA, Hajime; SHIBUYA, Takashi; SUGIMOTO, Toshiyuki; KURIMOTO, Masashi; NAKAJIMA, Shuhei. Isolation and Identification of Antimicrobial Compounds in Brazilian Propolis. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, [S.L.], v. 58, n. 5, p. 945-946, jan. 1994. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.58.945>.

AGUIRRE-RODRÍGUEZ, Adriana; DUARTE-CASAR, Rodrigo; ROJAS-LE-FORT, Marlene; ROMERO-BENAVIDES, Juan Carlos. Food uses, functional activities, and bioactive compounds of three Ecuadorian Vasconcellea fruits: bibliometric analysis and review. **Journal Of Agriculture And Food Research**, [S.L.], v. 17, p. 101244, set. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101244>.

AHANGARI, Zohreh; NASERI, Mandana; VATANDOOST, Farzaneh. Propolis: chemical composition and its applications in endodontics. **Iranian Endodontic Journal**, [S.L.], v. 13, n. 3, p. 285-292, 10 jul. 2018. <http://dx.doi.org/10.22037/iej.v13i3.20994>.

AHN, Mok-Ryeon; KUNIMASA, Kazuhiro; KUMAZAWA, Shigenori; NAKAYAMA, Tsutomu; KAJI, Kazuhiko; UTO, Yoshihiro; HORI, Hitoshi; NAGASAWA, Hideko; OHTA, Toshiro. Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. **Molecular Nutrition & Food Research**, [S.L.], v. 53, n. 5, p. 643-651, maio 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.200800021>.

AKAO, Yukihiro; MARUYAMA, Hiroe; MATSUMOTO, Kenji; OHGUCHI, Kenji; NISHIZAWA, Kumi; SAKAMOTO, Takashi; ARAKI, Yoko; MISHIMA, Satoshi; NOZAWA, Yoshinori. Cell Growth Inhibitory Effect of Cinnamic Acid Derivatives from Propolis on Human Tumor Cell Lines. **Biological And Pharmaceutical Bulletin**, [S.L.], v. 26, n. 7, p. 1057-1059, 2003. Pharmaceutical Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.26.1057>.

ALBUQUERQUE, Irineu L. de; ALVES, Leonardo A.; LEMOS, Telma L. G.; MONTE, Francisco J. Q.; BRAZ-FILHO, Raimundo. Ácido canárico (3,4-seco derivado do lupano) em própolis do Ceará. **Química Nova**, [S.L.], v. 30, n. 4, p. 1, ago. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000400013>

ALBUQUERQUE, Irineu Lima de **ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE DUAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS: ALTO SANTO - CEARÁ E PASSA QUATRO - MINAS GERAIS**. 2007. 195 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química Orgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

ALMEIDA-JUNIOR, Silvio; OLIVEIRA, Kátia Roberta Prieto de; MARQUES, Laís Prado; MARTINS, João Guilherme; UBEDA, Heloisa; SANTOS, Mario Ferreira Conceição; RODRIGUES, Marcela Aldrovani; SILVA, Marcio Luís Andrade e; AMBRÓSIO, Sérgio Ricardo; BASTOS, Jairo Kenupp. In vivo anti-inflammatory activity of BACCHARIN from BRAZILIAN green PROPOLIS. **Fitoterapia**, [S.L.], v. 175, p. 105975, jun. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2024.105975>.

AMANO, Shigeru; MATSUMOTO, Masaru; MORIMOTO, Masanori; KAWAMOTO, Hirokazu; TAKESHITA, Fumiaki; YASUI, Toshikazu; SAKAGAMI, Hiroshi. Efficacy of toothpaste containing Brazilian green propolis extracts with an optimal kaempferide/betuletol ratio for improving oral microbiota: a randomized, controlled, paired crossover study. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 337, p. 118762, jan. 2025. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2024.118762>.

ANSHORI, Isa; MARCIUS, Donny; SYAIFIE, Putri Hawa; SIREGAR, Khalish Arsy Al Khairy; SYAKURAN, Luqman Abdan; JAUHAR, Muhammad Miftah; ARDA, Adzani Gaisani; SHALANNANDA, Wervyan; MARDLIYATI, Etik. Uncovering the Therapeutic Potential of Propolis Extract in Managing Hyperinflammation and Long COVID-19: a comprehensive bioinformatics study. **Chemistry & Biodiversity**, [S.L.], p. 1, 22 nov. 2024. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.202401947>.

ARAĐJO, Maria José Abigail Mendes; BÖFALO, Michelle Cristiane; CONTI, Bruno José; FERNANDES JUNIOR, Ary; TRUSHEVA, Boryana; BANKOVA, Vassya; SFORCIN, José Maurício. The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in northeast Brazil. **Journal Of Molecular Pathophysiology**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 12-20, fev. 2015. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/137218>. Acesso em: 18 out. 2024.

ARAÚJO, Jennifer Thayanne Cavalcante de; LIMA, Laís Aragão; VALE, Everton Pantoja; MARTIN-PASTOR, Manuel; LIMA, Ramille Araújo; SILVA, Paulo Goberlânio de Barros; SOUSA, Francisco Fabio Oliveira de. Toxicological and genotoxic evaluation of anacardic acid loaded-zein nanoparticles in mice. **Toxicology Reports**, [S.L.], v. 7, p. 1207-1215, 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.08.024>.

ARRUDA, Caroline; RIBEIRO, Victor Pena; ALMEIDA, Marília Oliveira; MEJÍA, Jennyfer Andrea Aldana; CASOTI, Rosana; BASTOS, Jairo Kenupp. Effect of light, oxygen and temperature on the stability of artemisinin C and p-coumaric acid from Brazilian green propolis. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [S.L.], v. 178, p. 112922, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112922>.

ARRUDA, Caroline; RIBEIRO, Victor Pena; MEJÍA, Jennyfer Andrea Aldana; ALMEIDA, Marília Oliveira; GOULART, Mirian Oliveira; CANDIDO, Ana Carolina Bolela Bovo; DOS SANTOS, Raquel Alves; MAGALHÃES, Lizandra Guidi; MARTINS, Carlos Henrique Gomes; BASTOS, Jairo Kenupp. Green Propolis: Cytotoxic and Leishmanicidal Activities of Artemisinin C, p-Coumaric Acid, and Their Degradation Products. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 30, n. 2, p. 169–176, abr. 2020. <https://doi.org/10.1007/s43450-020-00043-3>.

ARSLAN, Idris. Natural PAK1 inhibitors: potent anti-inflammatory effectors for prevention of pulmonary fibrosis in covid-19 therapy. **Natural Product Research**, [S.L.], v. 38, n. 20, p. 3644-3656, 10 set. 2023. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2023.2254454>.

AVELAR, Mayra; PEDRAZA-GONZÁLEZ, Laura; SINICROPI, Adalgisa; FLORES-MORALES, Virginia. Triterpene Derivatives as Potential Inhibitors of the RBD Spike Protein from SARS-CoV-2: an *in silico* approach. **Molecules**, [S.L.], v. 28, n. 5, p. 2333, 2 mar. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28052333>.

AZEVEDO, Arthur Almeida; CHAGAS, Francineudo Oliveira; JÚNIOR, João Hildo De Carvalho Furtado; JÚNIOR, Emmanuel Arraes De Alencar; TAPETY, Celiane Mary Carneiro; LEITE, Thiago

Bezerra; SILVA, Sarah Mendes De Sousa Macedo; ARAÚJO, Catiana Secundino Ralin De; MEDEIROS, Demétrio Moraes De; DANTAS, Thereza Cristina Farias Botelho; NETO, Edilson Martins Rodrigues. Physicochemical Evaluation of a Toothpaste Incorporated with Brazilian Red Propolis. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*, v. 35, n. 20, p. 259–264, 1 set. 2023. <https://doi.org/10.9734/jammr/2023/v35i205196>.

BACHOŘÍK, Jan; URBAN, Milan. Biocatalysis in the Chemistry of Lupane Triterpenoids. *Molecules*, [S.L.], v. 26, n. 8, p. 2271, 14 abr. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26082271>.

BALASUNDRAM, Nagendran; SUNDRAM, Kalyana; SAMMAN, Samir. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, [S.L.], v. 99, n. 1, p. 191-203, jan. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>.

BANKOVA, Vassya; BERTELLI, Davide; BORBA, Renata; CONTI, Bruno José; CUNHA, Ildenize Barbosa da Silva; DANERT, Carolina; EBERLIN, Marcos Nogueira; FALCÃO, Soraia I; ISLA, María Inés; MORENO, María Inés Nieva. Standard methods for Apismelliferapropolis research. *Journal Of Apicultural Research*, [S.L.], v. 58, n. 2, p. 1-49, 29 set. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2016.1222661>.

BANKOVA, Vassya; POPOVA, Milena; TRUSHEVA, Boryana. The phytochemistry of the honeybee. *Phytochemistry*, [S.L.], v. 155, p. 1-11, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.07.007>.

BARBOSA, Eunice V.; ASSUMPÇÃO, Yasmim M.; TEIXEIRA, Izabel M.; PEREIRA, Renata F.A.; RIBEIRO, Victor P.; BASTOS, Jairo K.; CARDOSO, Clarissa V.; LIBERAL, Máira H.T.; PENNA, Bruno A.; ROCHA, Leandro M. In vitro comparison between antimicrobial and antibiofilm effects of Green Propolis and *Baccharis dracunculifolia* against *Staphylococcus pseudintermedius* isolate. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 94, n. 3, p. e20211103, 2022. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202220211103>.

BÁRCENAS-PÉREZ, Daniela; STRÍŽEK, Antonín; HROUZEK, Pavel; KOPECKÝ, Jiří; BARRADAS, Marta; SIERRA-RAMIREZ, Arantzazu; FERNANDEZ-MARCOS, Pablo J.; CHEEL, José. Production of Fucoxanthin from *Phaeodactylum tricornutum* Using High Performance Countercurrent Chromatography Retaining Its FOXO3 Nuclear Translocation-Inducing Effect. *Marine Drugs*, v. 19, n. 9, p. 517, 11 set. 2021. <https://doi.org/10.3390/md19090517>.

BATISTA JUNIOR, João Marcos; LOPES, Adriana Aparecida; AMBRÓSIO, Daniela Luz; REGASINI, Luis Octávio; KATO, Massuo Jorge; BOLZANI, Vanderlan da Silva; CICARELLI, Regina Maria Barretto; FURLAN, Maysa. Natural Culifolins and Culifolin Derivatives as Potential Anti-trypanosomal Agents. *Biological And Pharmaceutical Bulletin*, [S.L.], v. 31, n. 3, p. 538-540, 2008. Pharmaceutical Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.31.538>.

BERRETTA, Andresa A.; ARRUDA, Caroline; MIGUEL, Felipe Galeti; BAPTISTA, Nathalia; NASCIMENTO, Andresa Piacuzzi; MARQUELE-OLIVEIRA, Franciane; HORI, Juliana Issa; BARUD, Hernane da Silva; DAMASO, Bianca; RAMOS, César. Functional Properties of Brazilian Propolis: from chemical composition until the market. *Superfood And Functional Food - An Overview Of Their Processing And Utilization*, [S.L.], p. 1, 1 mar. 2017. InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/65932>.

BERRETTA, Andresa A.; ARRUDA, Caroline; MIGUEL, Felipe Galeti; BAPTISTA, Nathalia; NASCIMENTO, Andresa Piacezzi; MARQUELE-OLIVEIRA, Franciane; HORI, Juliana Issa; BARUD, Hernane da Silva; DAMASO, Bianca; RAMOS, César; FERREIRA, Raul; BASTOS, Jairo Knupp; BERRETTA, Andresa A.; ARRUDA, Caroline; MIGUEL, Felipe Galeti; BAPTISTA, Nathalia; NASCIMENTO, Andresa Piacezzi; MARQUELE-OLIVEIRA, Franciane; HORI, Juliana Issa; BASTOS, Jairo Kenupp. Functional Properties of Brazilian Propolis: From Chemical Composition until the Market. Superfood and Functional Food - An Overview of Their Processing and Utilization. [S. l.]: IntechOpen, 2017. DOI 10.5772/65932. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/53349>. Acesso em: 16 jun. 2024.

BERTHOD, A.; RUIZ-ÁNGEL, M.J.; CARDA-BROCH, S.. Countercurrent chromatography: people and applications. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 1216, n. 19, p. 4206-4217, maio 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.071>.

BERTHOD, Alain; BROWN, Les; LEITÃO, Gilda G.; LEITÃO, Suzana G.. Chapter 2 Operating a countercurrent chromatography machine. **Comprehensive Analytical Chemistry**, [S.L.], p. 21-47, 2002. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0166-526x\(02\)80005-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0166-526x(02)80005-8).

BESERRA, Fernando Pereira; GUSHIKEN, Lucas Fernando Sérgio; HUSSNI, Maria Fernanda; RIBEIRO, Victor Pena; BONAMIN, Flávia; JACKSON, Christopher John; PELLIZZON, Cláudia Helena; BASTOS, Jairo Kenupp. Artepillin C as an outstanding phenolic compound of Brazilian green propolis for disease treatment: a review on pharmacological aspects. **Phytotherapy Research**, [S.L.], v. 35, n. 5, p. 2274-2286, 15 set. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.6875>.

BETRHOD, Alain; MARYUTINA, Tatyana; SPIVAKOV, Boris; SHPIGUN, Oleg; SUTHERLAND, Ian A. Countercurrent Chromatography in Analytical Chemistry. **Iupac Standards Online**, [S.L.], p. 1, 9 mar. 2016. De Gruyter. <http://dx.doi.org/10.1515/iupac.81.0005>.

BEZERRA, Carolina Rabelo Falcão; BORGES, Katia Regina Assunção; ALVES, Rita de Nazaré Silva; TELES, Amanda Mara; RODRIGUES, Igor Vinicius Pimentel; SILVA, Marcos Antonio Custódio Neto da; NASCIMENTO, Maria do Desterro Soares Brandão; BEZERRA, Geusa Felipa de Barros. Highly efficient antibiofilm and antifungal activity of green propolis against Candida species in dentistry materials. **Plos One**, [S.L.], v. 15, n. 12, p. 1, 23 dez. 2020. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0228828>.

BIANCHI, Sara Elis; MEIRELLES, Gabriela de Carvalho; RAABE, Victorya Benes; SOUZA, Kellen Cristhinia Borges de; BASSANI, Valquiria Linck. Achyrocline satureioides review: from the pharmacochemical diversity to the technological development of products. **Fitoterapia**, [S.L.], v. 168, p. 105537, jul. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2023.105537>.

BRAGA, Felipe C.; OJEDA, Mariah; PERDOMO, Renata T.; ALBUQUERQUE, Sérgio de; RAFIQUE, Jamal; LIMA, Dênis P. de; BEATRIZ, Adilson. Synthesis of cardanol-based 1,2,3-triazoles as potential green agents against neoplastic cells. **Sustainable Chemistry And Pharmacy**, [S.L.], v. 20, p. 100408, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scp.2021.100408>.

CAI, Xu; XIAO, Mi; ZOU, Xianwei; TANG, Jintian; HUANG, Bisheng; XUE, Hongkun. Extraction and separation of flavonoids from Malus hupehensis using high-speed countercurrent chromatography based on deep eutectic solvent. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 1641, p. 461998, mar. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461998>.

CAMPOS, Mariana Freire; MENDONÇA, Simony Carvalho; PEÑALOZA, Evelyn Maribel Condori; DE OLIVEIRA, Beatriz A. C.; ROSA, Alice S.; LEITÃO, Gilda Guimarães; TUCCI,

Amanda R.; FERREIRA, Vivian Neuza S.; OLIVEIRA, Thamara Kelcya F.; MIRANDA, Milene Dias; ALLONSO, Diego; LEITÃO, Suzana Guimarães. Anti-SARS-CoV-2 Activity of *Ampelozizyphusamazonicus* (Saracura-Mirá): Focus on the Modulation of the Spike-ACE2 Interaction by Chemically Characterized Bark Extracts by LC-DAD-APCI-MS/MS. *Molecules*, v. 28, n. 7, p. 3159, 1 abr. 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28073159>.

CAMURI, Isamara Julia; COSTA, Adriano Batista; ITO, Amando Siuiti; PAZIN, Wallance Moreira. Optical absorption and fluorescence spectroscopy studies of Artepillin C, the major component of green propolis. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [S.L.], v. 198, p. 71-77, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2018.02.059>.

CARNEIRO, M J; LÓPEZ, B G-C; LANCELLOTTI, M; FRANCHI, G C; NOWILL, Alexandre e; SAWAYA, A C H F. Evaluation of the chemical composition and biological activity of extracts of *Tetragoniscaangustula* propolis and *Schinusterebinthifolius*Raddi (*Anacardiaceae*). **Journal Of Apicultural Research**, [S.L.], v. 55, n. 4, p. 315-323, 2 nov. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2016.1243295>.

CARRIZO, Silvana Lorena; ZAMPINI, Iris Catiana; SAYAGO, Jorge Esteban; SIMIRGIOTIS, Mario Juan; BÓRQUEZ, Jorge; CUELLO, Ana Soledad; ISLA, María Inés. Antifungal activity of phytotherapeutic preparation of *Baccharis* species from argentine Puna against clinically relevant fungi. *Journal Of Ethnopharmacology*, [S.L.], v. 251, p. 112553, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2020.112553>.

CASSIMIRO, Mirele Alves; CAMPELO, Livia Maria Nunes; SILVA, Igor José Gomes Da. A contribuição da própolis no tratamento da COVID-19 (SARS-COV-2): revisãointegrativa. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 7, p. e57111730360, 4 jun. 2022. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i7.30360>.

CASTILLO-JUÁREZ, Israel; RIVERO-CRUZ, Fausto; CELIS, Heliodoro; ROMERO, Irma. Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygiumadstringens*. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 114, n. 1, p. 72-77, out. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2007.07.022>.

CASTRO, Rosane Nora; SALGUEIRO, Fernanda Barbosa. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química Nova**, [S.L.], p. 1192-1199, 1 ago. 2016. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20160136>.

CHANG, Roberto; PILO-VELOSO, Dorila; MORAIS, Sérgio A. L.; NASCIMENTO, Evandro A.. Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 18, n. 4, p. 549-556, dez. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2008000400009>.

CHAVES, Otávio Augusto; PIRES, Lucas de Oliveira; CASTRO, Rosane Nora; SANT'ANNA, Carlos Mauricio R.; NETTO-FERREIRA, José Carlos. Theoretical and Experimental Studies of the Interaction between Human Serum Albumin and Artepillin C, an Active Principle of the Brazilian Green Propolis. **Revista Virtual de Química**, [S.L.], v. 11, n. 5, p. 1562-1578, 2019. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20190109>.

CHEMISTRY AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM BACCHARIS GENUS | SPRINGERLINK. [s. d.]. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-83511-8_12. Acesso em: 7 ago. 2024.

CHUANG, Lin-Hsiang; CHEN, Wen-Chin; PEI, Wen; CHUANG, Ming-Hsi; HSU, Todd; CHUANG, Po-Chao. Purification of Artepillin C (ARC) with Anticancer Activities from Supercritical CO₂-Ethanol Extracts of Brazilian Green Propolis by Using Adsorption Column Chromatography. **Journal Of Marine Science And Technology**, [S.L.], v. 30, n. 3, p. 260-269, 15 ago. 2022. National Taiwan Ocean University. <http://dx.doi.org/10.51400/2709-6998.2582>.

COELHO, Joana; FALCÃO, Soraia I.; VALE, Nuno; ALMEIDA-MURADIAN, Ligia B.; VILAS-BOAS, Miguel. Phenolic composition and antioxidant activity assessment of southeastern and south Brazilian propolis. **Journal Of Apicultural Research**, [S.L.], v. 56, n. 1, p. 21-31, jan. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2016.1277602>.

CONTIERI, Leticia S.; MESQUITA, Leonardo M. de Souza; SANCHES, Vitor L.; CHAVES, Jaísa; PIZANI, Rodrigo S.; SILVA, Laíse C. da; VIGANÓ, Juliane; VENTURA, Sônia P.M.; ROSTAGNO, Maurício A.. Recent progress on the recovery of bioactive compounds obtained from propolis as a natural resource: processes, and applications. **Separation And Purification Technology**, [S.L.], v. 298, p. 121640, out. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2022.121640>.

CONTIERI, Leticia S.; MESQUITA, Leonardo M. de Souza; SANCHES, Vitor L.; VIGANÓ, Juliane; MARTINEZ, Julian; CUNHA, Diogo T. da; ROSTAGNO, Mauricio A.. Standardization proposal to quality control of propolis extracts commercialized in Brazil : a fingerprinting methodology using a uhplc-pda-ms/ms approach. **Food Research International**, [S.L.], v. 161, p. 111846, nov. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111846>.

CONTIGLI, Christiane; SOUZA-FAGUNDES, Elaine Maria de; ANDRADE, Warne Pedro de; TAKAHASHI, Jacqueline Aparecida; OKI, Yumi; FERNANDES, G. Wilson. Perspectives of Baccharis Secondary Metabolites as Sources for New Anticancer Drug Candidates. **Baccharis**, [S.L.], p. 427-473, 2021. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-83511-8_18.

CONWAY, Walter D. Countercurrent Chromatography: Apparatus, Theory and Applications. [S. l.]: Wiley, 1990.

COSTA, Alberto G.; YOSHIDA, Nídia C.; GARCEZ, Walmir S.; PERDOMO, Renata T.; MATOS, Maria de Fátima C.; GARCEZ, Fernanda R.. Metabolomics Approach Expands the Classification of Propolis Samples from Midwest Brazil. **Journal Of Natural Products**, [S.L.], v. 83, n. 2, p. 333-343, 7 fev. 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00783>.

COSTA, Ana Carolina Oliveira; VALESE, Andressa Camargo; MOLOGNONI, Luciano; DAGUER, Heitor; SILVA, Bibiana; BRUGNEROTTO, Patricia. Determination of Pyrrolizidine Alkaloids in Plants, Pollen, and Honey by LC-ESI-MS/MS. **Methods And Protocols In Food Science**, [S.L.], p. 275-283, 2024. Springer US. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-0716-3806-4_23.

COSTA, Fernanda das Neves; JERZ, Gerold; HEWITSON, Peter; FIGUEIREDO, Fabiana de Souza; IGNATOVA, Svetlana. Laguncularia racemosa Phenolics Profiling by Three-Phase Solvent System Step-Gradient Using High-Performance Countercurrent Chromatography with Off-Line Electrospray

Mass-Spectrometry Detection. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 8, p. 2284, 15 abr. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26082284>.

COSTA, Fernanda Das Neves; VIEIRA, Mariana Neves; GARRARD, Ian; HEWITSON, Peter; JERZ, Gerold; LEITÃO, Gilda Guimarães; IGNATOVA, Svetlana. Schinus terebinthifolius countercurrent chromatography (Part II): Intra-apparatus scale-up and inter-apparatus method transfer. *Journal of Chromatography A*, v. 1466, p. 76–83, set. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.08.054>.

COSTA, Philipe; ALMEIDA, Marília O.; LEMOS, Marivane; ARRUDA, Caroline; CASOTI, Rosana; SOMENSI, Lincon Bordignon; BOEING, Thaise; MARIOTT, Marihá; SILVA, Rita de Cássia Melo Vilhena de Andrade Fonseca da; STEIN, Bruna de Paoli. ATR EPILINA C, drupanin, aromadendrin-4'-O-methyl-ether and kaempferide from Brazilian green propolis promote gastroprotective action by diversified mode of action. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 226, p. 82-89, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2018.08.006>.

COSTA, Philipe; BOEING, Thaise; SOMENSI, Lincon Bordignon; CURY, Benhur Judah; ESPÍNDOLA, Vanessa Lopes; FRANÇA, Tauani Caroline Santos; ALMEIDA, Marília Oliveira de; ARRUDA, Caroline; BASTOS, Jairo Kenupp; SILVA, Luisa Mota da. Hydroalcoholic extract from Baccharis dracunculifolia recovers the gastric ulcerated tissue, and p-coumaric acid is a pivotal bioactive compound to this action. **Biofactors**, [S.L.], v. 45, n. 3, p. 479-489, 11 abr. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/biof.1503>.

COSTA, Philipe; SOMENSI, Lincon Bordignon; SILVA, Rita de Cássia Melo Vilhena de Andr da; MARIANO, Luísa Nathalia Bolda; BOEING, Thaise; LONGO, Bruna; PERFOLL, Ellen; SOUZA, Priscila de; GUSHIKEN, Lucas Fernando Sérgio; PELLIZZON, Cláudia Helena. Role of the antioxidant propetries in the gastroprotective and gastric healing activity promoted by Brazilian green propolis and the healing efficacy of Atr epillin C. **Inflammopharmacology**, [S.L.], v. 28, n. 4, p. 1009-1025, 19 nov. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10787-019-00649-7>

CUI, Jing; DUAN, Xueqin; KE, Liting; PAN, Xingxue; LIU, Jia; SONG, Xiaoping; MA, Wuren; ZHANG, Weimin; LIU, Yingqiu; FAN, Yunpeng. Extraction, purification, structural character and biological properties of propolis flavonoids: a review. **Fitoterapia**, [S.L.], v. 157, p. 105106, mar. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2021.105106>.

CUNHA, Marcelo Holanda da. **COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO HIDROALCOOLICO DE PRÓPOLIS PRETA**. 2018. 49 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências e Tecnologia em Sistemas Agroindustriais, Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, 2018. Disponível em: <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/handle/riufcg/2611>. Acesso em: 11 out. 2024.

DAR, Alamgir Ahmad; SANGWAN, P.L.; KUMAR, Anil. Chromatography: an important tool for drug discovery. **Journal Of Separation Science**, [S.L.], v. 43, n. 1, p. 105-119, 27 nov. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201900656>

DEMARQUE, Daniel P.; DUSI, Renata G.; SOUSA, Francisco D. M. de; GROSSI, Sophia M.; SILVÉRIO, Maira R. S.; LOPES, Norberto P.; ESPINDOLA, Laila S.. Mass spectrometry-based metabolomics approach in the isolation of bioactive natural products. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1, 23 jan. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-58046-y>

DIXON, Richard A.; ACHNINE, Lahoucine; KOTA, Parvathi; LIU, Chang-Jun; REDDY, M. S. Srinivasa; WANG, Liangjiang. The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. **Molecular Plant Pathology**, [S.L.], v. 3, n. 5, p. 371-390, 30 ago. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1364-3703.2002.00131.x>.

DONNO, D.; BOGGIA, R.; ZUNIN, P.; CERUTTI, A. K.; GUIDO, M.; MELLANO, M. G.; PRGOMET, Z.; BECCARO, G. L.. Phytochemical fingerprint and chemometrics for natural food preparation pattern recognition: an innovative technique in food supplement quality control. *Journal Of Food Science And Technology*, [S.L.], v. 53, n. 2, p. 1071-1083, 18 dez. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-015-2115-6>.

DONTHU, Naveen; KUMAR, Satish; MUKHERJEE, Debmalya; PANDEY, Nitesh; LIM, Weng Marc. How to conduct a bibliometric analysis: an overview and guidelines. **Journal Of Business Research**, [S.L.], v. 133, p. 285-296, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbusres.2021.04.070>.

DOS SANTOS MOITA, Emanuella Cristina; FROTA, Vanessa Moreira; DA SILVA MENDONÇA, Lavosyer; DOS SANTOS GOMES, Laressa Cristyney; DOS SANTOS FONTENELLE, Raquel Oliveira; COSTA, Mikaele Fernandes; FERNANDES, Jorge Alberto Bezerra; DA CUNHA, Magda Elisa Turini; GOMES, Geovany Amorim; DO VALE, Jean Parcelli Costa; BANDEIRA, Paulo Nogueira; DOS SANTOS, Hécio Silva; ZOCOLO, Guilherme Julião; RODRIGUES, Tigressa Helena Soares. Chemical Composition and Antifungal Properties of Apolar Fraction of Green Propolis from Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 32, n. 1, p. 139–143, fev. 2022. <https://doi.org/10.1007/s43450-021-00228-4>.

DUTRA, Richard Pereira; DE SOUSA, Marcos Marinho; MIGNONI, Maria Simone Pereira Maciel; DE OLIVEIRA, Karla Gabriela Mota; PEREIRA, Euzineti Borges; FIGUEREDO, Aline Santana; DA COSTA, Arthur André Castro; DIAS, Tatielle Gomes; VASCONCELOS, Cleydlenne Costa; SILVA, Lucilene Amorim; REIS, Aramys Silva; LOPES, Alberto Jorge Oliveira. Brazilian Amazon Red Propolis: Leishmanicidal Activity and Chemical Composition of a New Variety of Red Propolis. *Metabolites*, v. 13, n. 9, p. 1027, 21 set. 2023. <https://doi.org/10.3390/metabo13091027>.

EL-DAWY, Khalifa; MOHAMED, Doaa; ABDOL, Zeinab. Nanoformulations of Pentacyclic triterpenoids: chemoprevention and anticancer. **International Journal Of Veterinary Science**, [S.L.], n. 311, p. 384-391, 1 jun. 2022. Unique Scientific Publishers. <http://dx.doi.org/10.47278/journal.ijvs/2021.100>.

EL-SEEDI, Hesham R.; EL-WAHED, Aida A. Abd; ZHAO, Chao; SAEED, Aamer; ZOU, Xiaobo; GUO, Zhiming; HEGAZI, Ahmed G.; SHEHATA, Awad A.; EL-SEEDI, Haged H. R.; ALGETHAMI, Ahmed F.. A Spotlight on the Egyptian Honeybee (*Apis mellifera lamarckii*). **Animals**, [S.L.], v. 12, n. 20, p. 2749, 13 out. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ani12202749>.

ENDO, Satoshi; HOSHI, Manami; MATSUNAGA, Toshiyuki; INOUE, Takahiro; ICHIHARA, Kenji; IKARI, Akira. Autophagy inhibition enhances anticancer efficacy of artemisinin C, a cinnamic acid derivative in Brazilian green propolis. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 497, n. 1, p. 437-443, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.105>.

ESPERANDIM, Tábata Rodrigues; RIBEIRO, Arthur Barcelos; SQUARISI, Iara Silva; SOUZA, Letícia Teixeira Marcos de; SOUZA, Thiago Olimpio de; ACÉSIO, Nathália Oliveira; SANTOS, Mário Ferreira Conceição; BASTOS, Jairo Kenupp; AMBRÓSIO, Sérgio Ricardo; TAVARES,

Denise Crispim. Toxicological and chemoprevention studies of Brazilian brown propolis from *Araucaria* sp. **Journal Of Toxicology And Environmental Health**, Part A, [S.L.], v. 86, n. 21, p. 791-802, 17 ago. 2023. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2023.2243976>.

EVREN, Eylül; DURAKLI-VELIOGLU, Serap; VELIOGLU, Hasan Murat; BOYACI, Ismail Hakki. Effect of wax separation on macro- and micro-elements, phenolic compounds, pesticide residues, and toxic elements in propolis. **Food Science & Nutrition**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 1736-1748, 6 dez. 2023. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/fsn3.3866>.

FALCÃO, Soraia I.; DUARTE, Diana; DIALLO, Moustapha; SANTOS, Joana; RIBEIRO, Eduarda; VALE, Nuno; VILAS-BOAS, Miguel. Improvement of the In Vitro Cytotoxic Effect on HT-29 Colon Cancer Cells by Combining 5-Fluorouracil and Fluphenazine with Green, Red or Brown Propolis. **Molecules**, [S.L.], v. 28, n. 8, p. 3393, 12 abr. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28083393>.

FERREIRA, Joselena M; FERNANDES-SILVA, Caroline C; SALATINO, Antonio; NEGRI, Giuseppina; MESSAGE, Dejair. New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, [S.L.], v. 97, n. 11, p. 3552-3558, 8 fev. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.8210>.

FIGUEIREDO, Fabiana de Souza. **ISOLAMENTO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DAS FOLHAS DE *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd POR CROMATOGRÁFIA CONTRACORRENTE**. 2012. 166 f. Tese (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

FIGUEIREDO, Flávio Júnior Barbosa; DIAS-SOUZA, Marcus Vinícius; NASCIMENTO, Evandro Afonso; LIMA, Leonardo Ramos Paes de. PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND FLAVONOID CONTENTS OF ARTISANAL BRAZILIAN GREEN PROPOLIS. **International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences**. Minas Gerais, p. 64-68. nov. 2014. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/272998194_PHYSICOCHEMICAL_CHARACTERIZATION_AND_FLAVONOID_CONTENTS_OF_ARTISANAL_BRAZILIAN_GREEN_PROPOLIS_Original_Article. Acesso em: 11 out. 2024.

FIORINI, Ana C.; SCORZA, Carla A.; ALMEIDA, Antonio-Carlos G. de; FONSECA, Marcelo C.M.; FINSTERER, Josef; FONSECA, Fernando L.A.; SCORZA, Fulvio A.. Antiviral activity of Brazilian Green Propolis extract against SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome - Coronavirus 2) infection: case report and review. **Clinics**, [S.L.], v. 76, 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2021/e2357>.

FORMA, Ewa; BRYŚ, Magdalena. Anticancer Activity of Propolis and Its Compounds. **Nutrients**, [S.L.], v. 13, n. 8, p. 2594, 28 jul. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu13082594>.

FRANCHIN, Marcelo; FREIRES, Irlan Almeida; LAZARINI, Josy Goldoni; NANI, Bruno Dias; DA CUNHA, Marcos Guilherme; COLÓN, David Fernando; DE ALENCAR, Severino Matias; ROSALEN, Pedro Luiz. The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 153, p. 49–55, 10 jun. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.050>.

FRANCHIN, Marcelo; SALIBA, Ana Sofia Martelli Chaib; SARTORI, Alan Giovanini de Oliveira; PEREIRA NETO, Sebastião Orestes; BENSO, Bruna; IKEGAKI, Masaharu; WANG, Kai; ALENCAR, Severino Matias de; GRANATO, Daniel. Food-grade delivery systems of Brazilian

propolis from *Apis mellifera*: from chemical composition to bioactivities in vivo. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 432, p. 137175, jan. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137175>.

FREIRES, I.A.; QUEIROZ, V.C.P.P.; FURLETTI, V.F.; IKEGAKI, M.; DE ALENCAR, S.M.; DUARTE, M.C.T.; ROSALEN, P.L. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp. *Journal de Mycologie Médicale*, v. 26, n. 2, p. 122–132, jun. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.01.003>.

FRIESEN, J. Brent; MCALPINE, James B.; CHEN, Shao-Nong; PAULI, Guido F.. Countercurrent Separation of Natural Products: an update. **Journal Of Natural Products**, [S.L.], v. 78, n. 7, p. 1765–1796, 15 jul. 2015. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/np501065h>.

FRIESEN, J. Brent; PAULI, Guido F.. G.U.E.S.S.—A Generally Useful Estimate of Solvent Systems for CCC. **Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies**, [S.L.], v. 28, n. 17, p. 2777–2806, out. 2005. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10826070500225234>.

FU, Xiaoyun; ANDERSON, Mikayla; WANG, Yi; ZIMRING, James C.. LC-MS/MS-MRM-Based Targeted Metabolomics for Quantitative Analysis of Polyunsaturated Fatty Acids and Oxylipins. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 107–120, 2019. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-9236-2_7.

GALEOTTI, Fabio; CAPITANI, Federica; MACCARI, Francesca; MANTOVANI, Veronica; VOLPI, Nicola. Capillary Electrophoresis Separation of Artepillin C: determination in brazilian green propolis. **Journal Of Chromatographic Science**, [S.L.], v. 59, n. 10, p. 994–1003, 19 fev. 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/chromsci/bmab015>.

GANZERA, Markus; STURM, Sonja. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis—An update covering 2011–2016. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [S.L.], v. 147, p. 211–233, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.038>.

GARG, Prakrati; PUNDIR, Swati; ALI, Aaliya; PANJA, Sebika; CHELLAPPAN, Dinesh Kumar; DUA, Kamal; KULSHRESTHA, Saurabh; NEGI, Poonam. Exploring the potential of *Moringa oleifera* Lam in skin disorders and cosmetics: nutritional analysis, phytochemistry, geographical distribution, ethnomedicinal uses, dermatological studies and cosmetic formulations. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives Of Pharmacology**, [S.L.], v. 397, n. 6, p. 3635–3662, 6 dez. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-023-02862-2>.

GASTALDELLO, Gabriel H.; CAZELOTO, Ana Caroline V.; FERREIRA, Juliana C.; RODRIGUES, Débora Munhoz; BASTOS, Jairo Kennup; CAMPO, Vanessa L.; ZOCCAL, Karina F.; TEFÉ-SILVA, Cristiane. Green Propolis Compounds (Baccharin and p-Coumaric Acid) Show Beneficial Effects in Mice for Melanoma Induced by B16f10. **Medicines**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 20, 30 abr. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/medicines8050020>.

GAZIM, Zilda Cristiani; VALLE, Juliana Silveira; CARVALHO DOS SANTOS, Isabela; RAHAL, Isabelle Luiz; SILVA, Gabriela Catuzo Canonico; LOPES, Ana Daniela; RUIZ, Suelen Pereira; FARIA, Maria Graciela Iecher; PIAU JUNIOR, Ranulfo; GONÇALVES, Daniela Dib. Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological investigations of *Baccharis dracunculifolia* DC. (ASTERACEAE). *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, p. 1048688, 28 nov. 2022. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1048688>.

GOMES, Sara Margarida da Costa. **DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO COM DETECÇÃO**

- ELETROQUÍMICA**. 2010. 61p. Dissertação (Mestrado em Química), Curso de Química, Universidade de Coimbra, Portugal, 2010. <https://hdl.handle.net/10316/15300>
- GUÉDES, Beatriz N.; KRAMBECK, Karoline; DURAZZO, Alessandra; LUCARINI, Massimo; SANTINI, Antonello; OLIVEIRA, M. Beatriz P. P.; FATHI, Faezeh; SOUTO, Eliana B.. Natural antibiotics against antimicrobial resistance: sources and bioinspired delivery systems. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 55, n. 3, p. 2753-2766, 18 jun. 2024. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s42770-024-01410-1>.
- GUERRA, Ângela R.; PAULINO, Ana F.; CASTRO, Maria M.; OLIVEIRA, Helena; DUARTE, Maria F.; DUARTE, Iola F.. Triple Negative Breast Cancer and Breast Epithelial Cells Differentially Reprogram Glucose and Lipid Metabolism upon Treatment with Triterpenic Acids. **Biomolecules**, [S.L.], v. 10, n. 8, p. 1163, 8 ago. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biom10081163>.
- GUILHAUS, M.; SELBY, D.; MLYNSKI, V.. Orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, [S.L.], v. 19, n. 2, p. 65-107, 2000. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2787\(2000\)19:23.0.co;2-e](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1098-2787(2000)19:23.0.co;2-e).
- GULER, Halil Ibrahim; TATAR, Gizem; YILDIZ, Oktay; BELDUZ, Ali Osman; KOLAYLI, Sevgi. Investigation of potential inhibitor properties of ethanolic propolis extracts against ACE-II receptors for COVID-19 treatment by molecular docking study. **Archives Of Microbiology**, [S.L.], v. 203, n. 6, p. 3557-3564, 5 maio 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-021-02351-1>.
- GUO, Yuru; TONG, Shengqiang; ZHANG, Keqing; YAN, Jizhong. Recent progress in separation prediction of counter-current chromatography. **Journal Of Separation Science**, [S.L.], v. 44, n. 1, p. 6-16, 19 out. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.202000473>.
- HALVACI, Ebru; KOZAK, Teslime; GÜL, Mert; KARS, Hatice; BAYAT, Ramazan; SEN, Fatih. Journey to the sweet world of beekeeping: historical development, honey harvesting and overview of bee products. **Journal Of Scientific Reports-B**, [s. l.], v. 9, p. 39-58, 2023. Disponível em: <https://dergipark.org.tr/en/pub/jsrb>. Acesso em: 29 set. 2024.
- HASEGAWA, Tokio; OSAKA, Mayo; MIYAMAE, Yusaku; NISHINO, Katsutoshi; ISODA, Hiroko; KAWADA, Kiyokazu; NEFFATI, Mohamed; IRIE, Kazuhiro; NAGAO, Masaya. Two Types of PPAR γ Ligands Identified in the Extract of *Artemisia campestris*. **Chemistry**, [S.L.], v. 3, n. 2, p. 647-657, 23 maio 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/chemistry3020045>.
- HATTORI, Hisanori; OKUDA, Kensuke; MURASE, Tetsuji; SHIGETSURA, Yuki; NARISE, Kosuke; SEMENZA, Gregg L.; NAGASAWA, Hideko. Isolation, identification, and biological evaluation of HIF-1-modulating compounds from Brazilian green propolis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 19, n. 18, p. 5392-5401, set. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2011.07.060>.
- HELENO, Sandrina A.; CAROCHO, Marcio; REIS, Filipa S.; PIRES, Tânia C. S. P.; PINTADO, Manuela; FERREIRA, Isabel C. F. R.; BARROS, Lillian. Plant Extracts and SARS-CoV-2: research and applications. **Life**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 386, 31 jan. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/life13020386>.
- HEMSHEKHAR, Mahadevappa; SANTHOSH, Martin Sebastin; KEMPARAJU, Kempaiah; GIRISH, KesturuS.. Emerging Roles of Anacardic Acid and Its Derivatives: a pharmacological

overview. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, [S.L.], v. 110, n. 2, p. 122-132, 22 dez. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00833.x>.

HERRERA-LÓPEZ, Mercedes; RUBIO-HERNÁNDEZ, Evelyn; RICHOMME, Pascal; SCHINKOVITZ, Andreas; CALVO-IRABIÉN, Luz; RODRÍGUEZ, Luis Peña. Resorcinolic Lipids from Yucatecan Propolis. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [S.L.], p. 186-192, 2020. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20190156>.

HIRATA, Yoko; MOTOYAMA, Masanari; KIMURA, Shintaro; TAKASHIMA, Madoka; IKAWA, Takanori; OH-HASHI, Kentaro; KAMATARI, Yuji O. Artepillin C, a major component of Brazilian green propolis, inhibits endoplasmic reticulum stress and protein aggregation. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 912, p. 174572, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174572>.

HOSSAIN, Rajib; QUISPE, Cristina; KHAN, Rasel Ahmed; SAIKAT, Abu Saim Mohammad; RAY, Pranta; ONGALBEK, Damira; YESKALIYEVA, Balakyz; JAIN, Divya; SMERIGLIO, Antonella; TROMBETTA, Domenico. Propolis: an update on its chemistry and pharmacological applications. **Chinese Medicine**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 1-60, 26 ago. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13020-022-00651-2>.

HUANG, Xin-Yi; IGNATOVA, Svetlana; HEWITSON, Peter; DI, Duo-Long. An overview of recent progress in elution mode of counter current chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 77, p. 214–225, mar. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.006>.

ISHIDA, Vanna Francine de Castro; NEGRI, Giuseppina; SALATINO, Antonio; BANDEIRA, Maria Fulgência C.L.. A new type of Brazilian propolis: prenylated benzophenones in propolis from amazon and effects against cariogenic bacteria. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 125, n. 3, p. 966-972, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.089>.

ITO, Takashi; DEGAWA, Tomomi; OKUMURA, Nobuaki. Brazilian green propolis prevent Alzheimer's disease-like cognitive impairment induced by amyloid beta in mice. **Bmc Complementary Medicine And Therapies**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 1, 17 nov. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-023-04247-7>.

ITO, Yoichiro. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 1065, n. 2, p. 145-168, fev. 2005.

JANG, Eungyeong; KIM, Bum-Joon; LEE, Kyung-Tae; INN, Kyung-Soo; LEE, Jang-Hoon. A Survey of Therapeutic Effects of Atr emisia capillarisin Liver Diseases. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 2015, p. 1-10, 2015. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/728137>.

JERZ, Gerold; ELNAKADY, Yasser A; BRAUN, André; JÄCKEL, Kristin; SASSE, Florenz; AL GHAMDI, Ahmad A; OMAR, Mohamed O M; WINTERHALTER, Peter. Preparative mass-spectrometry profiling of bioactive metabolites in saudi-arabian propolis fractionated by high-speed countercurrent chromatography and off-line atmospheric pressure chemical ionization mass-spectrometry injection - PUBMED. [s. d.]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24831423/>. Acesso em: 7 ago. 2024.

JERZ, Gerold; WINTERHALTER, Peter. The 10th international conference on countercurrent chromatography held at Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, Germany, August 1–

- 3, 2018. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 1617, p. 460698, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460698>.
- JOURNAL OF EXPERIMENTAL AND CLINICAL MEDICINE » SUBMISSION » THE EFFICACY OF PROPOLIS EXTRACTS AS A FOOD SUPPLEMENT IN PATIENTS WITH COVID-19. [s. d.]. Disponível em: <https://dergipark.org.tr/en/pub/omujecm/issue/80299/1230945>. Acesso em: 7 ago. 2024.
- JUODEIKAITÈ, Dovaldè; šILIUS, Modestas; BRIEDIS, Vitalis. Preparation of Aqueous Propolis Extracts Applying Microwave-Assisted Extraction. **Processes**, [S.L.], v. 10, n. 7, p. 1330, 7 jul. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pr10071330>.
- KAMTO, Eutrophe Le Doux; CARVALHO, Tatiane S.C.; MBING, Joséphine Ngo; MATENE, Marie C.N.; PEGNYEMB, Dieudonné E.; LEITÃO, Gilda G. Alternating isocratic and step gradient elution high-speed counter-current chromatography for the isolation of minor phenolics from *Ormocarpum kirkii* bark. **Journal of Chromatography A**, v. 1480, p. 50–61, jan. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.12.026>.
- KARDAR, M.N.; ZHANG, T.; COXON, G.D.; WATSON, D.G.; FEARNLEY, J.; SEIDEL, V.. Characterisation of triterpenes and new phenolic lipids in Cameroonian propolis. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 106, p. 156-163, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.07.016>.
- KASOTE, Deepak; BANKOVA, Vassya; VILJOEN, Alvaro M.. Propolis: chemical diversity and challenges in quality control. **Phytochemistry Reviews**, [S.L.], v. 21, n. 6, p. 1887-1911, 24 maio 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11101-022-09816-1>.
- KATIYAR, Madhurendra K.; DHAKAD, Govind Kumar; SHIVANI; ARORA, Sahil; BHAGAT, Srikant; ARORA, Taruna; KUMAR, Raj. Synthetic strategies and pharmacological activities of culifolin and its derivatives: an overview. **Journal Of Molecular Structure**, [S.L.], v. 1263, p. 133012, set. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.133012>.
- KHAN, Bilal Muhammad; LIU, Yang. High speed counter current chromatography: overview of solvent-system and elution-mode. **Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies**, [S.L.], v. 41, n. 10, p. 629-636, 15 jun. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10826076.2018.1499528>.
- KHOSHANDAM, Arian; HEDAYATIAN, Amirhosein; MOLLAZADEH, Amirreza; RAZAVI, Bibi Marjan; HOSSEINZADEH, Hossein. Propolis and its constituents against cardiovascular risk factors including obesity hypertension atherosclerosis diabetes and dyslipidemia: a comprehensive review. **Iranian Journal Of Basic Medical Sciences**, [S.L.], v. 26, n. 8, p. 853, ago. 2023. Mashhad University of Medical Sciences. <http://dx.doi.org/10.22038/ijbms.2023.67793.14835>.
- KOSTANYAN, Artak A.; VOSHKIN, Andrey A.; BELOVA, Vera V.. Analytical, Preparative, and Industrial-Scale Separation of Substances by Methods of Countercurrent Liquid-Liquid Chromatography. **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 24, p. 6020, 18 dez. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25246020>.
- KULAKSIZ, Betül Değer; DEĞER, Orhan; ATAYOĞLU, Ali Timuçin; SEV L, Ergün; KULAKSIZ, Deniz. The efficacy of propolis extracts as a food supplement in patients with COVID-19. **Journal Of Experimental And Clinical Medicine**, Türkiye, v. 40, n. 3, p. 443, 2023. Disponível

em: <https://acikerisim.medipol.edu.tr/server/api/core/bitstreams/3a0d3b22-2341-4a94-8999-1c43ae707a1f/content>. Acesso em: 11 out. 2024.

KUMAR, Vipul; SARI, Anissa Nofita; MEIDINNA, Hazna Noor; KAUL, Ashish; BASU, Brohmomoy; ISHIDA, Yoshiyuki; TERAOKA, Keiji; KAUL, Sunil C.; VRATI, Sudhanshu; SUNDAR, Durai. Computational and experimental evidence of the anti-COVID-19 potential of honeybee propolis ingredients, caffeic acid phenethyl ester and Artepilina. **Phytotherapy Research**, [S.L.], v. 37, n. 9, p. 3651-3654, 9 fev. 2023. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.7717>.

LAZOVIĆ, Mila; IVKOVIĆ, Đurđa; JANKOV, Milica; DIMKIĆ, Ivica; JANAKIEV, Tamara; TRIFKOVIĆ, Jelena; MILOJKOVIĆ-OPSENICA, Dušanka; RISTIVOJEVIĆ, Petar. Enhancement of propolis food preservation and functional ingredient characteristics by natural eutectic solvents extraction of phytochemicals. **Food Bioscience**, [S.L.], v. 57, p. 103467, fev. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103467>.

LEITÃO, Gilda Guimarães; COSTA, Fernanda das Neves; FIGUEIREDO, Fabiana de Souza. Strategies of Solvent System Selection for the Isolation of Natural Products by Countercurrent Chromatography. **Medicinal Plants**, [S.L.], p. 641-668, 3 jul. 2012. Science Publishers. <http://dx.doi.org/10.1201/b12527-22>.

LEITÃO, Gilda Guimarães; LEAL, Carla Monteiro; MENDONÇA, Simony Carvalho; PEREDA-MIRANDA, Rogelio. Purification of Alkaloids by Countercurrent Chromatography. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 31, n. 5, p. 625-647, 7 jul. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s43450-021-00163-4>.

LEITÃO, Suzana Guimaraes; LEITÃO, Gilda Guimarães; VICCO, Douglas K.T.; PEREIRA, João Paulo Barreto; DE MORAIS SIMÃO, Gustavo; OLIVEIRA, Danilo R.; CELANO, Rita; CAMPONE, Luca; PICCINELLI, Anna Lisa; RASTRELLI, Luca. Counter-current chromatography with off-line detection by ultra high performance liquid chromatography/high resolution mass spectrometry in the study of the phenolic profile of Lippiaaoriganoides. **Journal of Chromatography A**, v. 1520, p. 83–90, out. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.09.004>.

LI, Lingxi; ZHAO, Jian; YANG, Tingting; SUN, Baoshan. High-speed countercurrent chromatography as an efficient technique for large separation of plant polyphenols: a review. **Food Research International**, [S.L.], v. 153, p. 110956, mar. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2022.110956>.

LI, Mengnan; ZHANG, Limin; YU, Jiahui; WANG, Xiaoxiao; CHENG, Le; MA, Zhaowu; CHEN, Xiaoguang; WANG, Lingzhi; GOH, Boon Cher. AKR1C3 in carcinomas: from multifaceted roles to therapeutic strategies. **Frontiers In Pharmacology**, [S.L.], v. 15, p. 1-18, 8 mar. 2024. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2024.1378292>.

LIANG, Junling; MENG, Jie; WU, Dingfang; GUO, Mengzhe; WU, Shihua. A novel 9×9 map-based solvent selection strategy for targeted counter-current chromatography isolation of natural products. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 1400, p. 27-39, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.04.043>.

LIM, Weng Marc; KUMAR, Satish; DONTU, Naveen. How to combine and clean bibliometric data and use bibliometric tools synergistically: guidelines using metaverse research. **Journal Of Business Research**, [S.L.], v. 182, p. 114760, set. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbusres.2024.114760>.

LIMA, S.G. de; FEITOSA, C.M.; CITO, A.M.G.L.; MOITA NETO, J.M.; LOPES, J.A.D.; LEITE, A.s.; BRITO, M.C.; DANTAS, S.M.M.; CAVALCANTE, A.A.C. Melo. Effects of immature cashew nut-shell liquid (*Anacardium occidentale*) against oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae* and inhibition of acetylcholinesterase activity. **Genetics And Molecular Research**, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 806-818, 2008. Genetics and Molecular Research. <http://dx.doi.org/10.4238/vol7-3gmr473>.

LIN, Tingting; ZHU, Beibei; WEN, Mengyi; MA, Chenlei; TONG, Shengqiang. Retention correlation and orthogonality between reversed phase countercurrent chromatography and liquid chromatography based on solvent strength. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 1707, p. 464322, set. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464322>

LOPEZ, Begoña Gimenez-Cassina; MARCUCCI, Maria Cristina; ROCCO, Silvana Aparecida; SFORÇA, Maurício Luís; EBERLIN, Marcos Nogueira; HEWITSON, Peter; IGNATOVA, Svetlana; SAWAYA, Alexandra Christine Helena Frankland. Preparative Fractionation of Brazilian Red Propolis Extract Using Step-Gradient Counter-Current Chromatography. *Molecules*, v. 29, n. 12, p. 2757, 9 jun. 2024. <https://doi.org/10.3390/molecules29122757>.

LUAN, Xiu-Mei; SUN, Qi-Hui; YANG, Yong; RONG, Rong; WANG, Xu. Improvement of polarity-based solvent system for countercurrent chromatography in the guidance of solvent selectivity: n-hexane/ethyl acetate/ alcohol solvents/water as an example. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 1736, p. 465389, nov. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2024.465389>.

IWA, Shigenori; YONEDA, Masahiro; SHIBATA, Ikoi; KANAEDA, Jun; HAMASAKA, Tomoko; NAKAYAMA, Tsutomu. Direct Evidence for the Plant Origin of Brazilian Propolis by the Observation of Honeybee Behavior and Phytochemical Analysis. **Chemical And Pharmaceutical Bulletin**, Japão, v. 51, n. 6, p. 740-742, jun. 2003.

MACHADO, Bruna Aparecida Souza; SILVA, Rejane Pina Dantas; BARRETO, Gabriele de Abreu; COSTA, Samantha Serra; SILVA, Danielle Figuerêdo da; BRANDÃO, Hugo Neves; ROCHA, José Luiz Carneiro da; DELLAGOSTIN, Odir Antônio; HENRIQUES, João Antônio Pegas; UMSZAGUEZ, Marcelo Andres. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. **Plos One**, [S.L.], v. 11, n. 1, e0145954, 8 jan. 2016. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0145954>.

MACHADO, Christiane Schineider; MOKOCHINSKI, João Benhur; LIRA, Tatiana Onofre de; OLIVEIRA, Fátima de Cassia Evangelista de; CARDOSO, Magda Vieira; FERREIRA, Roseane Guimarães; SAWAYA, Alexandra Christine Helena Frankland; FERREIRA, Antonio Gilberto; PESSOA, Cláudia; CUESTA-RUBIO, Osmany. Comparative Study of Chemical Composition and Biological Activity of Yellow, Green, Brown, and Red Brazilian Propolis. Evidence-Based Complementary And Alternative **Medicine**, [S.L.], v. 2016, n. 1, jan. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6057650>.

MALLA, Sailesh; KOFFAS, Mattheos A. G.; KAZLAUSKAS, Romas J.; KIM, Byung-Gee. Production of 7-O-Methyl Aromadendrin, a Medicinally Valuable Flavonoid, in *Escherichia coli*. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 78, n. 3, p. 684-694, fev. 2012. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.06274-11>.

MANI, Janice S.; JOHNSON, Joel B.; STEEL, Jason C.; BROSZCZAK, Daniel A.; NEILSEN, Paul M.; WALSH, Kerry B.; NAIKER, Mani. Natural product-derived phytochemicals as potential agents against coronaviruses: a review. **Virus Research**, [S.L.], v. 284, p. 197989, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2020.197989>.

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, [S.L.], v. 26, n. 2, p. 83-99, 1995. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:19950202>.

MARCUCCI, Maria Cristina; CUNHA, Ildenize B. S.; SANCHEZ, Elisabete M. S.; GONÇALVES, Carolina Passarelli; CEDEÑO-PINOS, Cristina; BAÑÓN, Sancho. Analysis of Brazilian Propolis by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Thermal Gravimetric Analysis (TGA). Characteristics of Crude Resin, Ethanolic Extracts, Wax and Isolated Compounds. **Bee World**, [S.L.], v. 99, n. 3, p. 82-88, 7 jun. 2022. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/0005772x.2022.2076973>.

MARCUCCI, Maria Cristina; OLIVEIRA, Laís Farias Azevedo de Magalhães; GONÇALVES, Carolina Passarelli; CARVALHO, Claudemir de. ESPECTROSCOPIA UV-VIS E REAÇÃO COM O RADICAL DPPH PARA A DETECÇÃO DE FLAVONOIDES E DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS. **Revista Eletrônica Ciências Exatas**, [s. l], v. 1, n. 1, p. 1-9, 2020. Disponível em: <https://www.revistaeletronicafunvic.org/index.php/c14ffd12/article/view/190>. Acesso em: 11 out. 2024.

MARCUCCI, Maria Cristina; SAWAYA, Alexandra C H F; CUSTODIO, A.R.; PAULINO, Niraldo; EBERLIN, M.N. HPLC and ESI-MS typification: New approaches for natural therapy with Brazilian propolis. **Scientific Evidence Of The Use Of Propolis In Ethnomedicine**, Campinas, v. 1, p. 33-54, 2008.

MARINHO, Leonardo de Freitas; SGANZERLA, William Gustavo; FERREIRA, Vanessa Cosme; MORENO, Juver Andrey Jimenez; ROSTAGNO, Mauricio Ariel; FORSTER-CARNEIRO, Tânia. Advances in green extraction methods, biological properties, and applications of betanin and vitexin: an updated review and bibliometric analysis. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, [S.L.], v. 51, p. 102744, ago. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102744>.

MAROOOF, Kashif; JIN, Yim Yee; CHING, Siew Liang; GAN, Siew Hua. Medicinal Benefits of Propolis. **Honey: Composition And Health Benefits, First**, [S.L.], p. 278-301, 24 mar. 2023. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/9781119113324.ch21>.

MARSTON, Andrew. Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 68, n. 22-24, p. 2786-2798, nov. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.08.004>.

MARTIN, Bianca Aparecida. **AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE E SEGURANÇA DE UMA NOVA FORMULAÇÃO DE COLD CREAM EM PACIENTES PORTADORES DE DERMATITE ATÓPICA**. 2019. Dissertação (Mestrado em Medicamentos e Cosméticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019. doi:10.11606/D.60.2020.tde-18122019-163757. Acesso em: 2024-10-14.

MARUYAMA, Hiroe; SUMITOU, Yoshiki; SAKAMOTO, Takashi; ARAKI, Yoko; HARA, Hideaki. Antihypertensive Effects of Flavonoids Isolated from Brazilian Green Propolis in Spontaneously Hypertensive Rats. **Biological And Pharmaceutical Bulletin**, [S.L.], v. 32, n. 7, p. 1244-1250, 2009. Pharmaceutical Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.32.1244>.

MATOS, F.J.A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. 3 edição, UFC, 2009.

MECCATTI, Vanessa Marques; MARTINS, Karoline Moura Chagas; RAMOS, Lucas de Paula; PEREIRA, Thaís Cristine; MENEZES, Raquel Teles de; MARCUCCI, Maria Cristina; HASNA, Amjad Abu; OLIVEIRA, Luciane Dias de. Synergistic Antibiofilm Action of Cinnamomum verum and Brazilian Green Propolis Hydroethanolic Extracts against Multidrug-Resistant Strains of Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa and Their Biocompatibility on Human Keratinocytes. **Molecules**, [S.L.], v. 28, n. 19, p. 6904, 1 out. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28196904>.

MEIRELLES, Lyvia Eloiza de Freitas; CARVALHO, Analine Rosa Barquez de Assis; DAMKE, Gabrielle Marconi Zago Ferreira; SOUZA, Raquel Pantarotto; DAMKE, Edilson; BONFIM-MENDONÇA, Patrícia de Souza; DEMBOGURSKI, Djaceli Sampaio de Oliveira; SILVA, Denise Brentan da; CONSOLARO, Marcia Edilaine Lopes; SILVA, Vania Ramos Sela da. Antitumoral Potential of ARTEPILINA C, a Compound Derived from Brazilian Propolis, against Breast Cancer Cell Lines. **Anti-Cancer Agents In Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 24, n. 2, p. 117-124, jan. 2024. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/0118715206270534231103074433>.

MELLO, Leonardo Luiz Oliveira de; LEITÃO, Gilda Guimarães. Solvent Systems Used in Countercurrent Chromatography for the Purification of Diterpene Compounds. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 34, n. 1, p. 23-34, 17 ago. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s43450-023-00432-4>.

MENDONÇA, Simony Carvalho; PAULA, Leonardo Rangel de; SOARES, Deivid Costa; NASCIMENTO, Alan Menezes do; CAMPOS, Mariana Freire; GOMES, Brendo Araujo; FONSECA, Thamirys Silva da; SIMAS, Rosineide Costa; SARAIVA, Elvira Maria; LEITÃO, Suzana Guimarães. Bioassay-Guided Fractionation of Anti-Leishmania Amazonensis Extracts from Ampelozizyphus Amazonicus by High-Speed Countercurrent Chromatography. **Chemistry & Biodiversity**, [S.L.], v. 21, n. 11, p. 1, 20 set. 2024. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.202400669.cowa>

MESSERLI, Shanta M.; AHN, Mok-Ryeon; KUNIMASA, Kazuhiro; YANAGIHARA, Miyako; TATEFUJI, Tomoki; HASHIMOTO, Ken; MAUTNER, Victor; UTO, Yoshihiro; HORI, Hitoshi; KUMAZAWA, Shigenori; KAJI, Kazuhiko; OHTA, Toshiro; MARUTA, Hiroshi. Artepillin C (ARC) in Brazilian green propolis selectively blocks oncogenic PAK1 signaling and suppresses the growth of NF tumors in mice. *Phytotherapy Research*, v. 23, n. 3, p. 423–427, mar. 2009. <https://doi.org/10.1002/ptr.2658>.

MESSIAS, Anny Caroline; LOPES, Gabriela Fonseca; OLIVEIRA, Rafaela de Souza; HORTA, Jacques Gabriel Álvares; OLIVEIRA, Déborah Campos; CORREA, Paula Brumana; CALIGIORNE, Rachel Basques; BINDA, Nancy Scardua; FIGUEIREDO, Sônia Maria de. Comparison of Physical and Chemical Properties of Green and Brown Brazilian Propolis Collected in Minas Gerais, Brazil. **Chemistry & Biodiversity**, [S.L.], v. 20, n. 6, 23 maio 2023. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.202300382>.

MIKAMI, Norihisa; TANI, Hiroko; KAWAKAMI, Ryoji; SUGIMOTO, Atsushi; SAKAGUCHI, Shimon; IKUTA, Tomoki. Brazilian green propolis promotes TNFR2 expression on regulatory T cells. **Food Science & Nutrition**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 3200-3208, 7 abr. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/fsn3.2281>.

MILATO, Jônatas Vicente. **USO DA CROMATOLOGRAFIA CONTRACORRENTE COMO UM EXTRATOR SELETIVO PARA O DITERPENÓ 7 α -HIDROXIROILEANONA DE *Tetradenia riparia***. 2015. 133 f. Tese (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

MILATO, Jonatas Vicente; SILVA, Raphael Salles Ferreira; FIGUEIREDO, Fabiana de Souza; AZEVEDO, Debora de Almeida; RIBEIRO, Carlos Alexandre Bulchi; LEITÃO, Gilda Guimarães. Use of counter-current chromatography as a selective extractor for the diterpenequinone 7 α -hydroxyroyleanone from *Tetradenia riparia*. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 1537, p. 135-140, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2018.01.020>.

MIOC, Marius; MILAN, Andreea; MALÎȚA, Daniel; MIOC, Alexandra; PRODEA, Alexandra; RACOVICIANU, Roxana; GHIULAI, Roxana; CRISTEA, Andreea; CĂRUNȚU, Florina; ȘOICA, Codruța. Recent Advances Regarding the Molecular Mechanisms of Triterpenic Acids: a review (part i). **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 14, p. 7740, 13 jul. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23147740>.

MISHIMA, Satoshi; ONO, Yosuke; ARAKI, Yoko; AKAO, Yukihiro; NOZAWA, Yoshinori. Two Related Cinnamic Acid Derivatives from Brazilian Honey Bee Propolis, Baccharin and Drupanin, Induce Growth Inhibition in Allografted Sarcoma S-180 in Mice. **Biological And Pharmaceutical Bulletin**, [S.L.], v. 28, n. 6, p. 1025-1030, 2005. Pharmaceutical Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.28.1025>.

MITRA, Debarpan; SAHA, Depanwita; DAS, Gaurav; MUKHERJEE, Rimi; BANERJEE, Samir; ALAM, Neyaz; MUSTAFI, Saunak Mitra; NATH, Patra; MAJUMDER, Anuj; MAJUMDER, Biswanath. Lupeol synergizes with 5-fluorouracil to combat c-MET/EphA2 mediated chemoresistance in triple negative breast cancer. **Isience**, [S.L.], v. 26, n. 12, p. 108395, dez. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.isci.2023.108395>.

MIZE, Brittney K.; SALVI, Amrita; REN, Yulin; BURDETTE, Joanna E.; FUCHS, James R.. Discovery and development of botanical natural products and their analogues as therapeutics for ovarian cancer. **Natural Product Reports**, [S.L.], v. 40, n. 7, p. 1250-1270, 2023. **Royal Society of Chemistry (RSC)**. <http://dx.doi.org/10.1039/d2np00091a>.

MOITA, Emanuella Cristina dos Santos; FROTA, Vanessa Moreira; MENDONÇA, Lavosyer da Silva; GOMES, Laressa Cristyne dos Santos; FONTENELLE, Raquel Oliveira dos Santos; COSTA, Mikaele Fernandes; FERNANDES, Jorge Albetrio Bezerra; CUNHA, Magda Elisa Turini da; GOMES, Geovany Amorim; VALE, Jean Parcelli Costa do. Chemical Composition and Antifungal Properties of Apolar Fraction of Green Propolis from Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 139-143, 18 jan. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s43450-021-00228-4>.

MORAIS, Selene; SILVA, Katherine; ARAUJO, Halisson; VIEIRA, Icaro; ALVES, Daniela; FONTENELLE, Raquel; SILVA, Atrur. Anacardic Acid Constituents from Cashew Nut Shell Liquid: nmr characterization and the effect of unsaturation on its biological activities. **Pharmaceuticals**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 31, 16 mar. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ph10010031>.

MUHIRE, Jules; SUN, Xiao; ZHANG, Fu-Xin; HUANG, Xin-Yi; DI, Duo-Long. Recent trends in multidimensional countercurrent chromatography. **Journal Of Separation Science**, [S.L.], v. 47, n. 3, p. 1, fev. 2024. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.202300768>.

NAFADY, Alaa Mohamed; EL-SHANAWANY, Mohamed Ahmed; MOHAMED, Mahmoud Hamed; HASSANEAN, Hashim Abdel-Halim; NOHARA, Toshihiro; YOSHIMITSU, Hitoshi; ONO, Masateru; SUGIMOTO, Hiroyuki; DOI, Shima; SASAKI, Ken. Cyclodextrin-Enclosed

Substances of Brazilian Propolis. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, [S.L.], v. 51, n. 8, p. 984-985, 2003. Pharmaceutical Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1248/cpb.51.984>.

NAINU, Firzan; MASYITA, Ayu; BAHAR, Muh. Akbar; RAIHAN, Muhammad; PROVA, Shajuthi Rahman; MITRA, Saikat; EMRAN, Talha Bin; SIMAL-GANDARA, Jesus. Pharmaceutical Prospects of Bee Products: special focus on anticancer, antibacterial, antiviral, and antiparasitic properties. **Antibiotics**, [S.L.], v. 10, n. 7, p. 822, 6 jul. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics10070822>.

NEGRI, Giuseppina; SILVA, Caroline Cristina Fernandes; COELHO, Guilherme Rabelo; NASCIMENTO, Roberto Manoel do; MENDONÇA, Ronaldo Zucatelli. Cardanols detected in non-polar propolis extracts from *Scaptotrigona aff. postica* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Brazilian Journal Of Food Technology**, [S.L.], v. 22, p. 1, 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.26518>.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M.. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal Of Natural Products*, [S.L.], v. 83, n. 3, p. 770-803, 12 mar. 2020. **American Chemical Society (ACS)**. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>.

NICHOLS. 4.8: Acid-Base Extraction. 21 out. 2017. **Chemistry LibreTexts**. Disponível em: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Organic_Chemistry_Lab_Techniques_\(Nichols\)/04%3A_Extraction/4.08%3A_Acid-Base_Extraction](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Organic_Chemistry_Lab_Techniques_(Nichols)/04%3A_Extraction/4.08%3A_Acid-Base_Extraction). Acesso em: 16 jun. 2024.

O'ZAROWSKI, Marcin; KARPINSKI, Tomasz M.. The Effects of Propolis on Viral Respiratory Diseases. **Molecules**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 359, 01 jan. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36615554/>. Acesso em: 11 out. 2024.

OIRAM FILHO, Francisco; ALCÂNTRA, Daniel Barbosa; RODRIGUES, Tigressa Helena Soares; SILVA, Lorena Mara Alexandre; SILVA, Ebenezer de Oliveira; ZOCCOLO, Guilherme Julião; BRITO, Edy Sousa de. Development and Validation of a Reversed Phase HPLC Method for Determination of Anacardic Acids in Cashew (*Anacardium occidentale*) Nut Shell Liquid. **Journal of Chromatographic Science**, [S.L.], v. 56, n. 4, p. 300–306, 2018. <http://dx.doi.org/10.1093/chromsci/bmx111>.

OIRAM FILHO, Francisco; MITRI, Morgana Pereira; ZOCCOLO, Guilherme Julião; CANUTO, Kirley Marques; BRITO, Edy Sousa de. Validation of a Method for Anacardic Acid Quantification in Cashew Peduncles via High-Performance Liquid Chromatography Coupled to a Diode-Array Detector. **Foods**, [S.L.], v. 12, n. 14, p. 2759, 20 jul. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/foods12142759>.

OLIVEIRA, Daniela Moura de; BASTOS, Deborah Helena Markowicz. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, [S.L.], v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422011000600023>.

OLIVEIRA, Giovani Chiovatto Cláudio de. **PRÓPOLIS: UMA REVISÃO SOBRE ORIGEM, CARACTERÍSTICAS, COMPOSIÇÃO, APLICAÇÃO E PERSPECTIVAS**. 2023. 35 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2023. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/244446>. Acesso em: 11 out. 2024.

OLIVEIRA, Larissa Costa; RIBEIRO, Victor Pena; SANTOS, Mario Ferreira Conceição; OLIVEIRA, Nicoli Dias; ZAGO, Matheus Henrique Marques; ALBERNAZ, Iaciara Luana de

Xavier; VENEZIANI, Rodrigo Cassio Sola; BASTOS, Jairo Kenupp; MAGALHÃES, Lizandra Guidi; AMBRÓSIO, Sérgio Ricardo. Leishmanial activity of Brazilian brown propolis and its diterpenes. **Natural Product Research**, [S.L.], p. 1-5, 2 nov. 2023. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2023.2277351>.

OLIVEIRA, Pollyanna de; LIMA, Ildercílio de Souza; MUNARI, Carla; BASTOS, Jairo; SILVA FILHO, Ademar da; TAVARES, Denise. Comparative Evaluation of Antiproliferative Effects of Brazilian Green Propolis, Its Main Source *Baccharis dracunculifolia*, and Their Major Constituents Atr epillin C and Baccharin. **Planta Medica**, [S.L.], v. 80, n. 06, p. 490-492, 31 mar. 2014. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1368298>.

OLIVEIRA, Thelmo Gonçalves de Souza. **BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM PRÓPOLIS VERDE E SUA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, p. 1-63, 2023. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/55863>. Acesso em: 05 out. 2024.

OMAR, Rowida; EL-SALAM, Mohamed Abd; ELSBAEY, Marwa; HASSAN, Madiha. Fourteen immunomodulatory alkaloids and two prenylated phenylpropanoids with dual therapeutic approach for COVID-19: molecular docking and dynamics studies. **Journal Of Biomolecular Structure And Dynamics**, [S.L.], v. 42, n. 5, p. 2298-2315, 28 abr. 2023. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2023.2204973>.

OSMAN, Samir M.; ABDEL-MEGIED, Ahmed M.; ELDAIN, Mohammed H. Zain; HALEEMA, Simimole; GOPINATH, Chithra; SUMALEKSHMY, Sarojini Amma; ABOUL-ENEIN, Hassan Y.. A highly sensitive GC–MS method for simultaneous determination of anacardic acids in cashew (*Anacardium occidentale*) nut shell oil in the presence of other phenolic lipid derivatives. **Biomedical Chromatography**, [S.L.], v. 33, n. 11, p. 1, 20 ago. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bmc.4659>.

OTA, Atsumi; KAWAI, Mina; KUDO, Yudai; SEGAWA, Jin; HOSHI, Manami; KAWANO, Shinya; YOSHINO, Yuta; ICHIHARA, Kenji; SHIOTA, Masaki; FUJIMOTO, Naohiro. Artepillin C overcomes apalutamide resistance through blocking androgen signaling in prostate cancer cells. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [S.L.], v. 735, p. 109519, fev. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2023.109519>.

OŻAROWSKI, Marcin; KARPIŃSKI, Tomasz M. The Effects of Propolis on Viral Respiratory Diseases. *Molecules* (Basel, Switzerland), v. 28, n. 1, p. 359, 1 jan. 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28010359>.

PACHECO, Emily Barbosa Alves; MARTINS, Dyovana Sena; ROCHA, Marina Pereira. Atividade antibacteriana in vitro de extratos etanólicos e aquosos de *Schinus terebinthifolia* (aroeira-vermelha) e *Cymbopogon nardus* (citronela) frente à *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal Of Health Review**, [S.L.], v. 5, n. 6, p. 24872-24888, 19 dez. 2022. South Florida Publishing LLC. <http://dx.doi.org/10.34119/bjhrv5n6-236>.

PAN, Yuanjiang; LU, Yanbin. Recent Progress in Countercurrent Chromatography. **Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies**, [S.L.], v. 30, n. 5-7, p. 649-679, fev. 2007. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10826070701190948>.

PANT, Kirty; SHARMA, Anamika; CHOPRA, Harish Kumar; NANDA, Vikas. Impact of biodiversification on propolis composition, functionality, and application in foods as natural

- preservative: a review. **Food Control**, [S.L.], v. 155, p. 110097, jan. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110097>.
- PARK, Yong K.; ALENCAR, Severino M.; AGUIAR, Claudio L.. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 50, n. 9, p. 2502-2506, 14 mar. 2002. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf011432b>.
- PATEL, Kanika; PATEL, Dinesh Kumar. Biological potential of aromadendrin against human disorders: recent development in pharmacological activities and analytical aspects. **Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine**, [S.L.], v. 11, p. 100424, jun. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prmcm.2024.100424>.
- PELEGRINI, Brenda; BECKER, Amanda; FERREIRA, César; MACHADO, Gregório; GAUER, Murilo; MAZARIN, Sabrina; DEMBOGURSKI, Djaceli; KANESHIMA, Alice; SILVA, Denise da; BECKER, Tania Cristina. Antineoplastic Activity Evaluation of Brazilian Brown Propolis and Artepillin C in Colorectal Area of Wistar Rats. **Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention**, [S.L.], v. 25, n. 2, p. 563-573, 1 fev. 2024. EpiSmart Science Vector Ltd. <http://dx.doi.org/10.31557/apjcp.2024.25.2.563>.
- PEREIRA, Alberto dos Santos; SEIXAS, Fernando Rodrigues Mathias Silva; AQUINO NETO, Francisco Radler de. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, [S.L.], v. 25, n. 2, p. 321-326, maio 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422002000200021>.
- PIRES, Lucas de O.; CASTRO, Rosane N.. Isolation and Quantification of the Main Prenylated Compounds from Brazilian Green Propolis with Antioxidant Properties. **Revista Virtual de Química**, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 713-721, 2023. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20230003>.
- PIRES, Lucas de Oliveira. **ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE DERIVADOS PRENILADOS DA PRÓPOLIS VERDE**. 2019. 140 f. Tese (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2019.
- POOLE, Colin F. Milestones in the Development of Liquid-Phase Extraction Techniques. **Liquid-Phase Extraction**, [S.L.], p. 1-44, 2020. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-816911-7.00001-3>.
- POPOVA, Milena; TRUSHEVA, Boryana; CHIMSHIROVA, Ralitsa; ANTONOVA, Daniela; GECHOVSKA, Kamelia; THANH, Le Nguyen; LIEN, Nguyen Thi Phuong; PHUONG, Diep Thi Lan; BANKOVA, Vassya. Chemical Profile and Antioxidant Capacity of Propolis from Tetragonula, Lepidotrigona, Lisotrigona and Homotrigona Stingless Bee Species in Vietnam. **Molecules**, [S.L.], v. 27, n. 22, p. 7834, 14 nov. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27227834>.
- PUJIRAHAYU, Niken; SUZUKI, Toshisada; KATAYAMA, Takeshi. Cycloartane-Type Triterpenes and Botanical Origin of Propolis of Stingless Indonesian Bee Tetragonula sapiens. **Plants**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 57, 8 mar. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants8030057>.
- QUEIROGA, C.L.; CAVALCANTE, M.Q.; FERRAZ, P.C.; COSER, R.N.; SARTORATTO, A.; MAGALHÃES, P.M. de. High-speed countercurrent chromatography as a tool to isolate nerolidol from the Baccharis dracunculifolia volatile oil. **Journal Of Essential Oil Research**, [S.L.], v. 26, n. 5, p. 334-337, 17 jun. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2014.922511>.

RAI, Anjali; KUMARI, Khushboo; HAN, Sung Soo. Polyphenolic profiling of Victoria Amazonica using MRM LC-MS/MS: a comparative analysis of various plant parts. **Scientia Horticulturae**, [S.L.], v. 320, p. 112206, out. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112206>.
RAJAN, Murugan; BATISTA, Thiga de Carvalho; OLIVEIRA, Christean Santos de; OLIVEIRA, Daniel Guedes de; NARAIN, Narendra. Optimization of solvent extraction and HPLC-PDA method parameters for determination of phenolic compounds in various Brazilian propolis. **Journal Of Apicultural Research**, [S.L.], v. 63, n. 3, p. 556-569, 11 nov. 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2021.1996111>.

RANA SIMANJUNTAK, Masriana Vivi; JAUHAR, Muhammad Miftah; SYAIFIE, Putri Hawa; ARDA, Adzani Gaisani; MARDLIYATI, Etik; SHALANNANDA, Wervyan; HERMANTO, Beni Rio; ANSHORI, Isa. Revealing Propolis Potential Activity on Inhibiting Estrogen Receptor and Heat Shock Protein 90 Overexpressed in Breast Cancer by Bioinformatics Approaches. **Bioinformatics And Biology Insights**, [S.L.], v. 18, p. 1-19, jan. 2024. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/11779322231224187>.

RANA, Anita; BAJWA, Harjit Kaur. Therapeutics of Bioactive Compounds from Medicinal Plants and Honeybee Products against Cancer. **Journal Of Scientific & Industrial Research**, [S.L.], v. 82, n. 08, p. 805, ago. 2023. CSIR-National Institute of Science Communication and Policy Research (NIScPR). <http://dx.doi.org/10.56042/jsir.v82i08.1895>.

RENAULT, Jean-Hugues; NUZILLARD, Jean-Marc; INTES, Olivier; MACIUK, Alexandre. Chapter 3 Solvent systems. **Comprehensive Analytical Chemistry**, [S.L.], p. 49-83, 2002. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0166-526x\(02\)80006-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0166-526x(02)80006-x).

RIBEIRO, Victor P.; BASTOS, Jairo K.; ESTEP, Alden S.; MEEPAGALA, Kumudini M.. Larvicidal Activity of Constituents from the Main Brazilian Propolis Types: green, red, and brown against aedes aegypti. **Acs Omega**, [S.L.], v. 9, n. 33, p. 35560-35566, 9 ago. 2024. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.4c03132>

RIBEIRO, Victor P; CCANA-CCAPATINTA, Gari V; A ALDANA-MEJÍA, Jennyfer; A BERRETTA, Andresa; MORAES, Luiz Ab; BASTOS, Jairo K. Chemical characterization of Brazilian propolis using automated direct thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, [S.L.], v. 102, n. 10, p. 4345-4354, 8 fev. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.11788>.

RIBEIRO, Victor Pena; ALDANA-MEJIA, Jennyfer Andrea; ARRUDA, Caroline; CANDIDO, Ana Carolina Bolela Bovo; MAGALHÃES, Lizandra Guidi; OLIVEIRA, Nicoli Dias; VENEZIANI, Rodrigo Cassio Sola; BASTOS, Jairo Kenupp; AMBRÓSIO, Sérgio Ricardo. A RP-HPLC–DAD method for analysis of Brazilian southeast brown propolis and its leishmanicidal properties. **Biomedical Chromatography**, [S.L.], v. 37, n. 8, p. 1, 18 abr. 2023. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bmc.5634>.

RIBEIRO, Victor Pena; MEJIA, Jennyfer Andrea Aldana; RODRIGUES, Debora Munhoz; ALVES, Gabriel Rocha; PINHEIRO, Ana Maria de Freitas; TANIMOTO, Matheus Hikaru; BASTOS, Jairo Kenupp; AMBRÓSIO, Sérgio Ricardo. Brazilian Brown Propolis: an overview about its chemical composition, botanical sources, quality control, and pharmacological properties. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 33, n. 2, p. 288-299, 24 fev. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s43450-023-00374-x>.

RIBEIRO, Victor Pena; SÍMARO, Guilherme Venâncio; MEJIA, Jennyfer Andrea Aldana; ARRUDA, Caroline; BASTOS, Jairo Kenupp. Anti-inflammatory and Antinociceptive Activities of the Hydroalcoholic Extract and the Volatile Fraction of Southeastern Brazilian Brown Propolis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 31, n. 1, p. 59-66, fev. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s43450-020-00122-5>.

RIBNICKY, David; KIM, Seon Beom; POULEV, Alexander; WANG, Yang; BOUDREAU, Anik; RASKIN, Ilya; BISSON, Jonathan; RAY, G. Joseph; CHEN, Shao-Nong; RICHARD, Allison. Prenylated Coumaric Acids from *Atr emisia scoparia* Beneficially Modulate Adipogenesis. **Journal Of Natural Products**, [S.L.], v. 84, n. 4, p. 1078-1086, 8 abr. 2021. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c01149>.

RIGHI, A. A.; NEGRI, G.; SALATINO, A.. Comparative Chemistry of Propolis from Eight Brazilian Localities. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 2013, p. 1-14, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/267878>

RODRIGUES, Debora Munhoz. **OBTENÇÃO DE DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE ARTEPELIN C E BACARINA ORIUNDOS DA PRÓPOLIS VERDE E AVALIAÇÃO DE SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS**. 2022. 154 f. Tese (Doutorado) - Curso de Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/T.60.2022.tde-21062022-105657>. Acesso em: 11 out. 2024.

RODRIGUES, Débora Munhoz; SOUZA, Marcelo Claro de; ARRUDA, Caroline; PEREIRA, Rodrigo Augusto Santinelo; BASTOS, Jairo Kenupp. The Role of *Baccharis dracunculifolia* and its Chemical Profile on Green Propolis Production by *Apis mellifera*. **Journal Of Chemical Ecology**, [S.L.], v. 46, n. 2, p. 150-162, 23 dez. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-019-01141-w>.

ROMERO, Mario; FREIRE, José; PASTENE, Edgar; GARCÍA, Apolinaria; ARANDA, Mario; GONZÁLEZ, Carlos. Propolis polyphenolic compounds affect the viability and structure of *Helicobacter pylori* in vitro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 3, p. 325–332, 1 jun. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.03.002>.

RUBIO, Sara; QUINTANA, José; EIROA, José L.; TRIANA, Jorge; ESTÉVEZ, Francisco. Betuletol 3-methyl ether induces G2-M phase arrest and activates the sphingomyelin and MAPK pathways in human leukemia cells. **Molecular Carcinogenesis**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 32-43, 12 ago. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mc.20574>.

SAFTIĆ, Lara; PERŁURIĆ, Željka; FORMAL, Emilia; PAVLELIĆ, Tomislav; PAVELIĆ, Sandra Kraljević. Targeted and untargeted LC-MS polyphenolic profiling and chemometric analysis of propolis from different regions of Croatia. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [S.L.], v. 165, p. 162-172, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2018.11.061>

SALATINO, Antonio; SALATINO, Maria Luiza Faria; NEGRI, Giuseppina. How diverse is the chemistry and plant origin of Brazilian propolis? **Apidologie**, [S.L.], v. 52, n. 6, p. 1075-1097, 1 out. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-021-00889-z>.

SALATINO, Antonio; TEIXEIRA, Érica Weinstein; NEGRI, Giuseppina; MESSAGE, Dejour. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 33-38, jan. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/neh060>.

SALGUEIRO, Fernanda Barbosa. **CARACTERIZAÇÃO DA PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA: SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS, ATIVIDADE BIOLÓGICA E ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA**. 2016. 172 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2016.

SALGUEIRO, Fernanda Barbosa; CASTRO, Rosane Nora. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química Nova**, [S.L.], p. 1192-1199, 1 ago. 2016. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20160136>.

SANTOS, Ana Caroline; BASTOS, Jairo K.; DA SILVA, Luísa Mota; ANDRADE, Sérgio Faloni De. Artepillin C, drupanin, aromadendrin-4'-O-methyl-ether and kaempferide from Brazilian green propolis promote gastroprotective action by diversified mode of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 226, p. 82–89, nov. 2018. DOI 10.1016/j.jep.2018.08.006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874118321597>. Acesso em: 16 jun. 2024.

SANTOS, Cristiane Cardoso dos; SILVA, Alicia Fontoura da; CASTRO, Rosane Nora; PIRES, Lucas de Oliveira; CAMPOS, Mariana Freire; OLIVEIRA, Beatriz A.C. de; ALLONSO, Diego; LEITÃO, Suzana Guimarães; LEITÃO, Gilda Guimarães. Countercurrent chromatography isolation of green propolis biomarkers: potential blockers of sars-cov-2 rbd and ace2 interaction. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 1734, p. 465265, out. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2024.465265>.

SANTOS, Mario Ferreira Conceição; OLIVEIRA, Larissa Costa; RIBEIRO, Victor Pena; SOARES, Marisi Gomes; MORAES, Gabriel de Oliveira Isaac; SARTORI, Alan Giovanini de Oliveira; ROSALEN, Pedro Luiz; BASTOS, Jairo Kenupp; ALENCAR, Severino Matias de; VENEZIANI, Rodrigo Cassio Sola. Isolation of diterpenes from Araucaria sp Brazilian brown propolis and development of a validated high-performance liquid chromatography method for its analysis. **Journal Of Separation Science**, [S.L.], v. 44, n. 16, p. 3089-3097, 11 jul. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.202100374>.

SARKER, Satyajit D.; NAHAR, Lutfun. Hyphenated Techniques and Their Applications in Natural Products Analysis. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 301-340, 2012. Humana Press. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_12.

SARTORI, Alan Giovanini de Oliveira; CESAR, Aline Silva Mello; WOITOWICZ, Franciéli Cristiane Gruchowski; SALIBA, Ana Sofia Matr elli Chaib; IKEGAKI, Masaharu; ROSALEN, Pedro Luiz; COUTINHO, Luiz Lehmann; ALENCAR, Severino Matias de. Plant genetic diversity by DNA barcoding to investigate propolis origin. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 200, p. 113226, ago. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113226>.

SARTORI, Arthur Alves; SON, Ninh The; HONORIO, Mariana da Silva; RIPARI, Nicolas; SANTIAGO, Karina Basso; GOMES, Anderson Moreira; ZAMBUZZI, Willian Fernando; BASTOS, Jairo Kenupp; SFORCIN, José Maurício. Effects of caatinga propolis from Mimosa tenuiflora and its constituents (santin, sakuranetin and kaempferide) on human immune cells. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 319, p. 117297, jan. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2023.117297>.

SAWAYA, Alexandra Christine H. Frankland; CUNHA, Ildenize Barbosa da Silva; MARCUCCI, Maria Cristina; AIDAR, Davi Said; SILVA, Etelvina Conceição Almeida; CARVALHO, Carlos Alfredo Lopes; EBERLIN, Marcos Nogueira. Electrospray ionization mass spectrometry

fingerprinting of propolis of native Brazilian stingless bees. **Apidologie**, [S.L.], v. 38, n. 1, p. 93-103, jan. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2006058>.

SEGER, Christoph; EBERHART, Karin; STURM, Sonja; STRASSER, Hermann; STUPPNER, Hermann. Apolar chromatography on Sephadex LH-20 combined with high-speed counter-current chromatography. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 1117, n. 1, p. 67-73, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.055>.

SFORCIN, J. M., SOUSA, J. P. B., SILVA FILHO, A. A., BASTOS, J. K., BÚFALO, M. C., and TONUCCI, L. R. S. **Baccharis dracunculifolia: uma das principais fontes vegetais da própolis brasileira [online]**. São Paulo: Editora UNESP, 2012, 100 p. ISBN: 978-85-39303-76-2. <https://doi.org/10.7476/9786557144961>.

SFORCIN, José Maurício *et al.* **Própolis e geoprópolis: uma herança das abelhas**. São Paulo: Editora Unesp, 2017. 100 p. Disponível em: <https://books.scielo.org/id/85v2w>. Acesso em: 11 out. 2024.

SHAHA, Aarpita; ISLAM, Rezwanul; TANAKA, Naonobu; KASHIWADA, Yoshiki; FUKUI, Hiroyuki; TAKEDA, Noriaki; KITAMURA, Yoshiaki; MIZUGUCHI, Hiroyuki. Betuletol, a Propolis Component, Suppresses IL-33 Gene Expression and Effective against Eosinophilia. **Molecules**, [S.L.], v. 27, n. 17, p. 5459, 25 ago. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27175459>.

SHAHINOZZAMAN, Md; BASAK, Bristy; EMRAN, Rashiduzzaman; ROZARIO, Patricia; OBANDA, Diana N.. Artepillin C: a comprehensive review of its chemistry, bioavailability, and pharmacological properties. **Fitoterapia**, [S.L.], v. 147, p. 104775, nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104775>.

SHALDAM, Moataz A.; YAHYA, Galal; MOHAMED, Nashwa H.; ABDEL-DAIM, Mohamed M.; NAGGAR, Yahya Al. *In silico* screening of potent bioactive compounds from honeybee products against COVID-19 target enzymes. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 28, n. 30, p. 40507-40514, 2 maio 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-021-14195-9>

SILVA SOBRINHO, Rilcy Carla; MENESES, Ivani Rosa de; ALVES, Bruna Cristina; OLIVEIRA, Christiane Fátima; CARVALHO, Paulo; TARANTO, Alex Gutterres; MANO-SOUSA, Brayan Jonas; DUARTE-ALMEIDA, Joaquim Maurício. Can propolis and their compounds be efficacy in the treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19)? A systematic review. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 11, n. 8, p. 1, 7 jun. 2022. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i8.30302>.

SILVA, Maria do Socorro Sousa da; CITÓ, Antônia Maria das Graças Lopes; CHAVES, Mariana H.; LOPES, José Arimatéia Dantas. Triterpenóides tipo cicloatrano de própolis de Teresina - PI. **Química Nova**, [S.L.], v. 28, n. 5, p. 801-804, out. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422005000500013>.

SILVA, Maria do Socorro Sousa da; LIMA, Sidney Gonçalo de; OLIVEIRA, Evaldo Hipólito de; LOPES, José Arimateia Dantas; CHAVES, Mariana Helena; REIS, Francisco de Assis Machado; CITÓ, Antônia Maria das Graças Lopes. Anacardic acid derivatives from Brazilian propolis and their antibacterial activity. **Ecletica Quimica**, [S.L.], v. 33, n. 3, p. 53-58, 29 set. 2008. Ecletica Quimica. <http://dx.doi.org/10.26850/1678-4618eq.v33.3.2008.p53-58>.

SILVA-BELTRÁN, Norma Patricia; GALVÉZ-RUÍZ, Juan Carlos; IKNER, Luisa A.; UMSZAGUEZ, Marcelo Andrés; CASTRO, Thiago Luiz de Paula; GERBA, Charles P.. In vitro antiviral effect of Mexican and Brazilian propolis and phenolic compounds against human coronavirus 229E. **International Journal Of Environmental Health Research**, [S.L.], v. 33, n. 12, p. 1591-1603, 11 ago. 2022. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/09603123.2022.2110576>.

SILVEIRA, Marcelo Augusto Duarte; MALTA-SANTOS, Hayna; REBOUÇAS-SILVA, Jéssica; TELES, Flávio; GALVÃO, Erica Batista dos Santos; SOUZA, Sergio Pinto de; DUTRA, Fábio Ricardo Dantas; GOMES, Marcel Miranda Dantas; TEIXEIRA, Maurício Brito; CONCEIÇÃO, Luis Filipe Miranda Rebelo da. Effects of Standardized Brazilian Green Propolis Extract (EPP-AF®) on Inflammation in Haemodialysis Patients: a clinical trial. **International Journal Of Nephrology**, [S.L.], v. 2022, p. 1-9, 22 nov. 2022. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2022/1035475>.

SILVEIRA, Marcelo Augusto Duarte; MENEZES, Matheus de Alencar; SOUZA, Sergio Pinto de; GALVÃO, Erica Batista dos Santos; BERRETTA, Andresa Aparecida; CALDAS, Juliana; TEIXEIRA, Maurício Brito; GOMES, Marcel Miranda Dantas; DAMIANI, Lucas Petri; BAHIANSE, Bruno Andrade. Standardized Brazilian green propolis extract (EPP-AF®) in COVID-19 outcomes: a randomized double-blind placebo-controlled trial. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 13, n. 1, 27 out. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-023-43764-w>.

SIMANJUNTAK, Masriana Vivi; JAUHAR, Muhammad Miftah; SYAIFIE, Putri Hawa; ARDA, Adzani Gaisani; MARDLIYATI, Etik; SHALANNANDA, Wervyan; HERMANTO, Beni Rio; ANSHORI, Isa. Revealing Propolis Potential Activity on Inhibiting Estrogen Receptor and Heat Shock Protein 90 Overexpressed in Breast Cancer by Bioinformatics Approaches. **Bioinformatics And Biology Insights**, [S.L.], v. 18, p. 1-19, jan. 2024. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/11779322231224187>.

SIMÕES-AMBROSIO, L.M.C.; GREGÓRIO, L.e.; SOUSA, J.P.B.; FIGUEIREDO-RINHEL, A.s.G.; AZZOLINI, A.e.C.s.; BASTOS, J.K.; LUCISANO-VALIM, Y.M.. The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. **Fitoterapia**, [S.L.], v. 81, n. 8, p. 1102-1108, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2010.07.008>.

SISMOTTO, Marcela; PASCHOAL, Jonas Augusto Rizzato; REYES, Felix G. R.. Aspectos analíticos e regulatórios na determinação de resíduos de macrolídeos em alimentos de origem animal por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas. **Química Nova**, [S.L.], v. 36, n. 3, p. 449-461, 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422013000300016>.

SKALICKA-WOŹNIAK, Krystyna; GARRARD, Ian. Counter-current chromatography for the separation of terpenoids: a comprehensive review with respect to the solvent systems employed. **Phytochemistry Reviews**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 547-572, 25 mar. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11101-014-9348-2>.

SOBRINHO, Rilecy Carla Silva; MENESES, Ivani Rosa De; ALVES, Bruna Cristina; OLIVEIRA, Christiane Fátima; CARVALHO, Paulo; TARANTO, Alex Gutterres; MANO-SOUSA, Brayan Jonas; DUARTE-ALMEIDA, Joaquim Maurício. Can propolis and their compounds be efficacy in the treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19)? A systematic review. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 8, p. e3411830302, 7 jun. 2022. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i8.30302>.

SOLEIMANIAN, Yasamin; GOLI, Sayed Amir Hossein; VARSHOSAZ, Jaleh; SAHAFLI, Sayed Mohammad. Formulation and characterization of novel nanostructured lipid carriers made from

beeswax, propolis wax and pomegranate seed oil. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 244, p. 83-92, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.010>.

SON, Ninh The; GIANIBBI, Beatrice; PANTI, Alice; SPIGA, Ottavia; BASTOS, Jairo Kenupp; FUSI, Fabio. 3,3'-O-dimethylquercetin: a bi-functional vasodilator isolated from green propolis of the caatinga mimosa tenuiflora. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 967, p. 176400, mar. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2024.176400>.

SON, Ninh The; RIBEIRO, Victor Pena; BASTOS, Jairo Kenupp. Flavonoids from green propolis of the Northeastern Brazilian Caatinga Mimosa tenuiflora (Willd.) Poir.: a chemotaxonomic aspect. **Biochemical Systematics And Ecology**, [S.L.], v. 104, p. 104473, out. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2022.104473>.

SON, Ninh The; RIBEIRO, Victor Pena; TEIXEIRA, Maria Valdeline Sousa; FURTADO, Nieve Aracari Jacometti Cardoso; BASTOS, Jairo Kenupp. Northeastern Caatinga Green Propolis: volatile oil and antimicrobial activity. **Chemistry Of Natural Compounds**, [S.L.], v. 59, n. 5, p. 971-973, set. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10600-023-04168-4>.

SOUSA, João Paulo B. de; LEITE, Mateus F.; JORGE, Renata F.; RESENDE, Dimas O.; SILVA FILHO, Ademar A. da; FUTR ADO, Nieve A. J. C.; SOARES, Ademilson E. E.; SPADARO, Augusto C. C.; MAGALHÃES, Pedro Melillo de; BASTOS, Jairo K.. Seasonality Role on the Phenolics from Cultivated Baccharis dracunculifolia. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 2011, n. 1, p. 1, jan. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nep077>.

SOUZA, Joao Paulo Barreto de. **INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE NO PERFIL QUÍMICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E DAS SUBSTÂNCIAS FIXAS DE 'BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA' CULTIVADA, UTILIZANDO-SE CROMATOGRAFIA EM FASES GASOSA E LÍQUIDA**. 2007. 164 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/D.60.2007.tde-31052007-104011>. Acesso em: 17 out. 2024.

SPÓRNA-KUCAB, Aneta; MILO, Angelika; KUMORKIEWICZ, Agnieszka; WYBRANIEC, Sławomir. Studies on polar high-speed counter-current chromatographic systems in separation of amaranthine-type betacyanins from Celosia species. **Journal of Chromatography B**, v. 1073, p. 96–103, jan. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.11.028>.

STEFANIS, Christos; STAVROPOULOU, Elisavet; GIORGI, Elpida; VOIDAROU, Chrysoula (Chrysa); CONSTANTINIDIS, Theodoros C.; VRIONI, Georgia; TSAKRIS, Athanasios. Honey's Antioxidant and Antimicrobial Properties: a bibliometric study. **Antioxidants**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 414, 8 fev. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox12020414>.

STEINMANN, Dirk; GANZERA, Markus. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [S.L.], v. 55, n. 4, p. 744-757, jun. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2010.11.015>.

STURM, Luka; ULRIH, Nataša Poklar. Advances in the Propolis Chemical Composition between 2013 and 2018: a review. **Efood**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 24-37, 14 nov. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.2991/efood.k.191029.001>.

STURM, Luka; ULRIH, Nataša Poklar. Advances in the Propolis Chemical Composition between 2013 and 2018: a review. **Efood**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 24-37, 14 nov. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.2991/efood.k.191029.001>.

SUN, Shengwei; LIU, Meijuan; HE, Jian; LI, Kunping; ZHANG, Xuguang; YIN, Guangling. Identification and Determination of Seven Phenolic Acids in Brazilian Green Propolis by UPLC-ESI-QTOF-MS and HPLC. **Molecules**, [S.L.], v. 24, n. 9, p. 1791, 9 maio 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24091791>

SUREK, Monica; FACHI, Mariana M.; COBRE, Alexandre de Fátima; OLIVEIRA, Favízia F. de; PONTAROLO, Roberto; CRISMA, Amanda R.; SOUZA, Wesley M. de; FELIPE, Karina B.. Chemical composition, cytotoxicity, and antibacterial activity of propolis from Africanized honeybees and three different Meliponini species. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 269, p. 113662, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2020.113662>.

TAMFU, A.N.; TAGATSING, M.F.; TALLA, E.; MBAFOR, J.T.. Chemical Profiles and Bioactive Molecules of Propolis: a review. **Journal Of Natural Products And Resources**, [S.L.], v. 5, n. 2, p. 220-226, 23 set. 2019. JACS Directory. <http://dx.doi.org/10.30799/jnpr.079.19050203>.

TANI, Hiroko; HIKAMI, Susumu; TAKAHASHI, Shunya; KIMURA, Yuka; MATSUURA, Nobuyasu; NAKAMURA, Takemichi; YAMAGA, Masayuki; KOSHINO, Hiroyuki. Isolation, Identification, and Synthesis of a New Prenylated Cinnamic Acid Derivative from Brazilian Green Propolis and Simultaneous Quantification of Bioactive Components by LC-MS/MS. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 67, n. 44, p. 12303-12312, 9 out. 2019. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04835>

TAVARES, Johnny Alexandre Oliveira; ROCHA, Aurélio de Oliveira; ANJOS, Lucas Menezes dos; CARDOSO, Mariane; SILVA, Francilene Amaral da. Bibliometric analysis of the top 100 most-cited articles concerning the use of propolis in dentistry. **Brazilian Journal Of Oral Sciences**, [S.L.], v. 23, e245039, 15 jul. 2024. Universidade Estadual de Campinas. <http://dx.doi.org/10.20396/bjos.v23i00.8675039>.

TAVARES, Leonardo Carvalho; LEMOS, Telma Leda Gomes de; ARRIAGA, Angela Martha Campos; SANTIAGO, Gilvandete Maria Pinheiro; BRAZ-FILHO, Raimundo. Estudo químico de uma amostra de própolis verde de Passa Quatro, Minas Gerais, Brasil. **Química Nova**, [S.L.], v. 33, n. 10, p. 2051-2054, 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422010001000009>.

TAZAWA, Shigemi; WARASHINA, Tsutomu; NORO, Tadataka; MIYASE, Toshio. Studies on the Constituents of Brazilian Propolis. **Chemical And Pharmaceutical Bulletin**, [S.L.], v. 46, n. 9, p. 1477-1479, 1998. Pharmaceutical Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1248/cpb.46.1477>.

THANH, Le Nguyen; THOA, Ha Thi; OANH, Nguyen Thi Tu; GIAP, Tran Huu; QUYEN, Vu Thi; HA, Nguyen Thi Thu; PHUONG, Diep Thi Lan; LIEN, Nguyen Thi Phuong; HANG, Nguyen Thi Minh. Cycloatrane triterpenoids and biological activities from the propolis of the stingless bee *Lisotrigona fuscata*. **Vietnam Journal Of Chemistry**, [S.L.], v. 59, n. 4, p. 426-430, ago. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/vjch.201900143>.

THEURILLAT, Xanthippe; MUJAHID, Claudia; ERIKSEN, Bjorn; GRIFFIN, Ashley; SAVAGE, Andrew; DELATOUR, Thierry; MOTTIER, Pascal. An LC-MS/MS method for the quantitative determination of 57 per- and polyfluoroalkyl substances at ng/kg levels in different food

matrices. **Food Additives & Contaminants: Part A**, [S.L.], v. 40, n. 7, p. 862-877, 3 jul. 2023. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2023.2226771>.

TOMAZZOLI, Máira Maciel; ZEGGIO, Amélia Regina Somensi; PAI NETO, Remi dal; SPECHT, Leandro; COSTA, Christopher; ROCHA, Miguel; YUNES, Rosendo Augusto; MARASCHIN, Marcelo. Botanical source investigation and evaluation of the effect of seasonality on Brazilian propolis from *Apis mellifera* L. **Scientia Agricola**, [S.L.], v. 77, n. 6, 2020. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-992x-2018-0258>.

TORETI, Viviane Cristina; SATO, Helia Harumi; PASTORE, Glaucia Maria; PARK, Yong Kun. Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 2013, p. 1-13, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/697390>.

UEDA, Tomoyuki; INDEN, Masatoshi; SHIRAI, Katsuhiro; SEKINE, Shin-ichiro; MASAKI, Yuji; KURITA, Hisaka; ICHIHARA, Kenji; INUZUKA, Takashi; HOZUMI, Isao. The effects of Brazilian green propolis that contains flavonols against mutant copper-zinc superoxide dismutase-mediated toxicity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2882, 6 jun. 2017. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-03115-y>

UMEHARA, Eric; SILVA, Thais A. Costa; MENDES, Viviane M.; GUADAGNIN, Rafael C.; SATR ORELLI, Patricia; TEMPONE, Andre G.; LAGO, João Henrique G.. Differential lethal action of C17: 2 and c17. **Bioorganic Chemistry**, [S.L.], v. 102, p. 104068, set. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104068>.

UTO, Yoshihiro; HIRATA, Akihiko; FUJITA, Tomoya; TAKUBO, Syunsuke; NAGASAWA, Hideko; HORI, Hitoshi. First Total Synthesis of Atr epillin C Established by o,o'-Diprenylation of p-Halophenols in Water. **The Journal Of Organic Chemistry**, [S.L.], v. 67, n. 7, p. 2355-2357, 13 mar. 2002. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jo0056904>.

VALENÇA, Patrícia Lima Falcão. **PAPEL DO EXTRATO DA PROPOLIS TETRAGONA CLAVIPES NA MODULAÇÃO DE INTERLEUCINAS, FATOR DE CRESCIMENTO, E NA VIABILIDADE IN VITRO DE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE MAMA E MONONUCLEADAS DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO, EXPOSTAS A COBALTO-60**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, p. 1-128, 2021. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/38191>. Acesso em: 04 out. 2024.

VIEIRA, Ana Luiza Santos; CORREIA, Vinícius Tadeu da Veiga; RAMOS, Ana Luiza Coeli Cruz; SILVA, Nayana Hayss Araújo da; JAYMES, Leonardo Assis Campos; MELO, Julio Onésio Ferreira; PAULA, Ana Cardoso Clemente Filha Ferreira de; GARCIA, Maria Aparecida Vieira Teixeira; ARAËJO, Raquel Linhares Bello de. Evaluation of the Chemical Profile and Antioxidant Capacity of Green, Brown, and Dark Propolis. **Plants**, [S.L.], v. 12, n. 18, p. 3204, 8 set. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants12183204>.

VIEIRA, Mariana Neves. **STUDIES ON THE USE OF COUNTERCURRENT CHROMATOGRAPHY FOR THE PREPARATIVE ISOLATION AND IDENTIFICATION OF NATURAL COMPOUNDS ACTIVE AGAINST NEGLECTED TROPICAL DISEASES**. 2015. 245 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Naturais, Fakultät Für Lebenswissenschaften, Braunschweig, 2015.

VIEIRA, Tatiana M.; BARCO, Julia G.; SOUZA, Sara L. de; SANTOS, Anna L. O.; DAOUD, Ismail; RAHALI, Seyfeddine; AMDOUNI, Nouredine; BASTOS, Jairo K.; MARTINS, Carlos H.

G.; SAID, Ridha Ben. In Vitro and *In Silico* Studies of the Antimicrobial Activity of Prenylated Phenylpropanoids of Green Propolis and Their Derivatives against Oral Bacteria. **Antibiotics**, [S.L.], v. 13, n. 8, p. 787, 22 ago. 2024. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics13080787>.

VIEIRA, Tatiana Manzini. **AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E ANTIPARASITÁRIA DE ANÁLOGOS PRENILADOS DO ARTEPILLIN C E ESTUDO DE SUAS REAÇÕES DE FRAGMENTAÇÃO EM FASE GASOSA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL**. 2023. 194 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023

VISICK, Oliver D.; RATNIEKS, Francis L. W.. Density of wild honey bee, *Apis mellifera*, colonies worldwide. **Ecology And Evolution**, [S.L.], v. 13, n. 10, p. 10609, out. 2023. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ece3.10609>.

WAGNER, H. & BLADT, S. 2001. Plant drug analysis. Thin Layer Chromatography Atlas. 2nd ed. Springer. Londres.

WAHID, Dg. Nooralizan Abd; RAHMAN, Abu Bakar Abd.; HAMID, Ag Sufiyan Abd; MAKMUD, Mohamad Zul Hilmey; JAMAIN, Zuhair; WAH, Lucky Goh Poh; NAJMUDDIN, Syed Umar Farooq Syed; ZAHARI, Nur Zaida; SAKHEH, Nurshafika Mohd; SABULLAH, Mohd Khalizan. Visualization of the Stingless Bee Research in Southeast Asia Region through Bibliometric Analysis using Scopus Database from 1984 to 2022. **Malaysian Journal Of Fundamental And Applied Sciences**, [S.L.], v. 20, n. 2, p. 412-423, 24 abr. 2024. Penerbit UTM Press. <http://dx.doi.org/10.11113/mjfas.v20n2.3058>.

WALTERS, Donald S.; MINARD, Robert ; CRAIG, Richard; MUMMA, Ralph O.. Geranium defensive agents. III. Structural determination and biosynthetic considerations of anacardic acids of geranium. **Journal Of Chemical Ecology**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 743-751, mar. 1988. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf01018769>.

WANG, Wanru; YANG, Yunquan; TANG, Kewen. Selective extraction of glabridin from *Glycyrrhiza glabra* crude extracts by sulfobutylether- β -cyclodextrin in a ternary extraction system. **Process Biochemistry**, v. 129, p. 1–10, jun. 2023. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2023.02.027>

WANG, Xijun; SUN, Hui; ZHANG, Aihua; WANG, Ping; HAN, Ying. Ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry as a sensitive and powerful technology for metabolomic studies. **Journal Of Separation Science**, [S.L.], v. 34, n. 24, p. 3451-3459, 9 ago. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201100333>

WANG, Yujie; YU, Zhen; YU, Qinghua. In vitro and *in silico* therapeutic properties of ATR EPILINA C and Aromadendrin as collagenase and elastase inhibitors and investigation of anti-Ovarian cancer effects and antioxidant potential. **Journal Of The Indian Chemical Society**, [S.L.], v. 101, n. 11, p. 101367, nov. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jics.2024.101367>.

WANG, Xing-Cui; HUANG, Xin-Yi; ZHANG, Fu-Xin; MUHIRE, Jules; DI, Duo-Long; HAI, Jun; PEI, Dong. Recent Advances in Screening and Separating Active Components From Natural Products Based on High-Speed Countercurrent Chromatography. **Journal Of Separation Science**, [S.L.], v. 47, n. 24, p. 1-15, dez. 2024. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.70051>.

WOOD, Philip; IGNATOVA, Svetlana; JANAWAY, Lee; KEAY, David; HAWES, David; GARRARD, Ian; SUTHERLAND, Ian A. Counter-current chromatography separation scaled up

from an analytical column to a production column. *Journal of Chromatography A*, v. 1151, n. 1–2, p. 25–30, jun. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.014>.

WOŃNIAK, Łukasz; SZAKIEL, Anna; GŁOWACKA, Agnieszka; ROZPARA, Elżbieta; MARSZAŁEK, Krystian; SKĄPSKA, Sylwia. Triterpenoids of Three Apple Cultivars—Biosynthesis, Antioxidative and Anti-Inflammatory Properties, and Fate during Processing. *Molecules*, [S.L.], v. 28, n. 6, p. 2584, 13 mar. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28062584>.

XU, Xiaolan; YANG, Bo; WANG, Danfeng; ZHU, Yuxuan; MIAO, Xiaoqing; YANG, Wenchao. The Chemical Composition of Brazilian Green Propolis and Its Protective Effects on Mouse Aortic Endothelial Cells against Inflammatory Injury. *Molecules*, [S.L.], v. 25, n. 20, p. 4612, 10 out. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25204612>.

YAMAGA, Masayuki; KAWABE, Hiroshi; TANI, Hiroko; YAMAKI, Ayanori. Enhanced absorption of prenylated cinnamic acid derivatives from Brazilian green propolis by turmeric in humans and rats. *Food Science & Nutrition*, [S.L.], v. 12, n. 7, p. 4680–4691, 4 abr. 2024. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/fsn3.4116>.

YAMAGA, Masayuki; TANI, Hiroko; NISHIKAWA, Miyu; FUKAYA, Keisuke; IKUSHIRO, Shin-ichi; MUROTA, Kaeko. Pharmacokinetics and metabolism of cinnamic acid derivatives and flavonoids after oral administration of Brazilian green propolis in humans. *Food & Function*, v. 12, n. 6, p. 2520–2530, 2021. <http://dx.doi.org/10.1039/D0FO02541K>

YANG, Changjun; LI, Daxiang; WAN, Xiaochun. Combination of HSCCC and Sephadex LH-20 methods. *Journal Of Chromatography B*, [S.L.], v. 861, n. 1, p. 140–144, jan. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.11.022>.

YANG, Yu; KHAN, Bilal Muhammad; ZHANG, Xiping; ZHAO, Yongjie; CHEONG, Kit-Leong; LIU, Yang. Advances in Separation and Purification of Bioactive Polysaccharides through High-speed Counter-Current Chromatography. *Journal Of Chromatographic Science*, [S.L.], v. 58, n. 10, p. 992–1000, 8 set. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/chromsci/bmaa063>

YI, Tao; ZHU, Lin; ZHU, Guo-Yuan; TANG, Yi-Na; XU, Jun; FAN, Jia-Yi; ZHAO, Zhong-Zhen; CHEN, Hu-Biao. HSCCC-based strategy for preparative separation of in vivo metabolites after administration of an herbal medicine: saussurea laniceps, a case study. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1, 13 set. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep33036>.

YUAN, Fang; ZHANG, De-Wen; LIU, Jing-Xin; ZHOU, Ying-Lin; ZHANG, Xin-Xiang. Phytochemical profiling in single plant cell by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *The Analyst*, [S.L.], v. 141, n. 22, p. 6338–6343, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c6an01539e>.

YUAN, Min; YUAN, Xu-Jiang; PINEDA, Miguel; LIANG, Ze-Yu; HE, Jian; SUN, Sheng-Wei; PAN, Tian-Ling; LI, Kun-Ping. A comparative study between Chinese propolis and Brazilian green propolis: metabolite profile and bioactivity. *Food & Function*, [S.L.], v. 11, n. 3, p. 2368–2379, 2020. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c9fo02051a>.

ZAMARRENHO, Luana Gonçalves; LIMA, Mikhael Haruo Fernandes de; HORI, Juliana Issa; LIMA, Jéssica Aparecida; AMBRÓSIO, Sérgio Ricardo; BASTOS, Jairo Kenupp; JONG, David de; BERRETTA, Andresa Aparecida. Effects of Three Different Brazilian Green Propolis Extract

Formulations on Pro- and Anti-Inflammatory Cytokine Secretion by Macrophages. **Applied Sciences**, [S.L.], v. 13, n. 10, p. 6247, 19 maio 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/app13106247>.

ZHANG, Min; IGNATOVA, Svetlana; HU, Ping; LIANG, Qionglin; WANG, Yiming; LUO, Guoan; WU JUN, Frank; SUTHERLAND, Ian. Development of a strategy and process parameters for a green process in counter-current chromatography: Purification of tanshinone IIA and cryptotanshinone from *Salvia miltiorrhiza* Bunge as a case study. *Journal of Chromatography A*, Selected Papers from the 6th International Conference on Countercurrent Chromatography. v. 1218, n. 36, p. 6031–6037, 9 set. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.118>.

ZHANG, Qianghua; BIAN, Yanhong; SHI, Yingying; ZHENG, Shangyong; GU, Xu; ZHANG, Danyan; ZHU, Xiufang; WANG, Xiaoli; JIANG, Dingyun; XIONG, Qingping. An economical and efficient technology for the extraction of resveratrol from peanut (*Arachis hypogaea*) sprouts by multi-stage countercurrent extraction. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 179, p. 15–25, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.113>.

ZHANG, Qing-Wen; LIN, Li-Gen; YE, Wen-Cai. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. **Chinese Medicine**, v. 13, n. 1, p. 20, dez. 2018. <http://dx.doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>

ZHANG, Weimin; LIU, Yingqiu; FAN, Yunpeng. Extraction, purification, structural character and biological properties of propolis flavonoids: a review. **Fitoterapia**, [S.L.], v. 157, p. 105106, mar. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2021.105106>.

ZHAO, Liting; PU, Lingling; WEI, Jingyu; LI, Jinghua; WU, Jianquan; XIN, Zhonghao; GAO, Weina; GUO, Changjiang. Brazilian Green Propolis Improves Antioxidant Function in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *International Journal Of Environmental Research And Public Health*, [S.L.], v. 13, n. 5, p. 498, 13 maio 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph13050498>.

ZHAO, Xue-Zheng; WANG, Lu; LI, Xiao-Ya; ZHANG, Qing-Qing; LI, Wei; LIN, Ai-Jun; XU, Jin-Yi; WU, Xiao-Ming; XIE, Wei-Jia. A Practical Synthetic Route to Artepillin C and Drupanin. **Asian Journal of Organic Chemistry**, v. 10, n. 7, p. 1691–1694, jul. 2021. <http://dx.doi.org/10.1002/ajoc.202100262>

ZHOU, Jian-Liang; QI, Lian-Wen; LI, Ping. Herbal medicine analysis by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Journal Of Chromatography A*, [S.L.], v. 1216, n. 44, p. 7582–7594, out. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.05.054>.

ZHOU, Yifeng; CHEN, Meixu; HUO, Xinyi; XU, Qilin; WU, Linlin; WANG, Liling. Separation of Flavonoids and Purification of Chlorogenic Acid from Bamboo Leaves Extraction Residues by Combination of Macroporous Resin and High-Speed Counter-Current Chromatography. **Molecules**, [S.L.], v. 28, n. 11, p. 4443, 30 maio 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28114443>.

ZHU, Hequan; LI, Chunyang; JIA, Lei; QIAO, Jiangtao; EL-SEEDI, Hesham R.; ZHANG, Yu; ZHANG, Hongcheng. Supercritical CO₂ extracts of propolis inhibits tumor proliferation and Enhances the immunomodulatory activity via activating the TLR4-MAPK/NF- κ B signaling pathway. **Food Research International**, [S.L.], v. 196, p. 115137, nov. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2024.115137>.

8. APÊNDICES

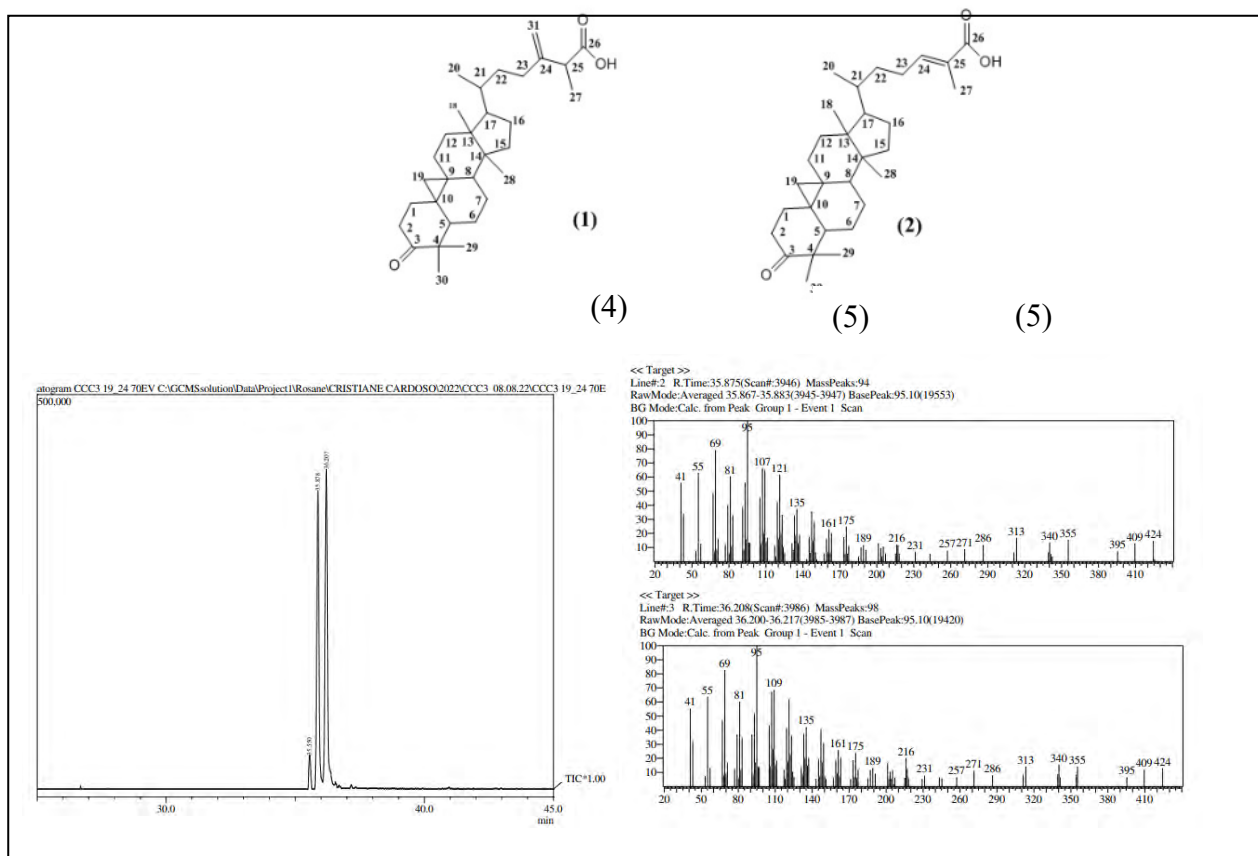


Figura A1. Perfil GC-MS da fração 19-24 (CCC3) obtido por impacto de elétrons e espectros de MS de ácidos ambônico e mangiferônico, m/z 424 (34%, M^+), $C_{30}H_{48}O$

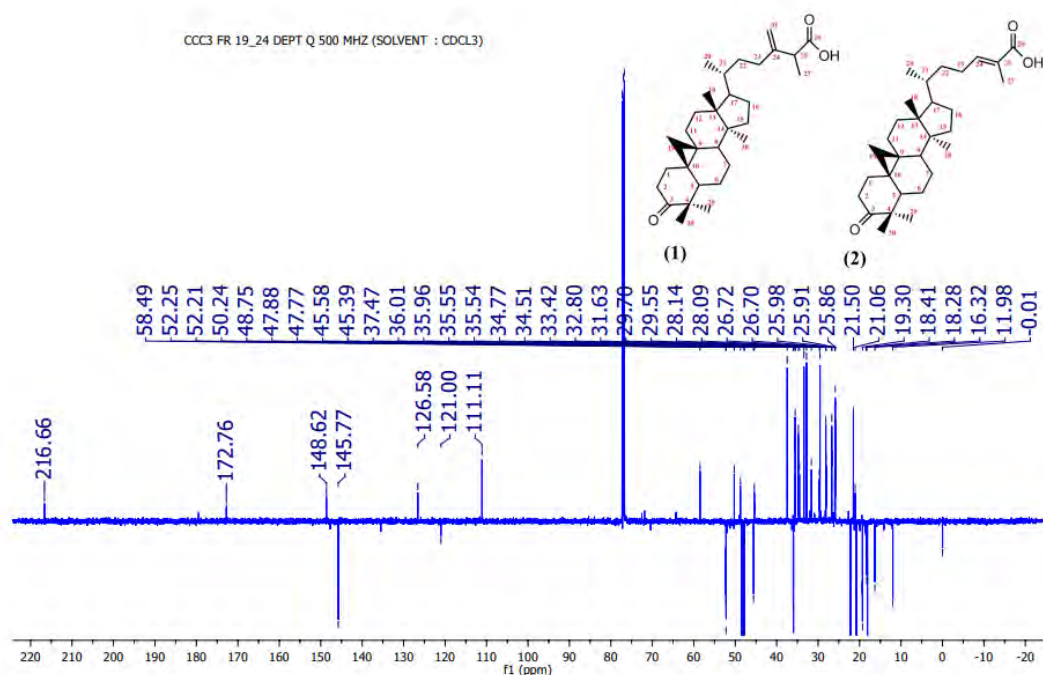


Figura A2. Espectros de RMN de ¹³C e DEPTQ da mistura de ácidos ambônico e mangiferônico (fração 19-24 do CCC3) obtidos em um espectrômetro de RMN de 500 MHz, CDCl₃.

SAMPLE: CCC3 FR 19-24 (1H-NMR, 500MHZ, CDCl₃)

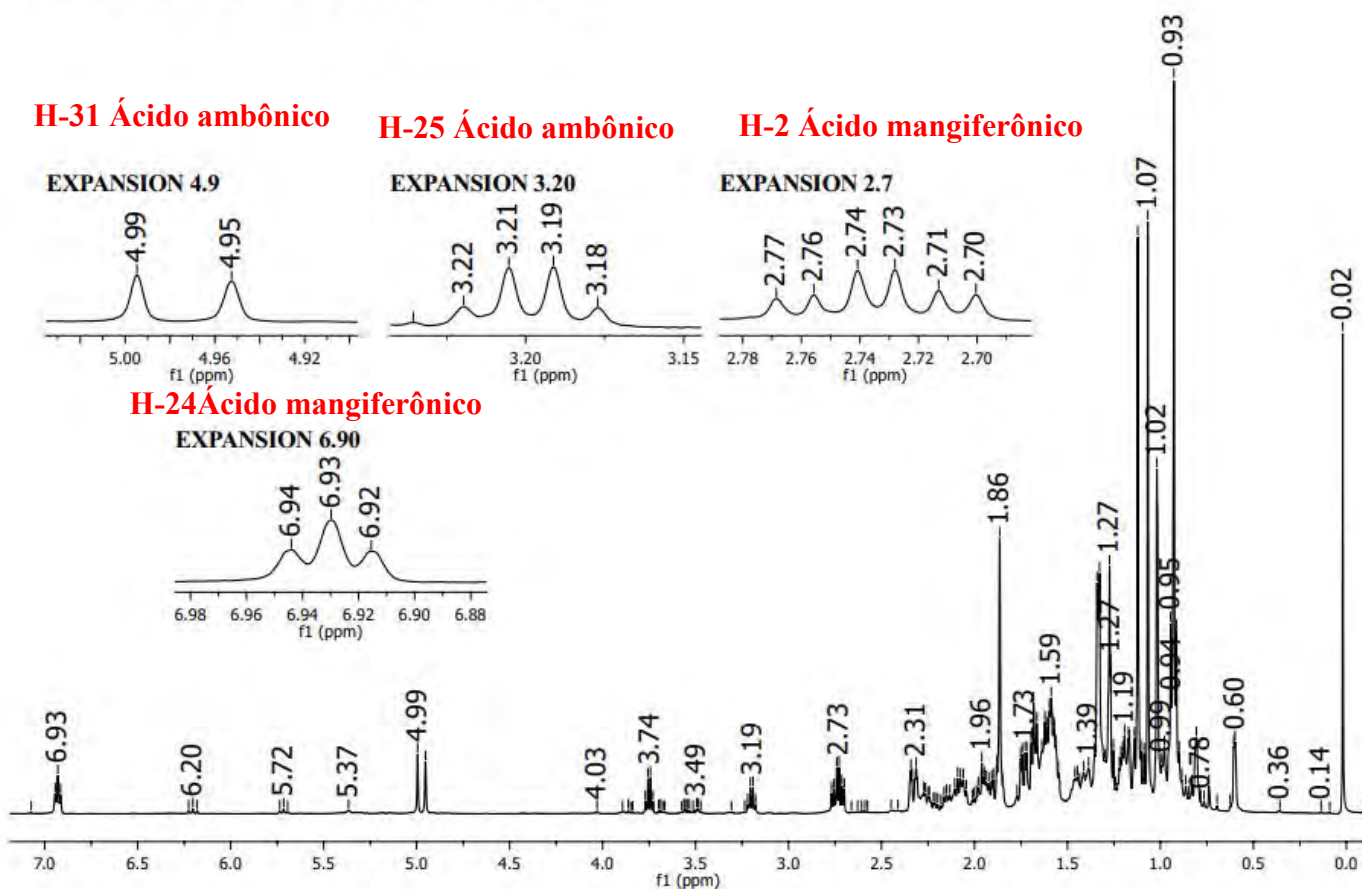


Figura A3. Espectro de ¹H-RMN da mistura triterpênica de ácidos ambônico e mangiferônico (fração 19-24 do CCC3) obtida em um espectrômetro de RMN de 500 MHz, CDCl₃.

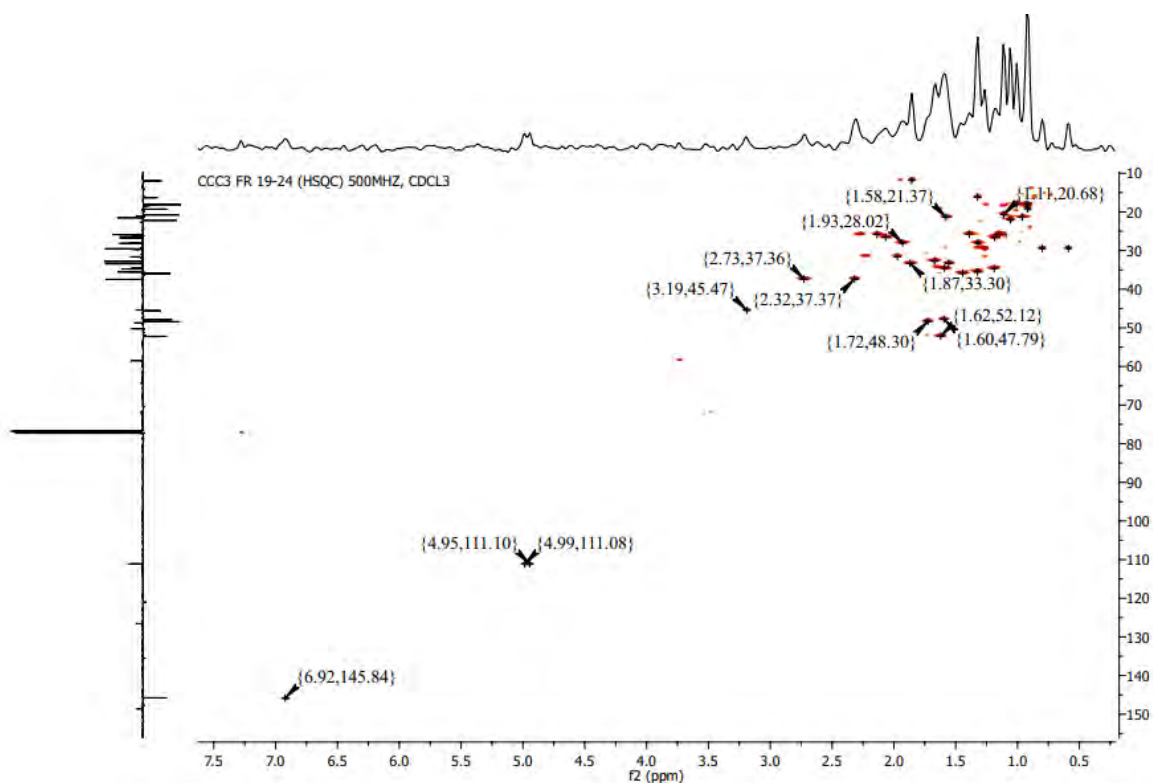


Figura A4. Espectro HSQC da mistura triterpênica de ácidos ambônico e mangiferônico (fração 19-24 do CCC3) obtida em um espectrômetro de RMN de 500 MHz, CDCl_3 .

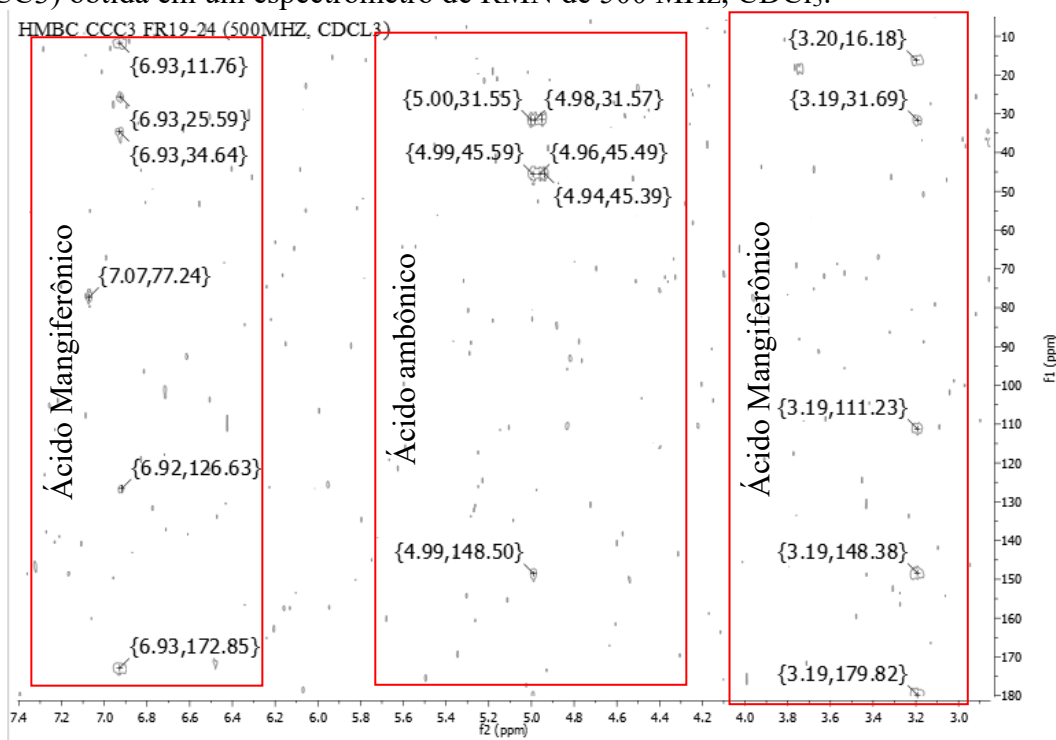


Figura A5. Espectro HMBC (expansão 7,4-3,0 ppm) da mistura triterpênica de ácidos ambônico e mangiferônico (fração 19-24 do CCC3) obtida em espectrômetro de RMN de 500 MHz, CDCl_3 .

Tabela A1. Dados de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C da mistura de ácidos ambônico e mangiferônico obtidos em um espectrômetro de RMN de 500 MHz, CDCl_3 .

POSICÃO	ÁCIDO AMBÔNICO HSQC		ÁCIDO MANGIFERÔNICO HSQC		DA SILVA ET AL 2005* HSQC $^1\text{J}_{\text{CH}}$	
	δ ^1H (mult)	δ ^{13}C	δ ^1H (mult)	δ ^{13}C	δ ^{13}C	δ ^{13}C
1	1.86 (t)	33.4	1.57 (m)	33.4	33.4	33.4
2	2.32 (t)	37.5	2.73 (m)	37.5	37.4	37.4
3	-	216.7	-	216.7	216.7	216.7
4	-	50.2	-	50.2	50.2	50.2
5	1.72 (d)	48.4	1.74 (d)	48.4	48.4	48.4
6	0.94 (m)	21.5	1.59 (m)	21.5	21.5	21.5
7	1.33 (m)	28.1	1.93(m)	28.1	28.1	28.1
8	1.59 (m)	47.9	1.59 (m)	47.9	47.9	47.9
9	-	21.5	-	21.1	21.1	21.1
10	-	25.9	-	25.9	25.9	25.9
11	1.15 (m)	25.9	1.39 (m)	25.9	25.9	25.9
12	1.66 (m)	32.8	1.66 (m)	32.8	32.8	32.8
13	-	45.4	-	45.6	45.5	45.5
14	-	48.7	-	48.7	48.7	48.7
15	1.33 (m. 2H)	35.5	1.33 (m. 2H)	35.5	35.5	35.5
16	2.07 (m)	26.7	1.18 (m)	26.7	26.9	26.9
17	1.62 (m)	52.2	1.62 (m)	52.2	52.2	52.2
18	1.02 (s)	18.1	1.02(s)	18.1	18.1	18.1
19	0.60 (m); 0.81 (m)	29.5	0.60 (m); 0.81 (m)	29.5	29.5	29.5
20	1.44 (m. 3H)	36.0	1.44 (m. 3H)	35.9	36.0	35.9
21	0.92 (m. 3H)	18.3	0.92 (m. 3H)	18.3	18.3	18.3
22	1.58 (m)	34.8	1.19 (m)	34.8	34.7	34.7
23	1.96 (m)	31.6	2.13 (m)	25.9	31.6	25.9
24	-	148.6	6.93 (t)	145.7	148.6	145.8
25	3.20 (q)	45.6	-	126.6	45.6	126.5
26	-	179.5	-	172.8	179.0	173.0
27	1.33 (m)	16.3	1.86 (s)	11.9	16.3	11.9
28	0.93 (s)	19.3	0.93 (s)	18.4	18.3	18.1
29	1.07 (s)	22.2	1.07 (s)	22.2	22.2	22.2
30	1.12 (s)	20.8	1.12 (s)	20.8	20.8	20.8
31	4.95 e 4.99 (s)	111.1	-	-	111.1	-

*MSS Da Silva, AMGL Citó, MH Chaves, JAD Lopes, Cycloatr anetriterpenoidsofpropolisfrom Teresina – PI. Química Nova 28(2005) 5. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000500013>

C:\L\Cristiane Cardoso\EHPV\CCC10 EHPV\CCC 10 FR 76.lcd
INFORMAÇÕES DA AMOSTRA
Sample Name : CCC 10 FR 76
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : CCC 10 FR 76.lcd
Method File Name : Análise Propolis Novo CCC.lcm

Ch1 280nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area %
1	20.374	7.097
2	24.053	1.140
3	24.842	91.763
Total		100.000

INFORMAÇÕES DO MÉTODO
HPLC Shimadzu PROMINENCE
LC-20AT, CBM-20A
HPLC SHIMADZU - PROMINENCE
BOMBA LC-20AT-Detector SPD-M20A,
Forno CTO-20A - Autosampler SIL-10AF
Coluna C18 (25cm x4.6mm x5um) Betasil Thermo Nova
Método Análise Propolis Novo CCC
PDA-200-500nm (320-NM)
Solvente: B: MeOH:1%AcOH(35%)- A:H2O :1% AcOH(65%)
20.00 Pumps B.Conc
25.00 Pumps B.Conc
30.00 Pumps B.Conc
32.00 Pumps B.Conc
35.00 Pumps B.Conc
38.00 Pumps B.Conc
40.00 Pumps B.Conc
42.00 Pumps B.Conc
45.00 Controller Stop
fluxo 1.0 mL/min - FORNO 40C
Volume 20uL - pressão= 136kgf/c

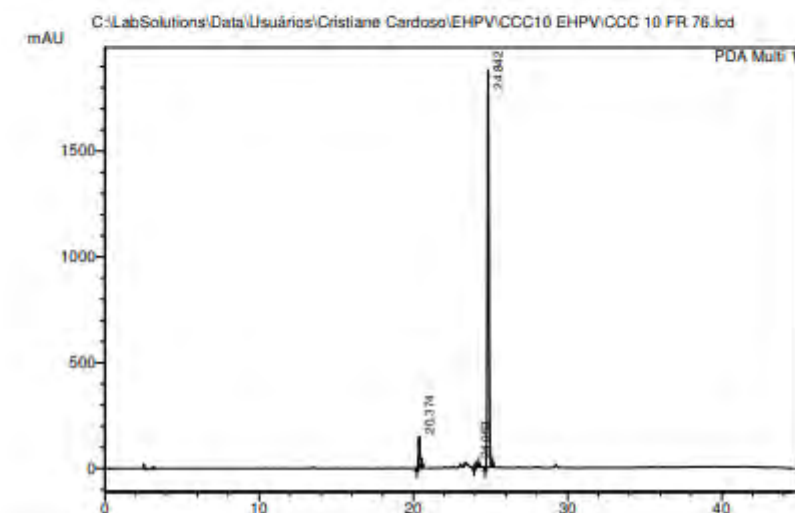


Figura A6. Perfil cromatográfico por HPLC-PDA(280 nm) da fração CCC5 FR 76 (artepilina C).

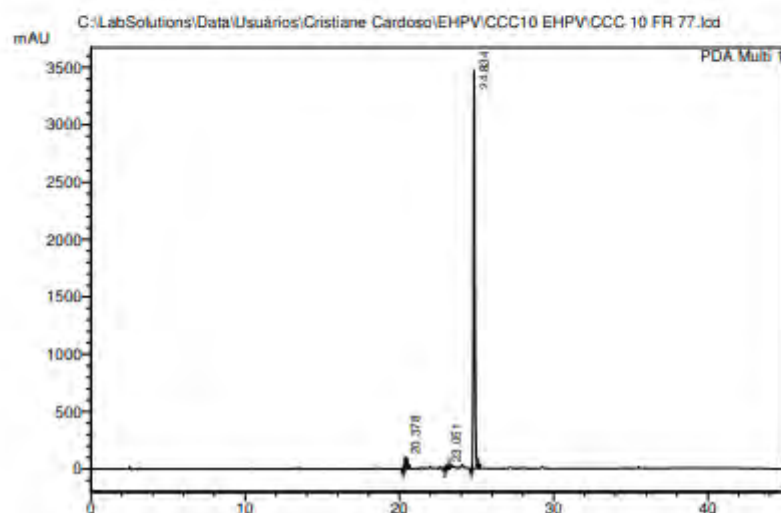


Figura A7. Perfil cromatográfico por HPLC-PDA(280 nm) da fração CCC5 FR 77 (artepilina C purificada).

C:\...Cristiane Cardoso\EHPV\CCC1 EHPV\Fr 50-55 CCC.lcd
INFORMAÇÕES DA AMOSTRA
Sample Name : Fr 50-55 CCC
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : Fr 50-55 CCC.lcd
Method File Name : Análise Propolis Novo CCC.lcm

PDA Ch1 280nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area %
1	25.277	7.776
2	27.872	2.158
3	27.872	90.066
Total		100.000

INFORMAÇÕES DO MÉTODO
HPLC Shimadzu PROMINENCE
LC-20AT, CBM-20A
HPLC SHIMADZU - PROMINENCE
BOMBA LC-20AT-Detector SPD-M20A
Forno CTO-20A - Autosampler SIL-10AF
Coluna C18 (25cm x4.6mm x5um) Betasil Thermo Nova
Método Análise GeoPropolis Novo-
PDA-200-500nm (320-NM)
Solvente: B: MeOH:1%AcOH(35%)- A:H2O :1% AcOH(65%)
20.00 Pumps B.Conc
25.00 Pumps B.Conc
30.00 Pumps B.Conc
32.00 Pumps B.Conc
35.00 Pumps B.Conc
38.00 Pumps B.Conc
40.00 Pumps B.Conc
42.00 Pumps B.Conc
45.00 Controller Stop
fluxo 1.0 mL/min - FORNO 40C
Volume 15UL - pressão= 137kgf/c

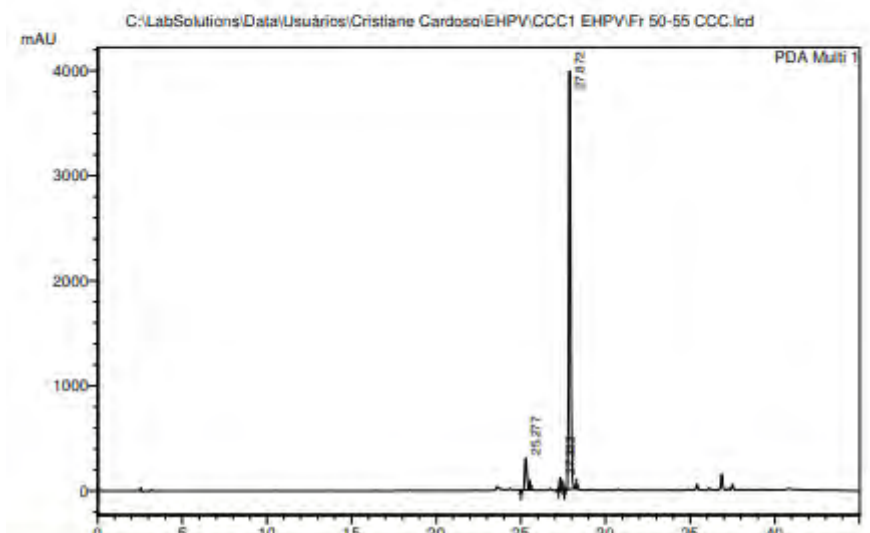


Figura A8. Perfil cromatográfico por HPLC-PDA (280 nm) da fração CCC1 FR 50-55 sem purificação (bacarina).

C:_EHPV\CCC1 EHPV\Bacarina PUR FR50-55.lcd
INFORMAÇÕES DA AMOSTRA
Sample Name : bacarina
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : Bacarina PUR FR50-55.lcd
Method File Name : Análise Propolis Novo CCC.lcm

PDA Ch1 280nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area %
1	24.852	0.672
2	26.681	0.845
3	27.285	98.484
Total		100.000

INFORMAÇÕES DO MÉTODO
HPLC Shimadzu PROMINENCE
LC-20AT, CBM-20A
HPLC SHIMADZU - PROMINENCE
BOMBA LC-20AT-Detector SPD-M20A,
Forno CTO-20A - Autosampler SIL-10AF
Coluna C18 (25cm x4.6mm x5um) Betasil Thermo Nova
Método Análise GeoPropolis Novo-
PDA-200-500nm (320-NM)
Solvente: B: MeOH:1%AcOH(35%)- A:H2O :1% ACOH65%)
20.00 Pumps B.Conc
25.00 Pumps B.Conc
30.00 Pumps B.Conc
32.00 Pumps B.Conc
35.00 Pumps B.Conc
38.00 Pumps B.Conc
40.00 Pumps B.Conc
42.00 Pumps B.Conc
45.00 Controller Stop
Fluxo 1.0 mL/min - FORNO 40C
Volume 20UL - pressão= 137kg/c

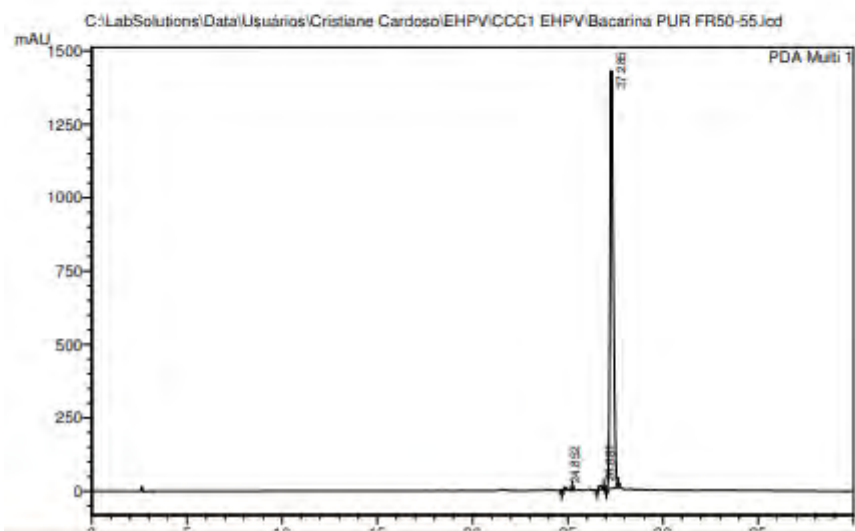


Figura A9. Perfil cromatográfico por HPLC-PDA (280 nm) da fração CCC1 FR 50-55 com purificação (bacarina).

C:\...Cristiane Cardoso\EHPV\CCC9 EHPV\CCC 9 FR 15.lcd
INFORMAÇÕES DA AMOSTRA
Sample Name : CCC 9 FR 15
Injection Volume : 20 µL
Data File Name : CCC 9 FR 15.lcd
Method File Name : Análise Propolis Nova CCC.lcm

Chl 280nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area %
1	28.377	3.368
2	29.755	96.632
Total		100.000

INFORMAÇÕES DO MÉTODO
HPLC Shimadzu PROMINENCE
LC-20AT, CBM-20A
HPLC SHIMADZU - PROMINENCE
BOMBA LC-20AT-Detector SPD-M20A
Forno CTO-20A - Autosampler SIL-10AF
Coluna C18 (25cm x4.6mm x5µm) Betasil Thermo Nova
Método Análise Propolis Nova CCC
PDA-200-500nm (320-NM)
Solvente: B: MeOH:1%AcOH(35%)- A:H2O:1%ACOH65%)
20.00 Pumps B.Conc
25.00 Pumps B.Conc
30.00 Pumps B.Conc
32.00 Pumps B.Conc
35.00 Pumps B.Conc
38.00 Pumps B.Conc
40.00 Pumps B.Conc
42.00 Pumps B.Conc
45.00 Controller Stop
fluxo 1.0 mL/min - FORNO 40C
Volume 20UL - pressão= 136kgf/c

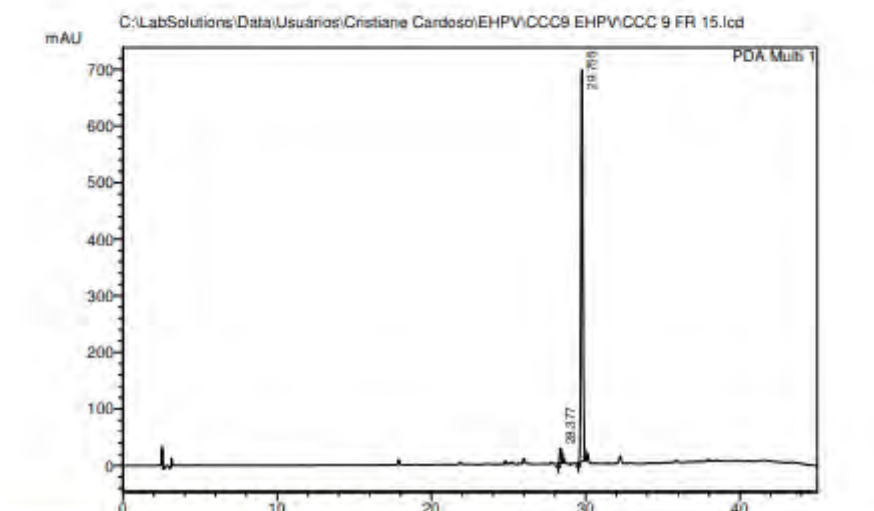


Figura A10.Perfil cromatográfico por HPLC-PDA (280 nm) da fração CCC3 FR 15 (culifolina).

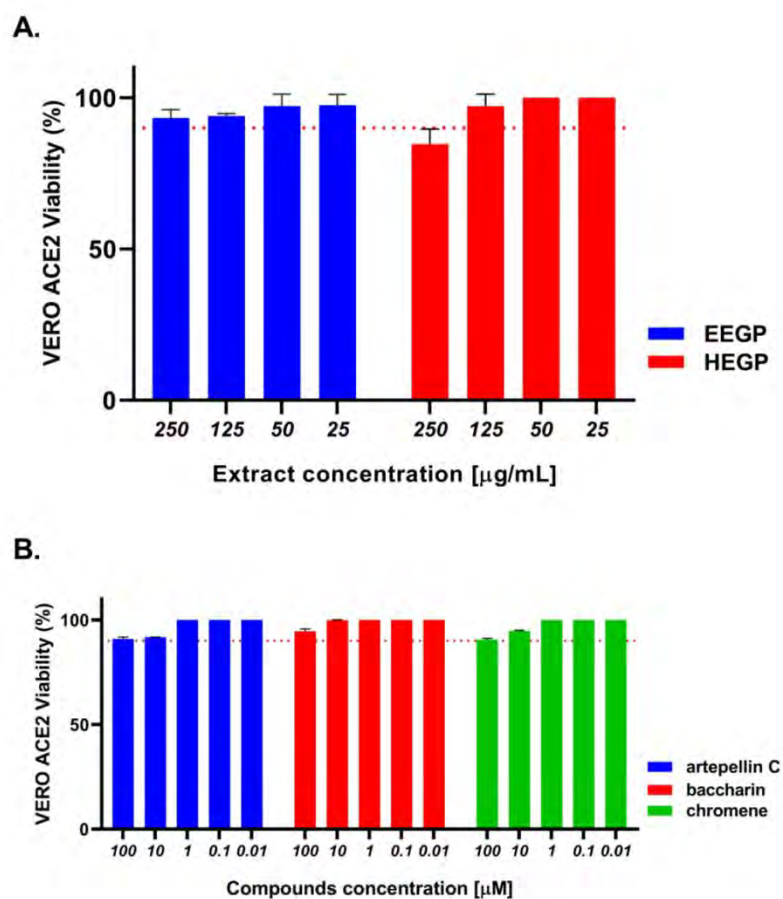


Figura A11. Viabilidade das células Vero E6-ACE2 após tratamento com extratos de própolis brasileira (A) e seus derivados prenólicos isolados (B) em diferentes concentrações, avaliada pelo teste colorimétrico MTT (5mM, 1x PBS). A viabilidade celular total foi determinada pela quantificação da metabolização do corante por células não tratadas normalizadas para o controle do veículo ($n = 3$). A linha vermelha no gráfico marca 90% da viabilidade celular.

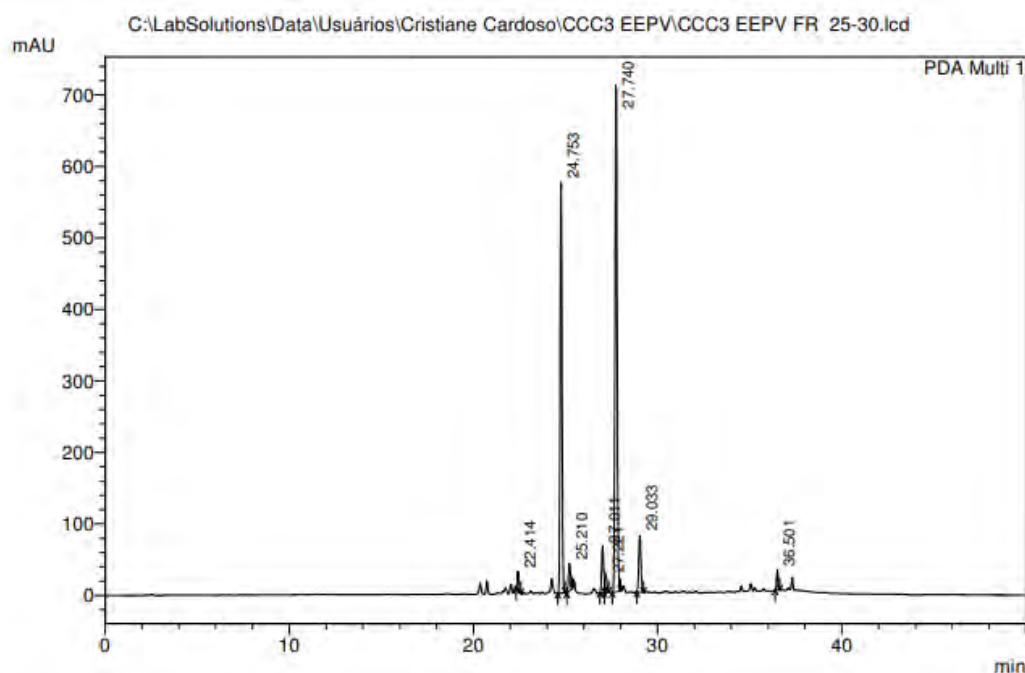


Figura A12. Perfil cromatográfico por HPLC-PDA(280nm) em fase reversa da fração CCC3 FR 25-30.

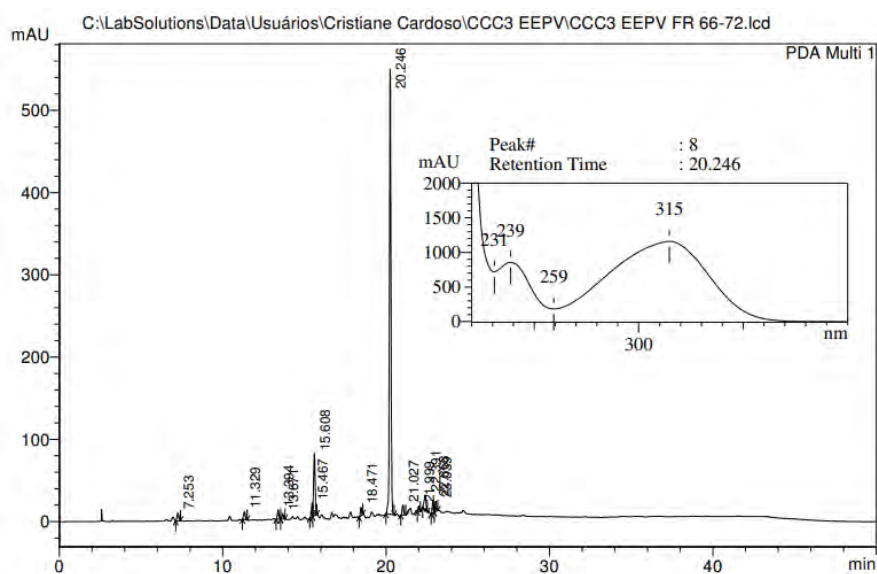


Figura A13. Perfil Cromatográfico por HPLC-PDA(280nm) em fase reversa do prenilado isolado capilatermisina A/B da fração 66-72 do CCC3 de EEPV

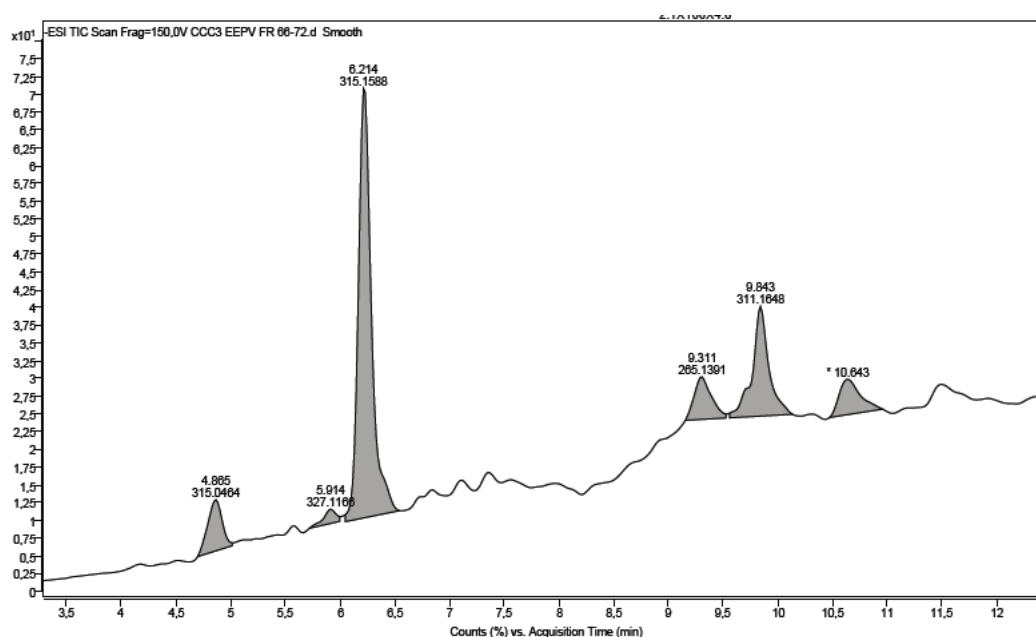


Figura A14. Análise por HPLC-ESI-MS (modo negativo). Íon molecular verificado em LC-ESI-MS do prenialdo isolado capilartemisina A/B 316 g/mol ($[M-H]^-$ 315) presente na fração 66-72 do CCC3 de EEPV

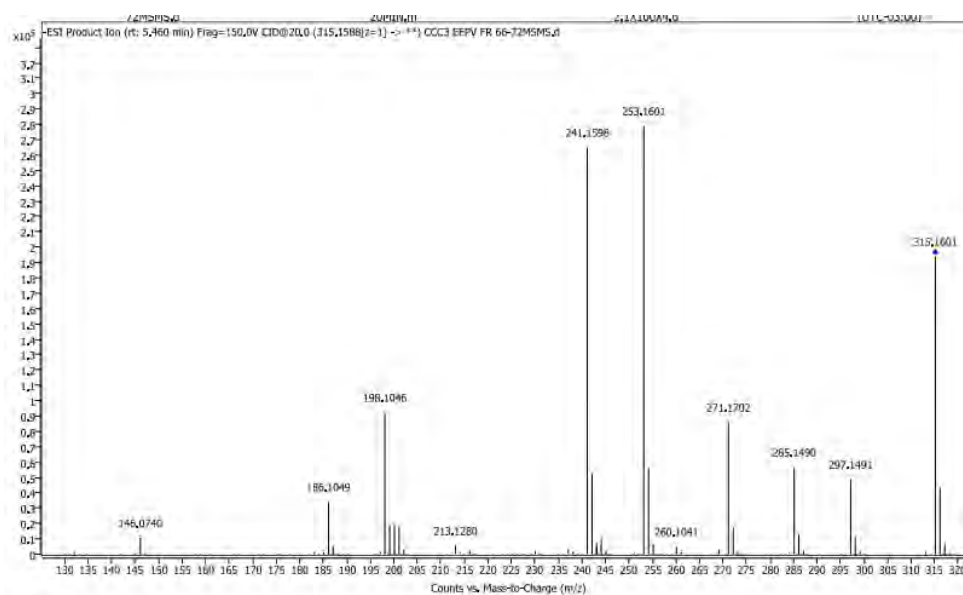


Figura A15. Análise por HPLC-ESI-MSMS (modo negativo) em modo targeted do íon produto ($[M-H]^-$ 315.1588) em tempo de retenção de 5min da fração 66-72 do CCC3 de EEPV

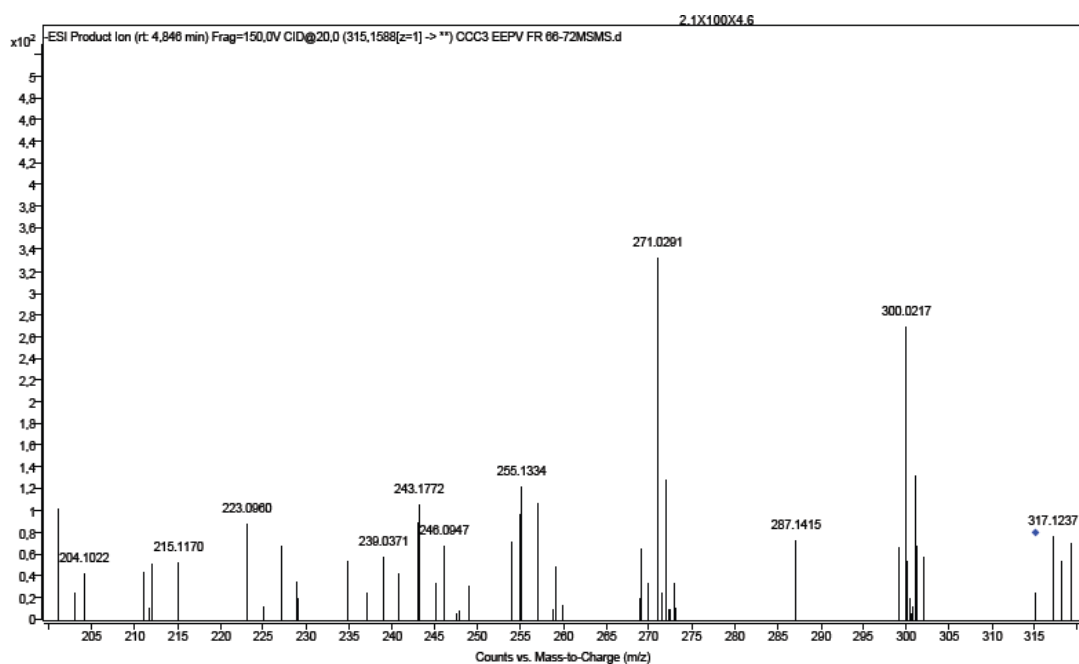


Figura A16. Análise por HPLC-ESI-MSMS (modo negativo) em modo targeted do íon produto ($[M-H]^-$ 315.0508) em tempo de retenção de 4.8 min da fração 66-72 do CCC3 de EEPV confirmando a presença de Rhamenetina.

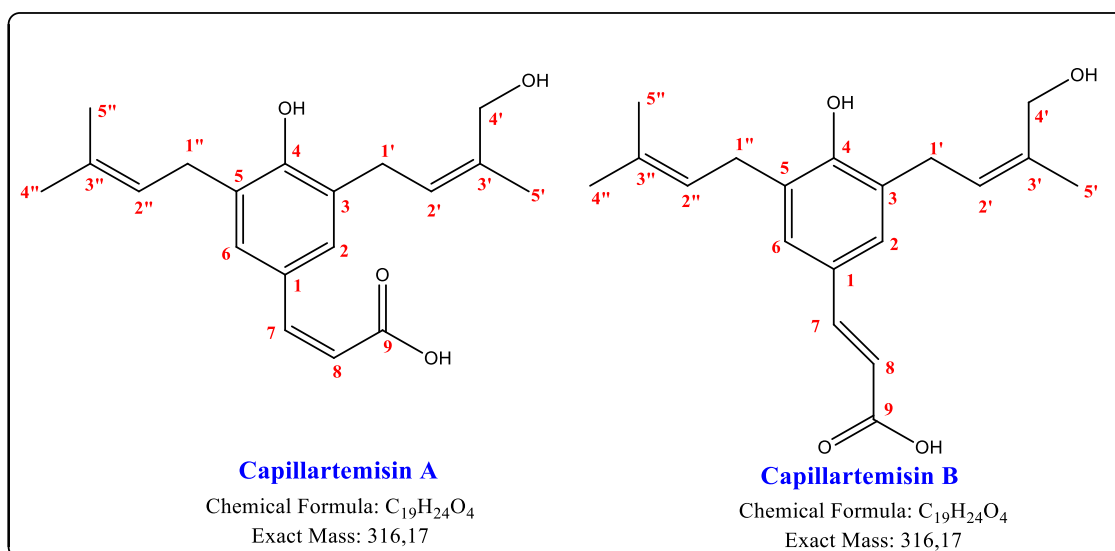


Figura A17. Estruturas químicas do composto prenilados presente na fração 66-72 do CCC3 de EEPV.

Tabela A2. Dados de ressonância magnética nuclear (RMN) do ^1H e ^{13}C do prenilado capilartermisina presente na fração de CCC3 EEPV 66-72 utilizando DMSO

	Capillartemisin A (cis)				Capillartemisin B (Trans)			
	δ_{C}	δ_{H}	$^3J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}	$^3J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C								
1	129.09	-	H-2, H-6, H-7	2H-1'', H-8	129.09	-	H-2, H-6, H-7	2H-1'', H-8
3	129.28	-	H-2, 2H-1'	H-2'', H-6	129.28	-	H-2, 2H-1'	H-2'', H-6
4	155.13	-	-	H-1', H-1'', H-6	155.13	-	-	H-1', H-1'', H-6
5	126.00	-	H-6, H-1''	H-2''	126.00	-	H-6, H-1''	H-2''
9	168.38	-	H-8	H-7	-	-	H-8	H-7
3'	136.80	-	H-5', H-4', H-2'	H-1'	136.80	-	H-5', H-4', H-2'	H-1'
3''	132.27	-	H-4'', H-5'', H-2''	H-1''	132.27	-	H-4'', H-5'', H-2''	H-1''
CH								
2	127.87	7.21 (d, 7.5)			127.87	7.21 (d, 7.5)		
6	127.87	7.21 (d, 7.5)			127.87	7.21 (d, 7.5)		
7	130.00	8.13 (d, 8.2)			145.01	7.52 (d, 16)		
8	115.74	7.01 (d, 8.4)			115.91	6.32 (d, 16)		
2'	121.64	5.51 (t, nd)			121.64	5.51 (t, nd)		
2''	122.85	5.37 (t, nd)			122.85	5.37 (t, nd)		
CH₂								
1'	28.26	3.28 (d, nd)			28.26	3.28 (d, nd)		
4'	66.74	3.82 (s)			66.74	3.82 (s)		
1''	28.81	3.28 (s)			28.81	3.28 (s)	-	-
CH₃								
5'	14.10	1.65 (s)			14.10	1.65 (s)		
4''	26.00	1.70 (s)			26.00	1.70 (s)		
5''	18.18	1.68 (s)			18.18	1.68 (s)		
OH								
4'	-	3.90			-	3.90		
4	-	6.63			-	6.63		
9	-	10.23			-	10.23		

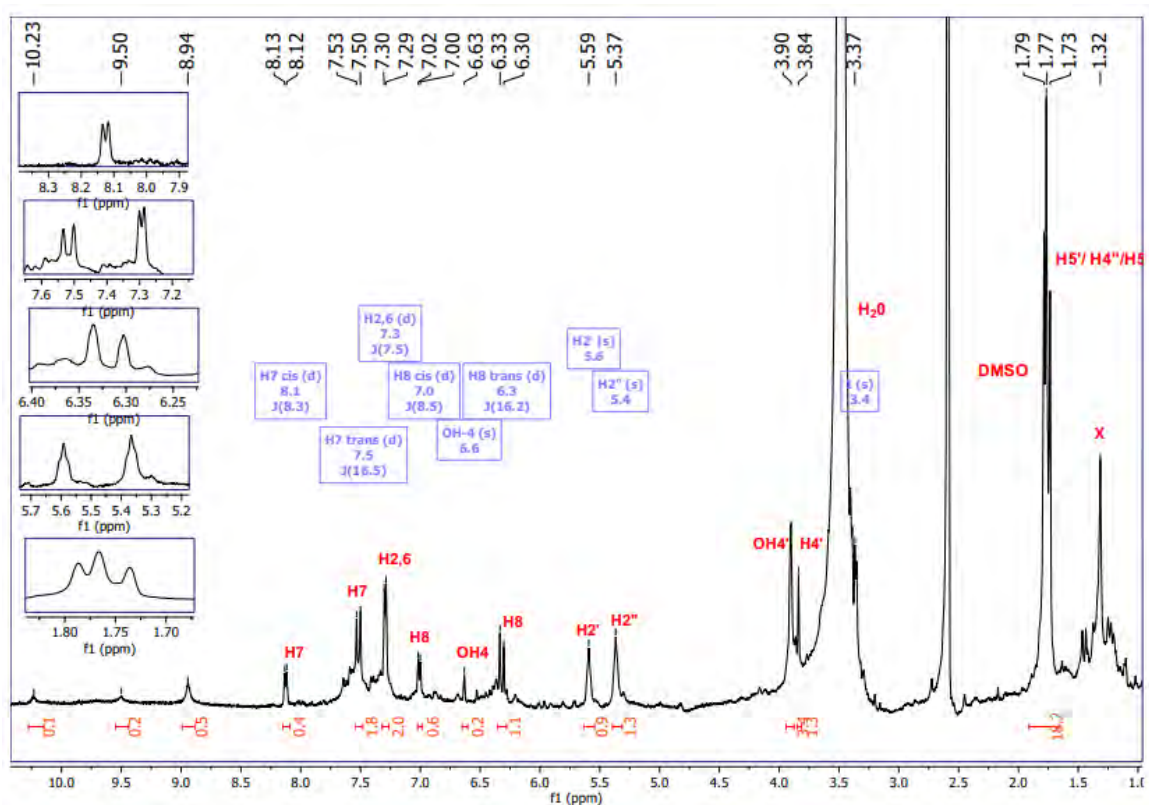


Figura A18. Espectro de RMN de ^1H do prenilyado caplattermisina presente na fração de CCC3 EEPV 66-72 (DMSO- d_6 , 500MHz)

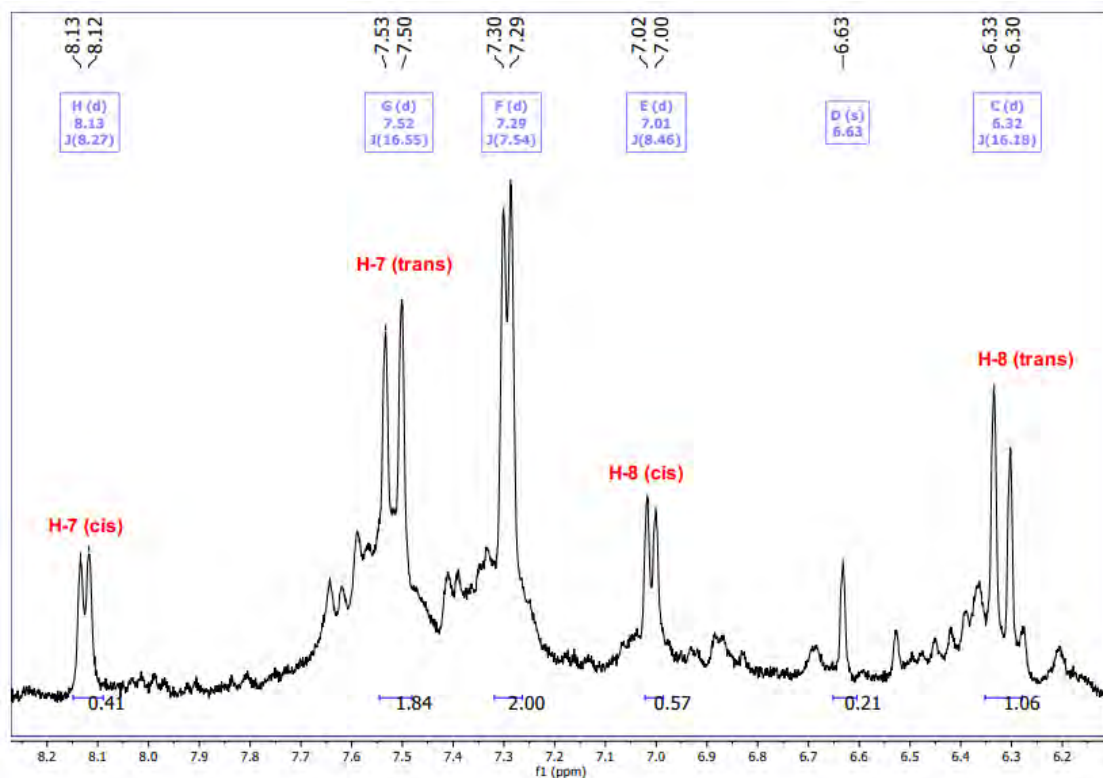


Figura A19. Espectro de RMN de ^1H expandido em 8 a 6 min do prenilyado caplattermisina presente na fração de CCC3 EEPV 66-72 (DMSO- d_6 , 500MHz)

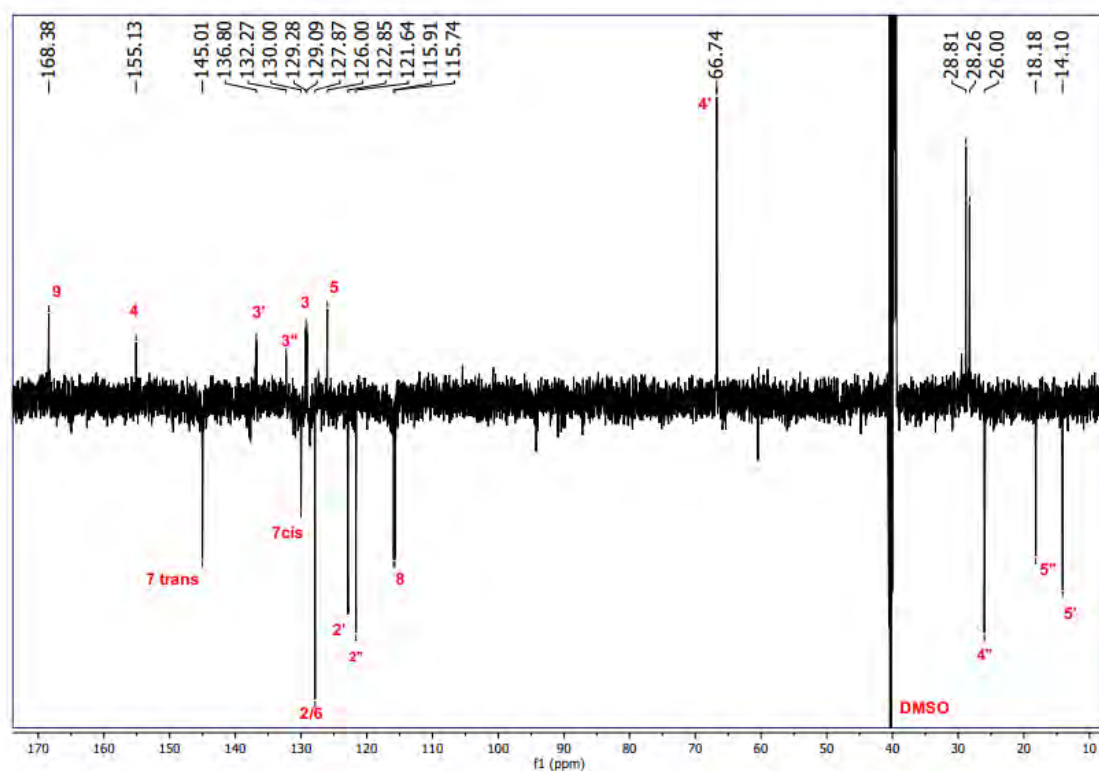


Figura A20. Espectro de RMN de ^{13}C do preniledo capilatermisina presente na fração de CCC3 EEPV 66-72 (DMSO- d_6 , 500MHZ)

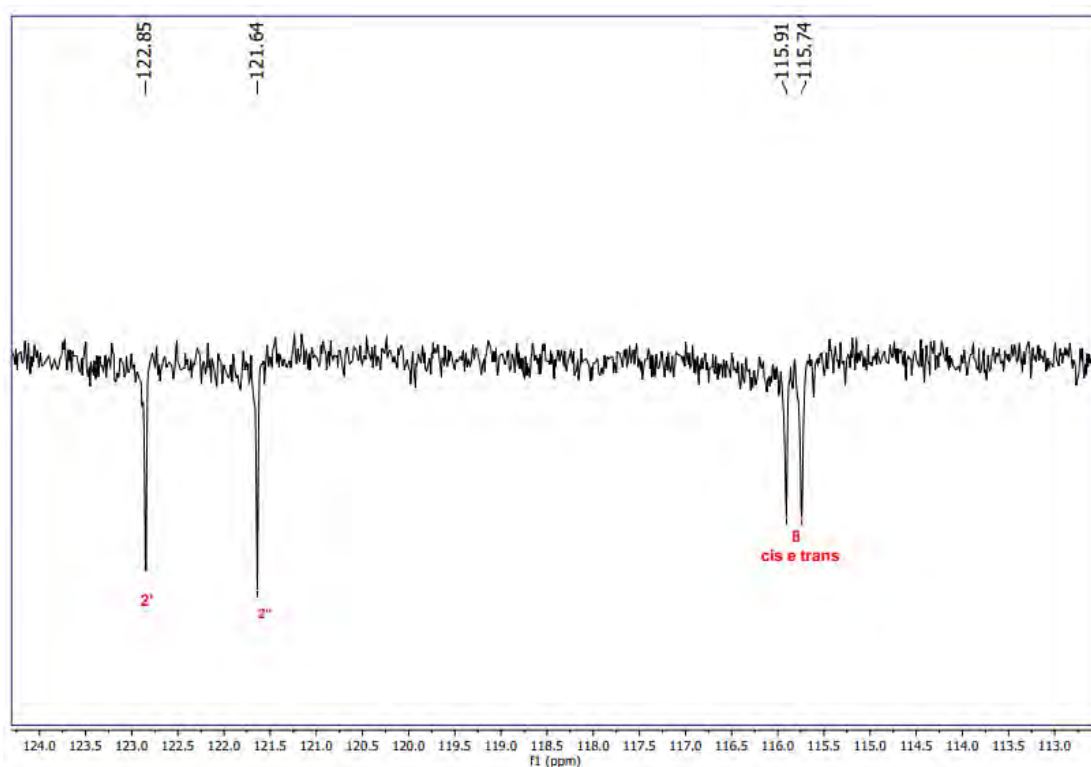


Figura A21. Espectro de RMN de ^{13}C expandido de 124 – 113 ppm do preniledo capilatermisina presente na fração de CCC3 EEPV 66-72 (DMSO- d_6 , 500MHZ)

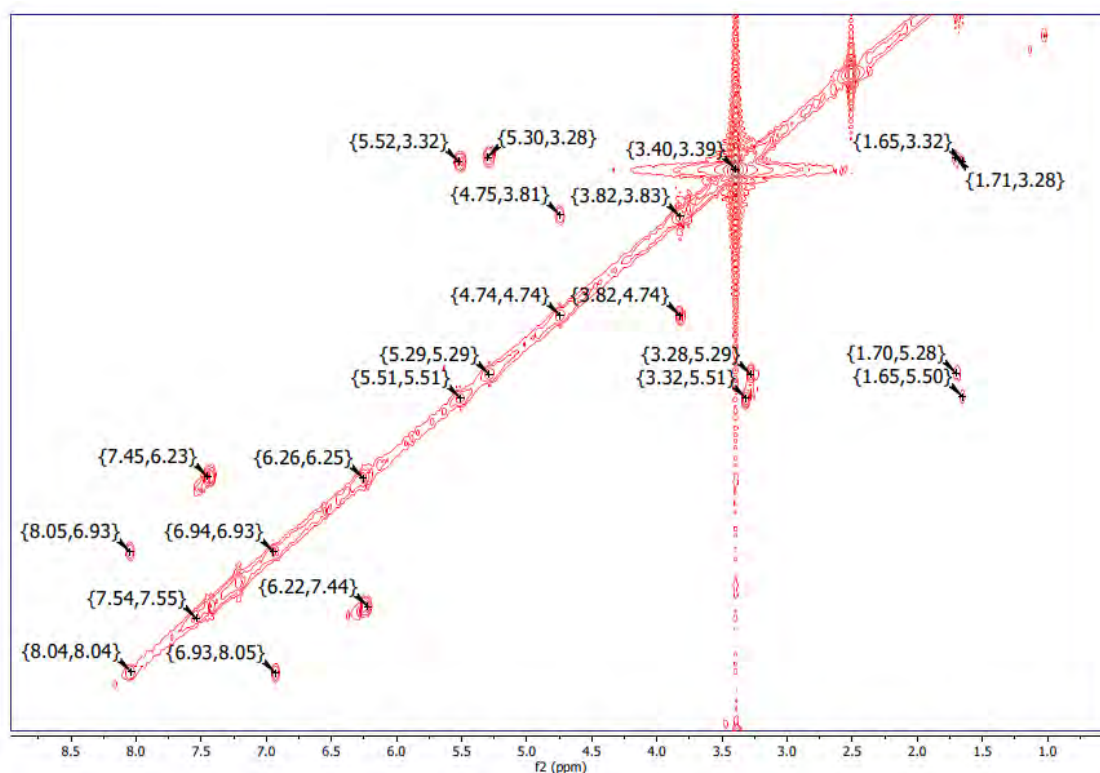


Figura A22. Espectro de RMN em COSY do prenulado capilatermisina presente na fração de CCC3 EEPV 66-72 (DMSO-d₆, 500MHZ)

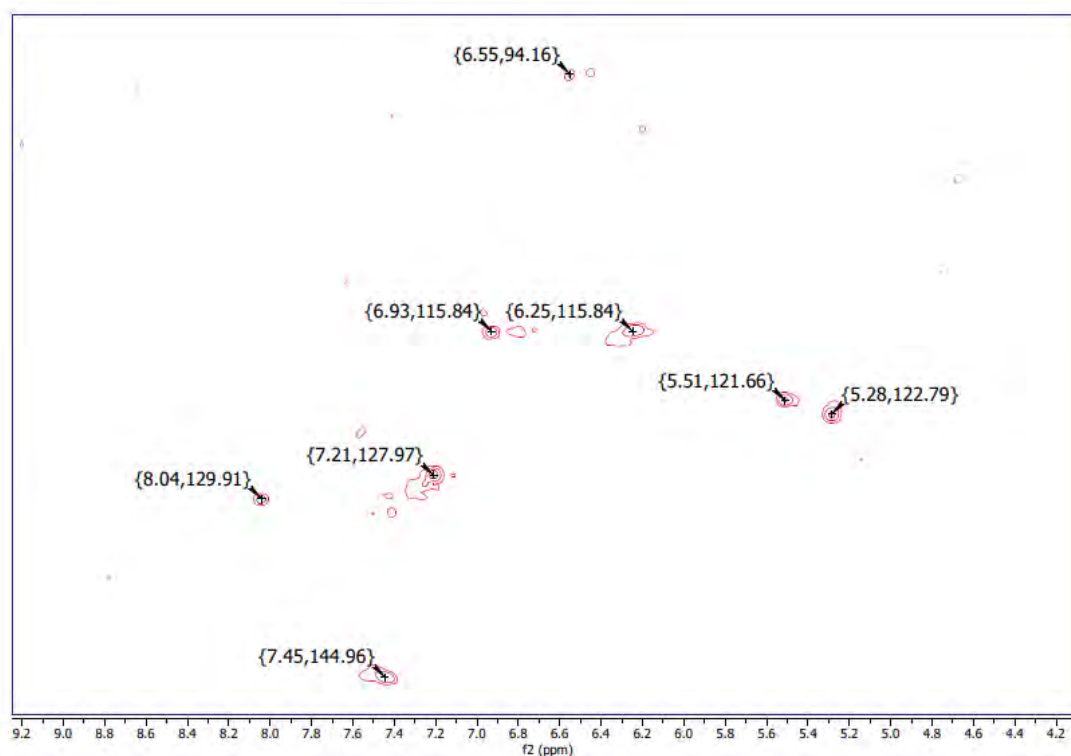


Figura A23. Espectro de HSQC expandido prenulado capilatermisina presente na fração de CCC3 EEPV 66-72 (DMSO-d₆, 500MHZ)

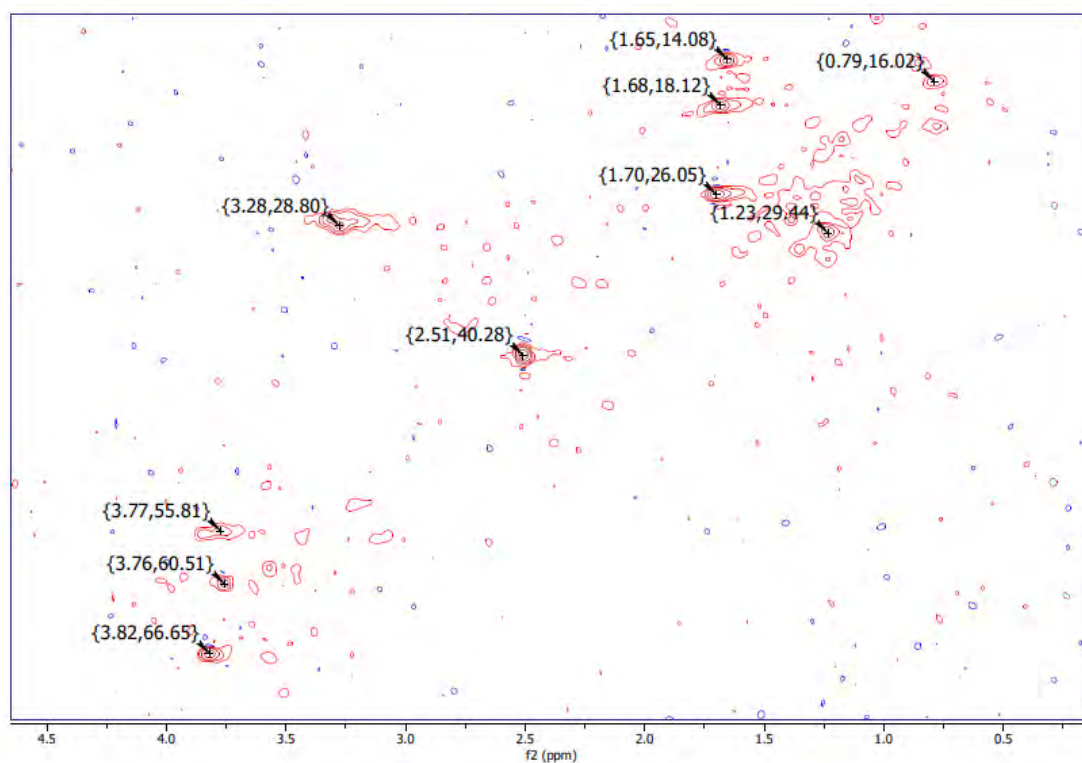


Figura A24. Espectro de HSQC expandido na região de 4.5 a 0.5 ppm do prenillado capilatermisina presente na fração de CCC3 EEPV 66-72 (DMSO-d₆, 500MHZ)

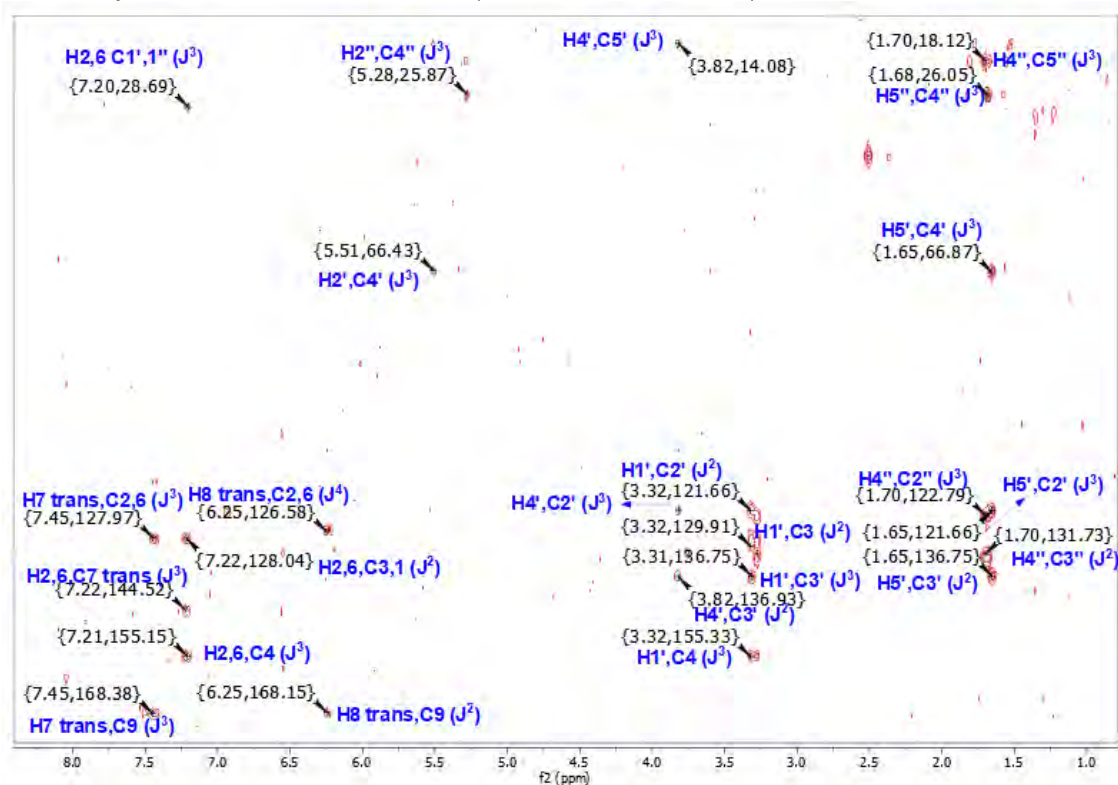


Figura A25. Espectro de HMBC expandido do prenillado capilatermisina presente na fração de CCC3 EEPV 66-72 (DMSO-d₆, 500MHZ)

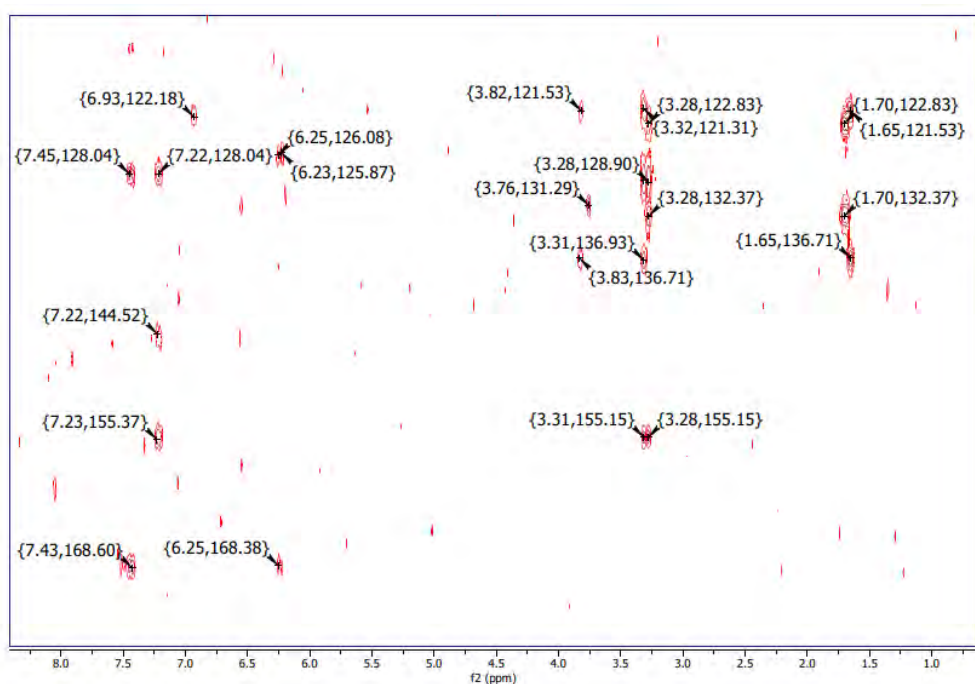


Figura A26. Espectro de HMBC expandido do prenulado capilatermisina presente na fração de CCC3 EEPV 66-72 (DMSO-d₆, 500MHZ)

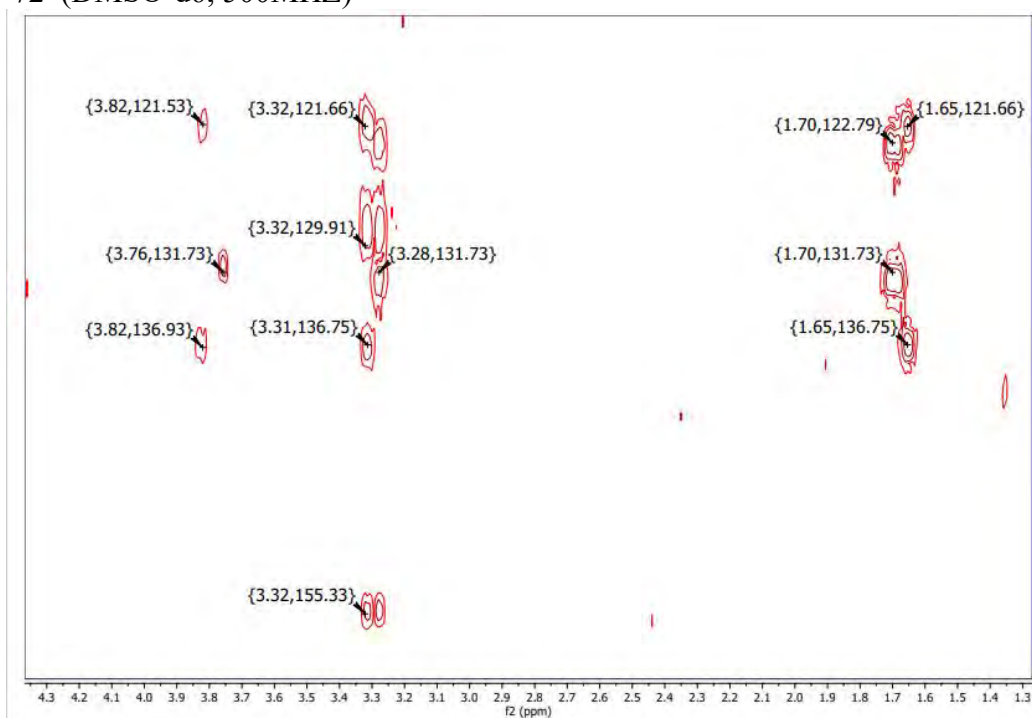


Figura A27. Espectro de HMBC expandido do prenulado capilatermisina presente na fração de CCC3 EEPV 66-72 (DMSO-d₆, 500MHZ)

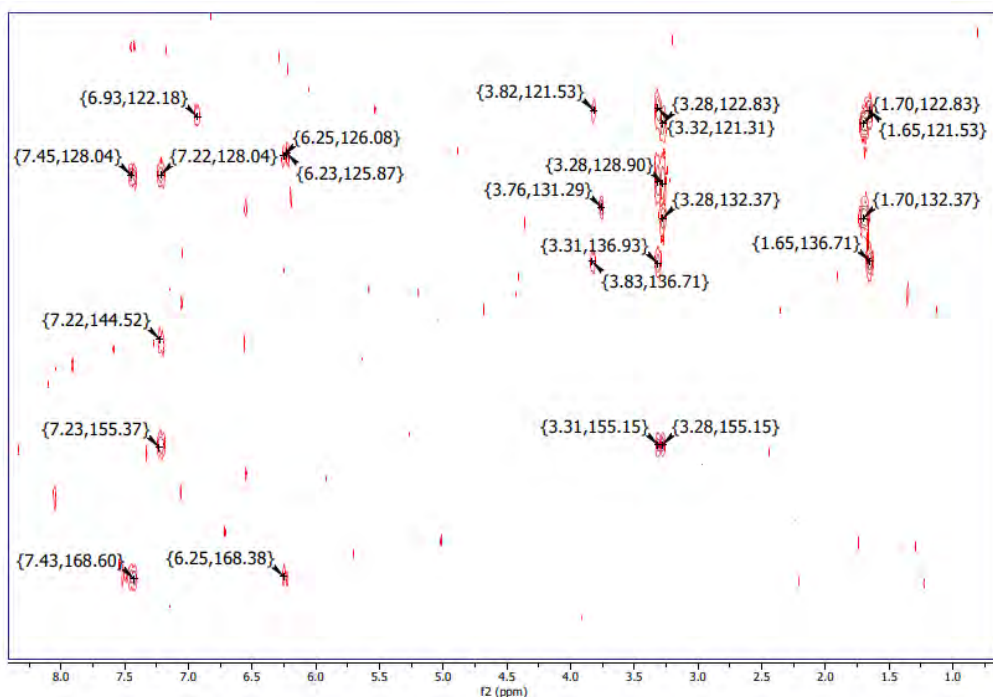


Figura A28. Espectro de HMBC expandido do prenulado capilatermisina presente na fração de CCC3 EEPV 66-72 (DMSO-d₆, 500MHZ)

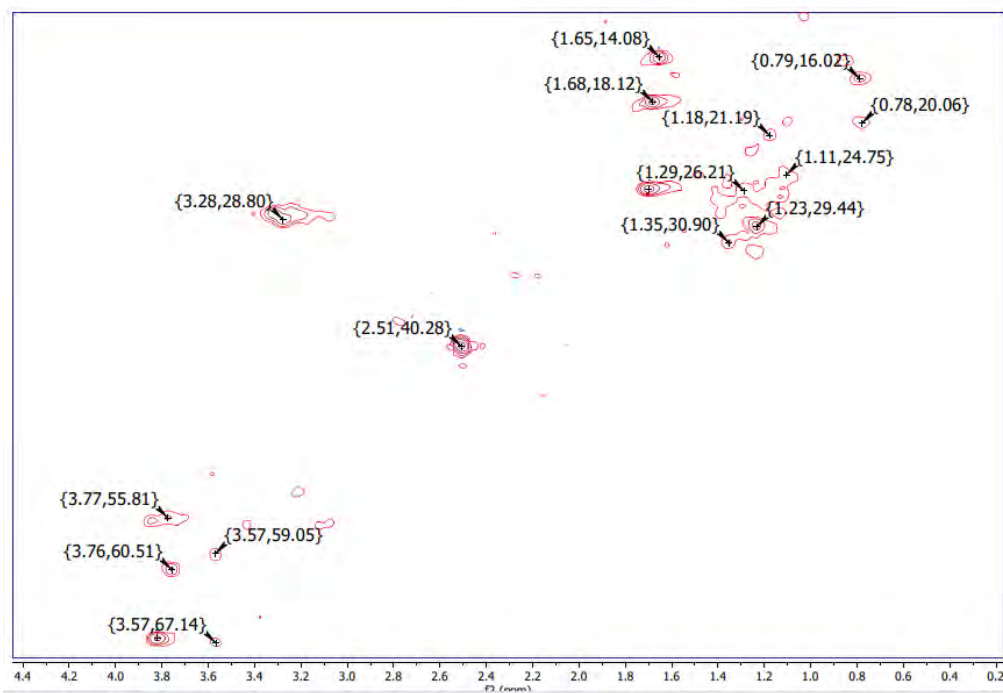


Figura A29. Espectro de HMBC expandido do prenulado capilatermisina presente na fração de CCC3 EEPV 66-72 (DMSO-d₆, 500MHZ)

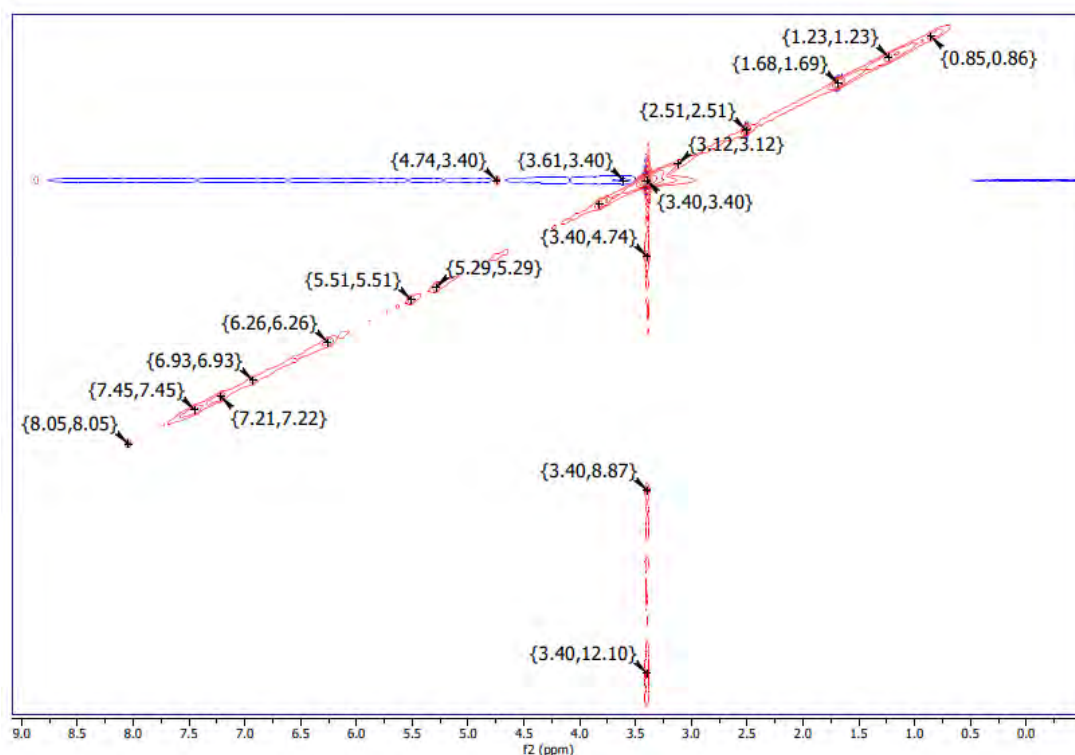


Figura A30. Espectro de RMN em NOESY do prenilado capilatermisina presente na fração de CCC3 EEPV 66-72 (DMSO-d₆, 500MHZ)

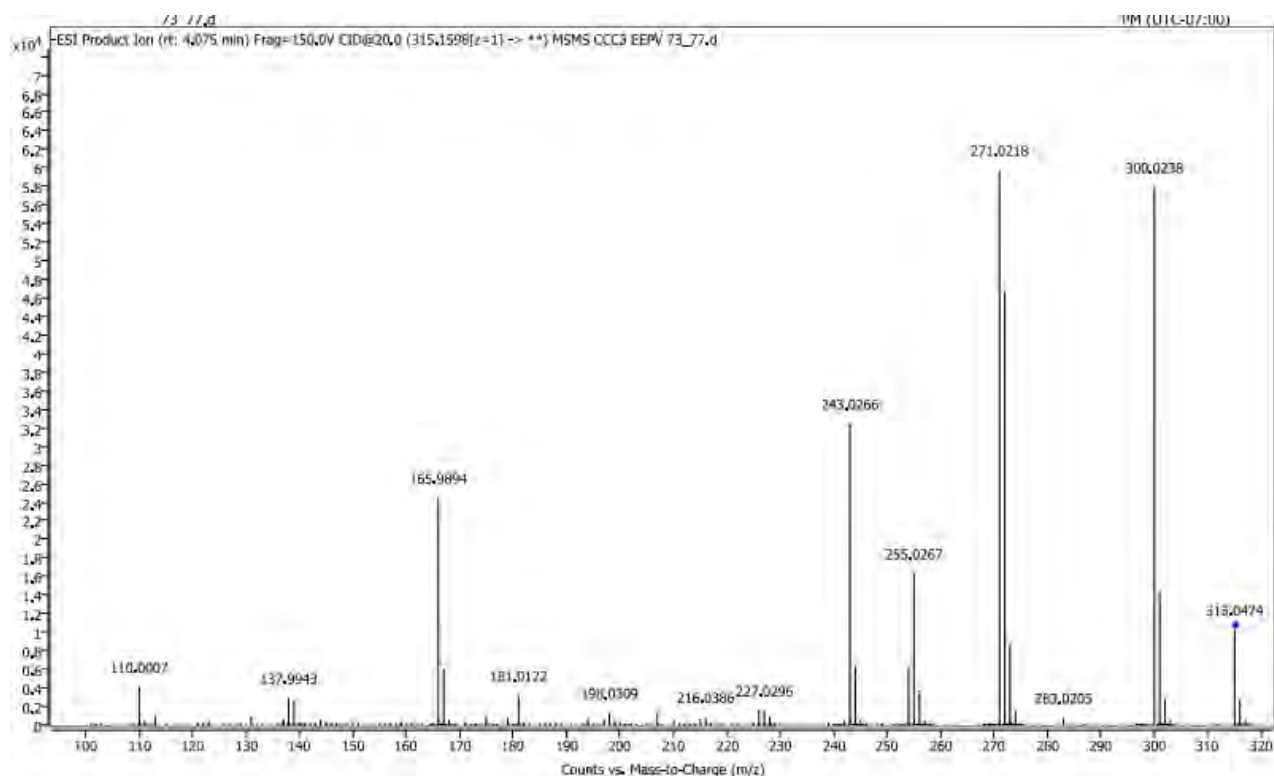


Figura A31. Análise por HPLC-ESI-MSMS (modo negativo) em modo targeted do Íon produto ($[M-H]^-$ 315.0474) em tempo de retenção de 4.075 min da fração 73-77 do CCC3 de EEPV confirmando a presença de Rhamenetina.

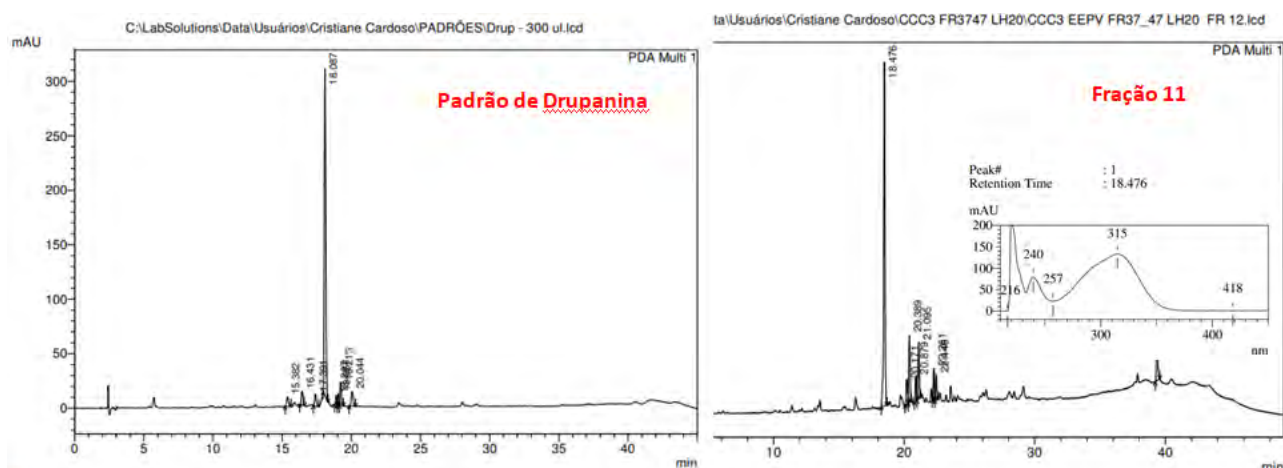


Figura A32. Perfil Cromatográfico por HPLC-PDA(280 nm) em fase reversa do padrão sintetizado (Pires & Nora, 2023) e a fração drupanina isolada por HSCCC combinado com Cromatografia de permeação em gel.

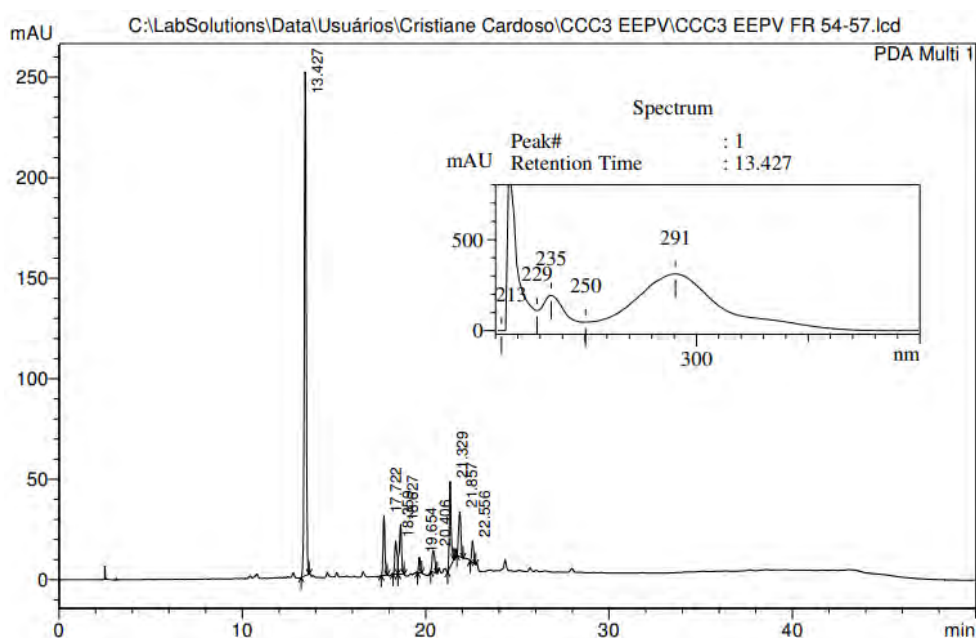


Figura A33. Perfil Cromatográfico por HPLC-PDA(280nm) em fase reversa do flavonoide isolado da fração 54-57 do CCC3 de EEPV

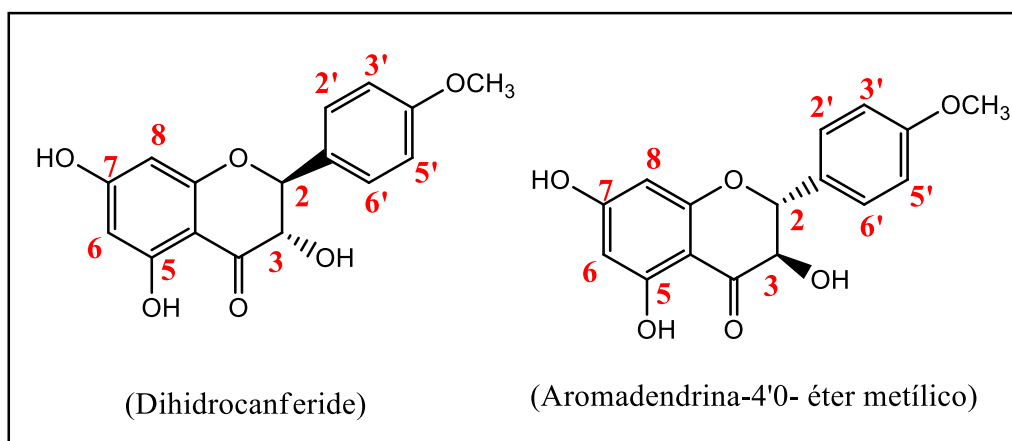


Figura A34. Estruturas químicas do flavonóide isolado da fração 54-57 de CCC1.2 de EEPV: A mistura dos flavonoides aromadendrina-4'-O- éter metílico e dihidrocanferide, isômeros do composto 7.

Tabela A3. Dados de ressonância magnética nuclear (RMN) do ^1H e ^{13}C do flavonóide isolado da fração 54-57 do CCC3 de EEPV utilizando DMSO

Dihidrocanferide				
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
4	198.22	--	H3	H2
5	162.96	--		
7	167.24	--	H6, H8	
1'	129.77	--	H2, H2',H'6'	H3
4'	159.97	--	H3',H5'	OMe, H2'6'
9	163.73		H8	
10	100.92			H6, H8
CH				
2	71.83	4.61 (dd, $J = 11.5, 6.1$ Hz, 1H)		H3 (cis e trans)
3 cis	95.45	5.87 (dd, $J = 4.3, 2.0$ Hz, 2H)		
3 trans	83.16	5.11 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H)		H2
6	95.45	5.87 (dd, $J = 4.3, 2.0$ Hz, 2H)		H8
8	96.58	5.92 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H)		H6
2" e 6"	129.91	7.44 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H)		H2
3' e 5'	114.06	6.97 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H)	H2',H6'	
CH ₂				
--	-	--	-	-
CH ₃				
-	-	--	-	-
OMe	55.65	3.77 (s, 3H)		
OH-5		11.90 (s, 1H)		
OH-7		nd		

Nd – Não detectado na análise

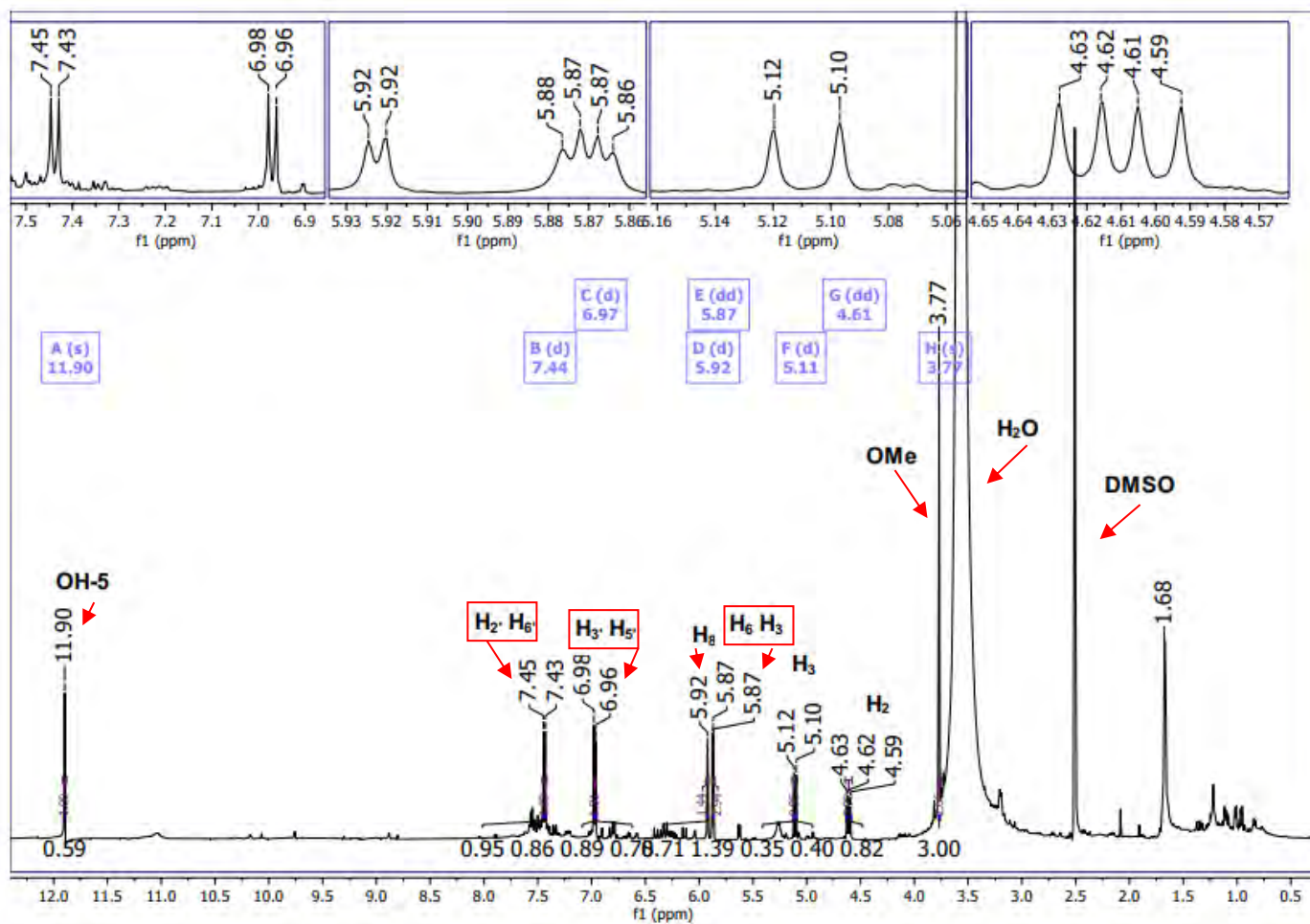


Figura A35.Espectro de RMN de ^1H do flavonóide isolado da fração 54-57 do CCC3 de EEPV(DMSO-d_6 , 500MHZ)

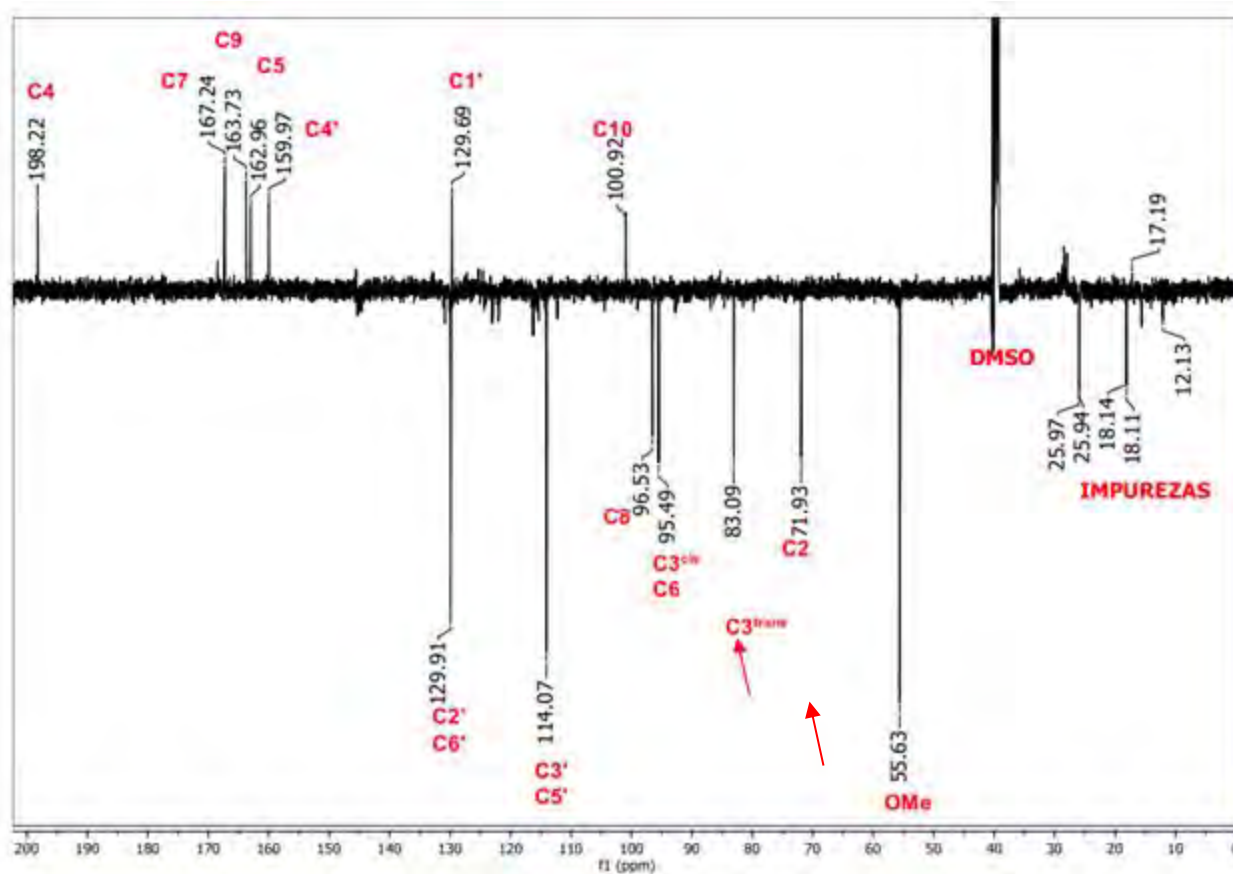


Figura A36. Espectro de RMN de ^{13}C do flavonóide isolado da fração 54-57 do CCC3 de EEPV (DMSO- d_6 , 500MHZ)

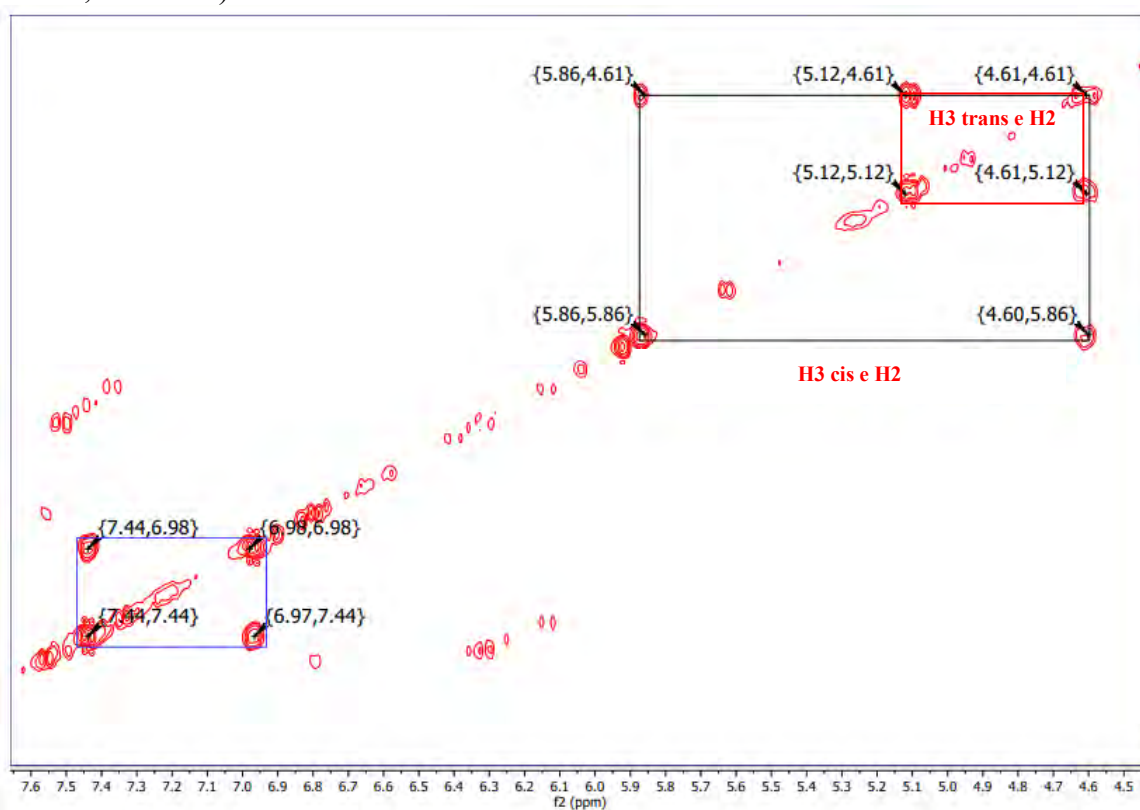


Figura A37. Espectro de RMN em COSY do flavonóide isolado da fração 54-57 do CCC3 de EEPV (DMSO- d_6 , 500MHZ)

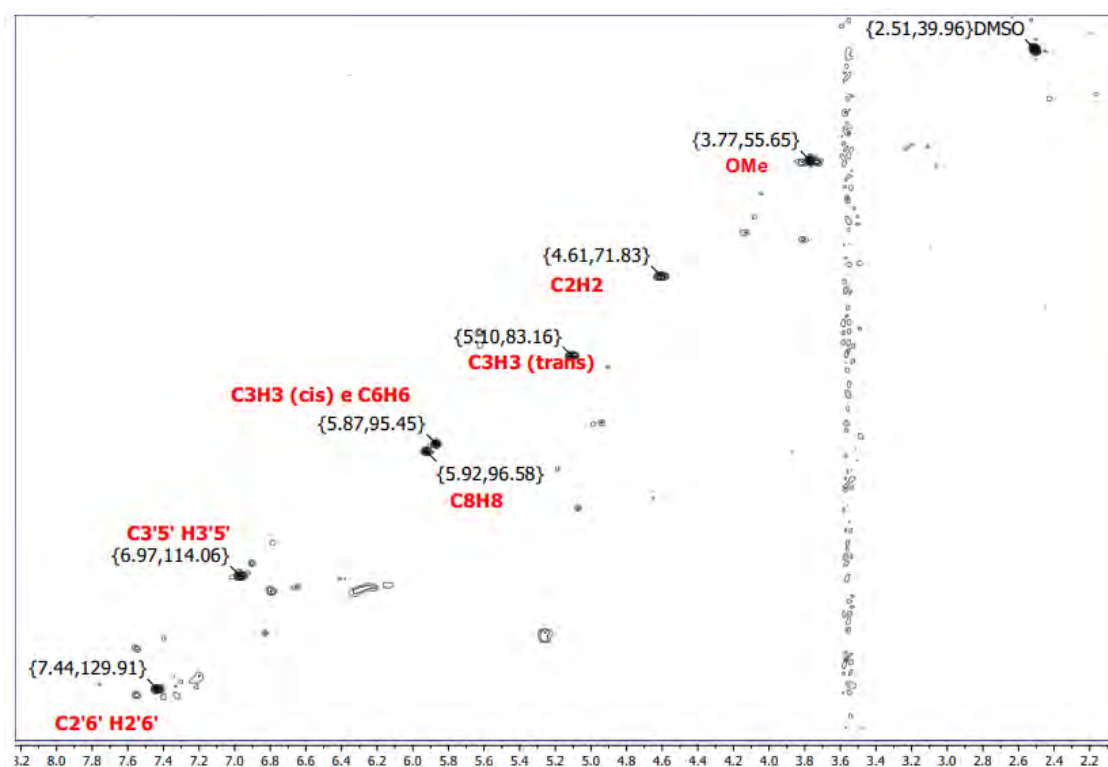


Figura A38. Espectro de HSQC do flavonóide isolado da fração 54-57 do CCC3 de EEPV (DMSO-d₆, 500MHZ)

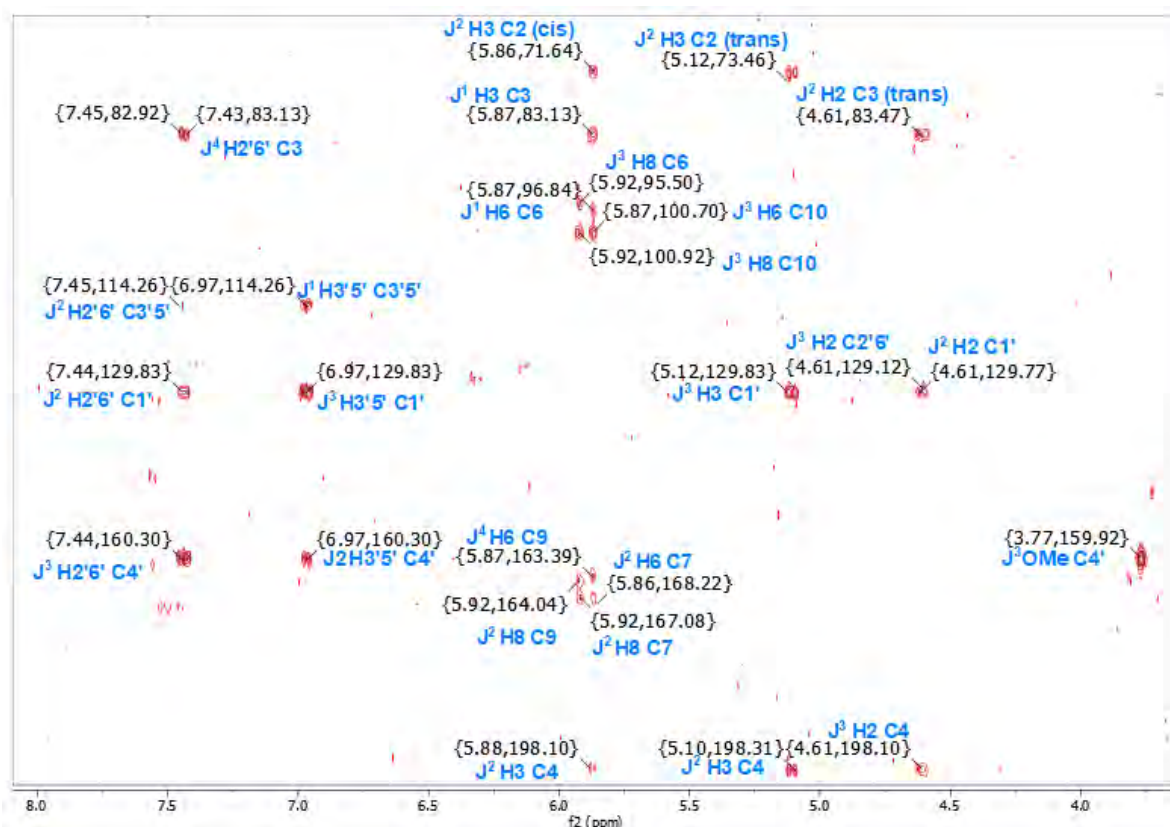


Figura A39. Espectro de HMBC do flavonóide isolado da fração 54-57 do CCC3 de EEPV (DMSO-d₆, 500MHZ)

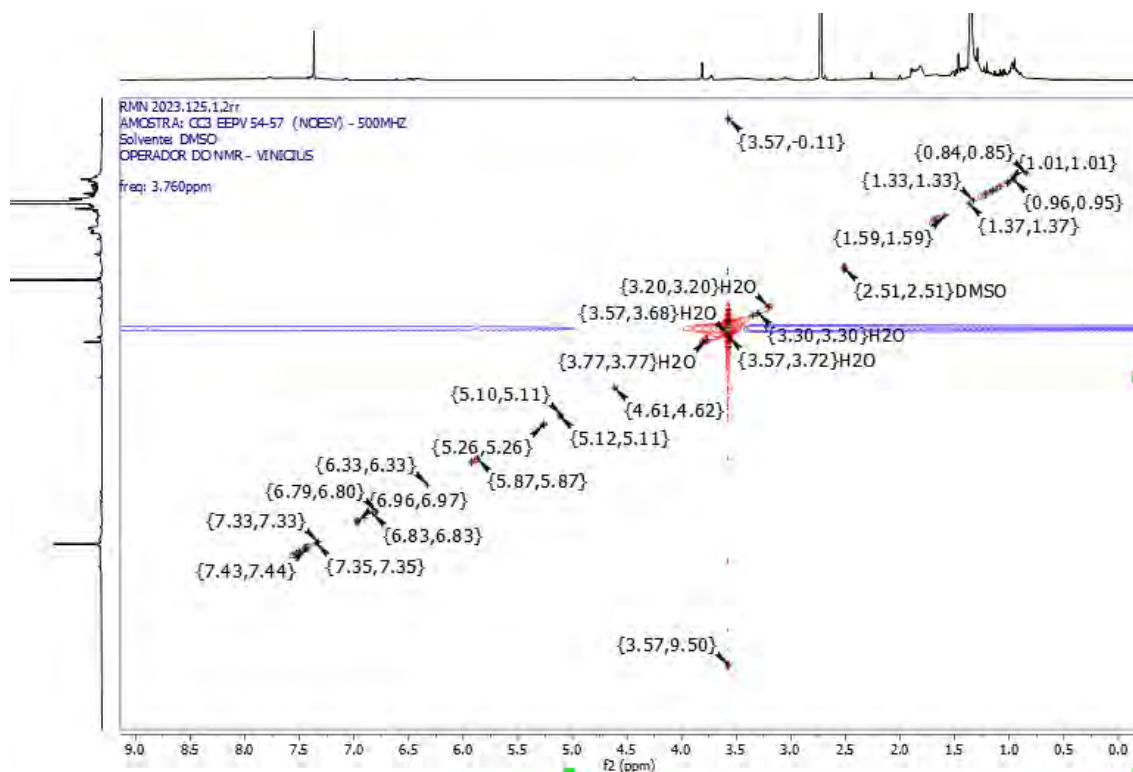


Figura A40. Espectro de RMN em NOESY do flavonóide isolado da fração 54-57 do CCC3 de EEPV (DMSO-d₆, 500MHZ)

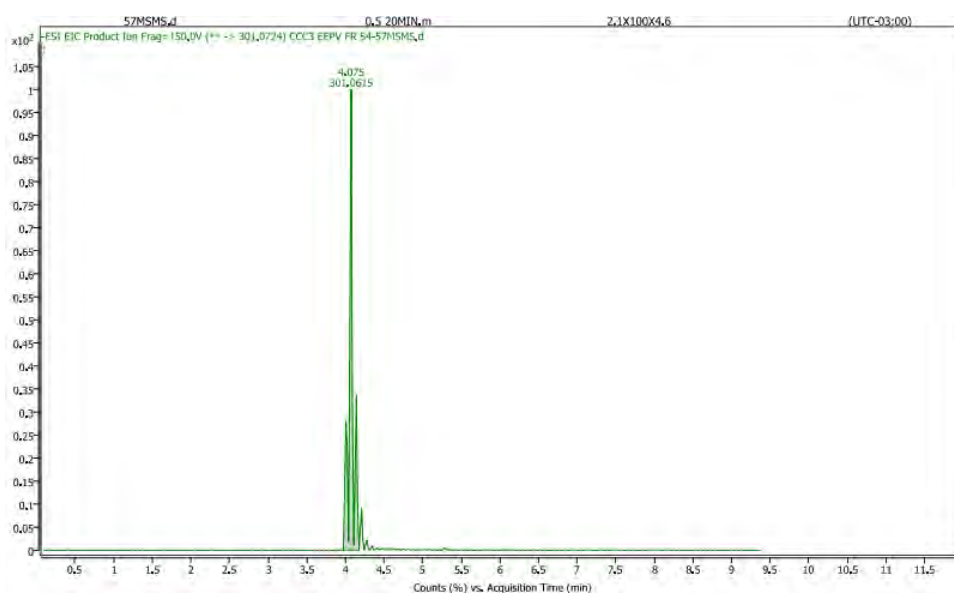


Figura A41. Análise por HPLC-ESI-MS (modo negativo). Íon Molecular Extraído (EIC) verificado em LC-ESI-MS do flavonóide isolado da fração 54-57 do CCC3 de EEPV com 302 g/mol ([M-H]⁻ 301)

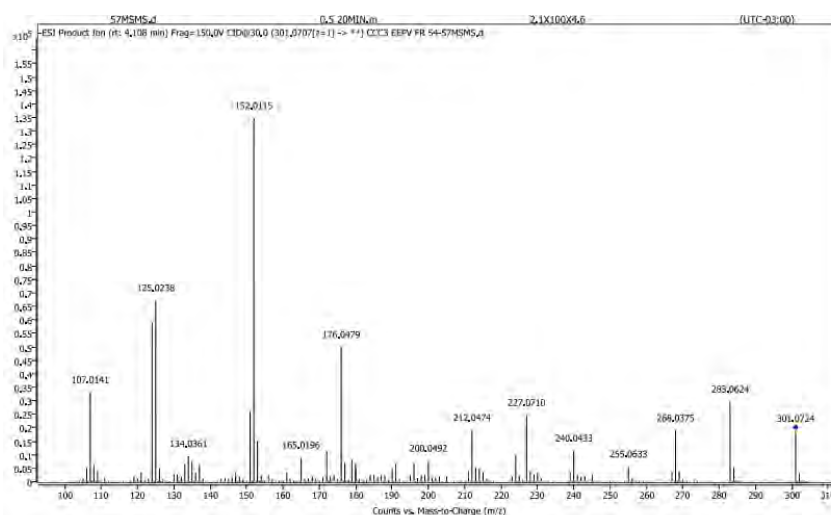


Figura A42. Análise por HPLC-ESI-MSMS (modo negativo) em modo targeted do Íon produto ($[M-H]^{-}$ 301) em tempo de retenção de 5min do flavonóide isolado da fração 54-57 do CCC3 de EEPV

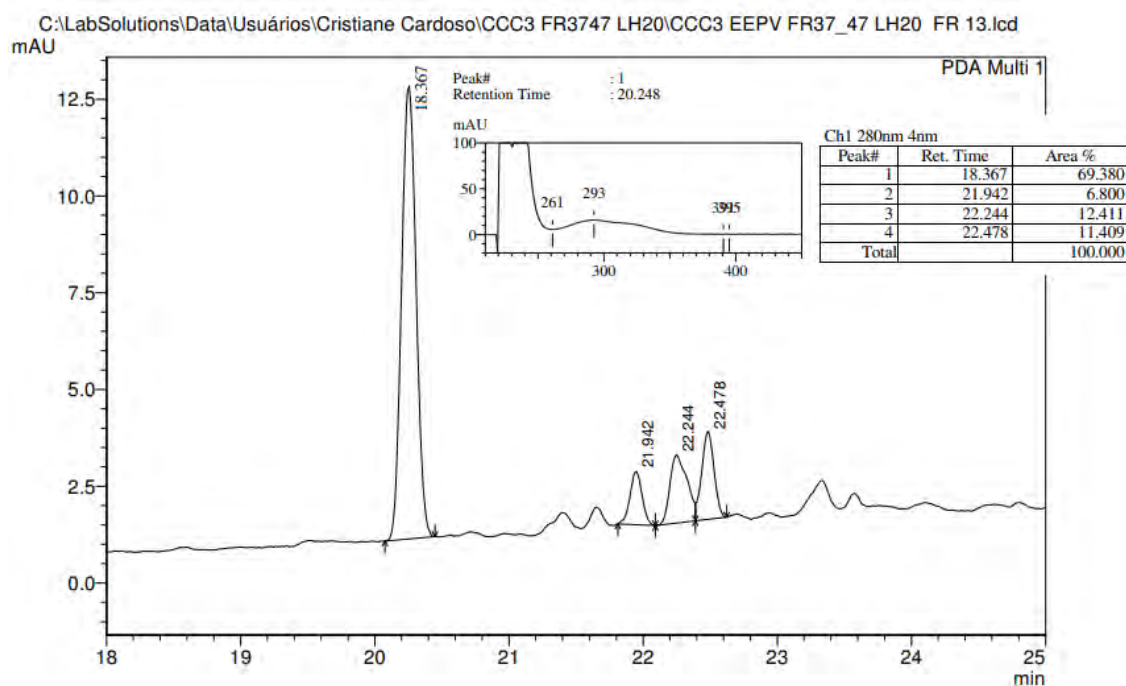


Figura A43. Perfil Cromatográfico por HPLC-PDA(280 nm) em fase reversa expandido entre 18-25 min da fração 13- 15 isolada de HSCCC combinado com Cromatografia de permeação em gel .

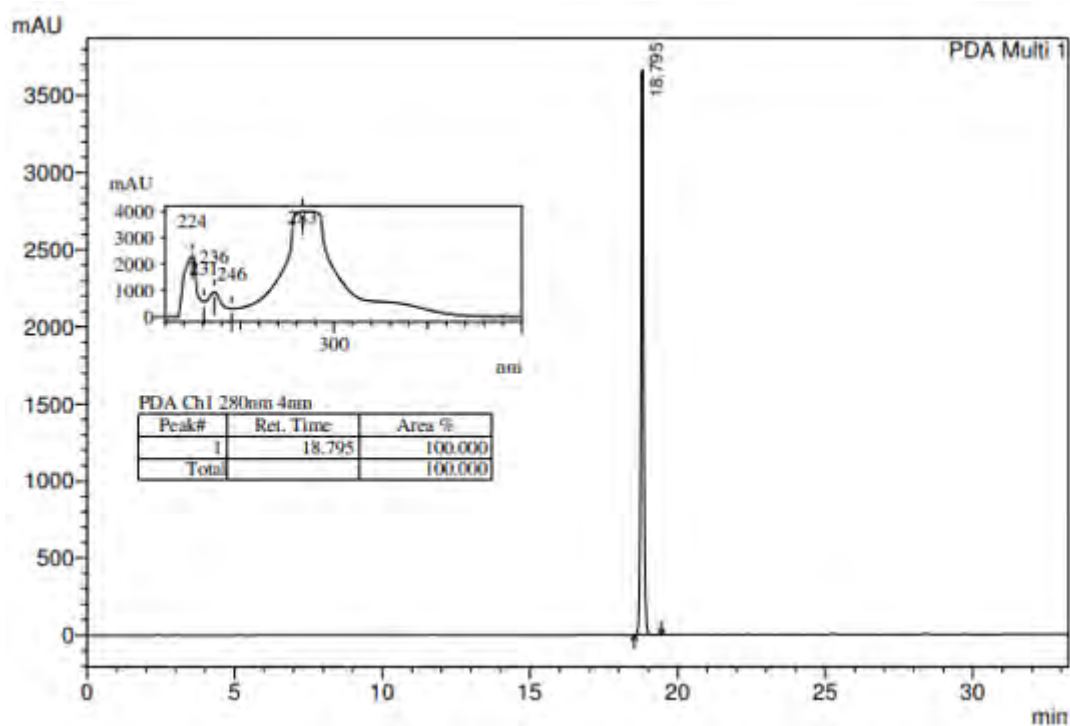


Figura A44. Perfil Cromatográfico por HPLC-PDA (280nm) em fase reversa do padrão comercial sakuranetina

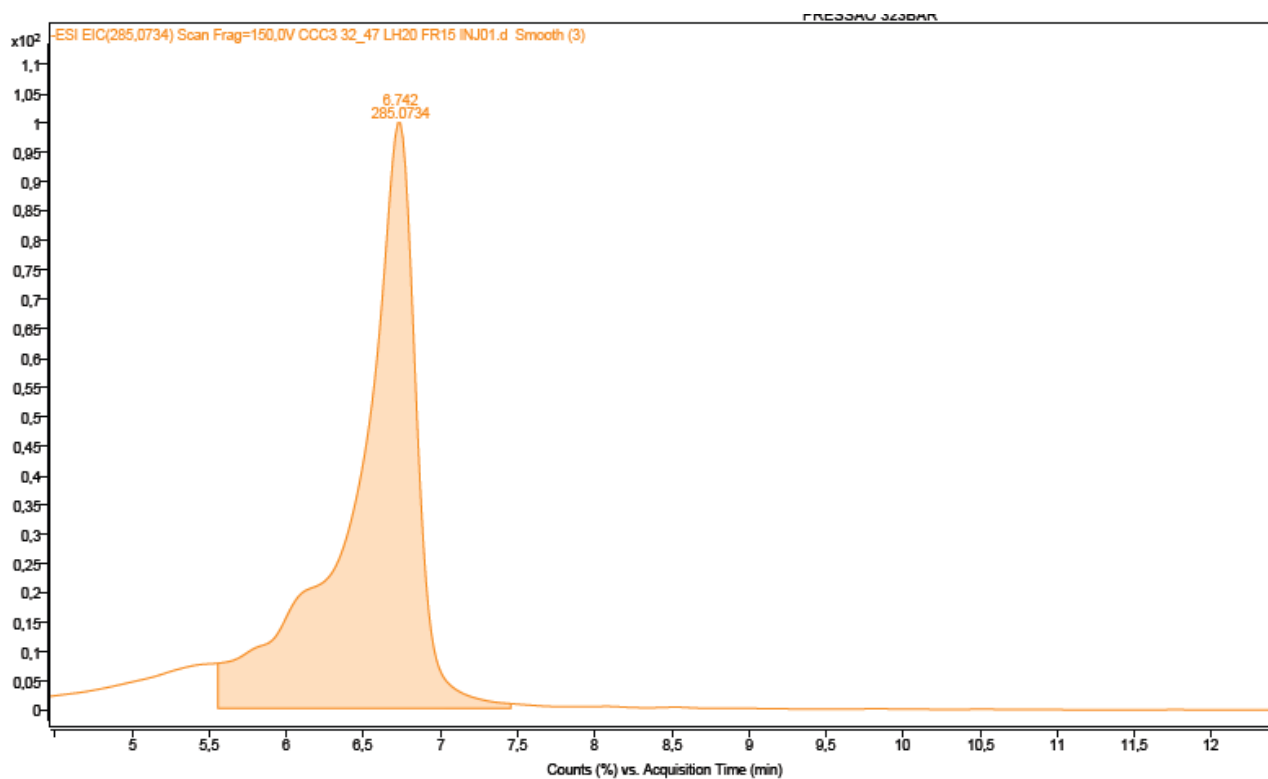


Figura A45. Análise por HPLC-ESI-MS (modo negativo). Íon molecular verificado em LC-ESI-MS de isosakuranetina ($[M-H]^{-}$ 285) presente na fração 13 a 15 da cromatografia de permeação em gel.

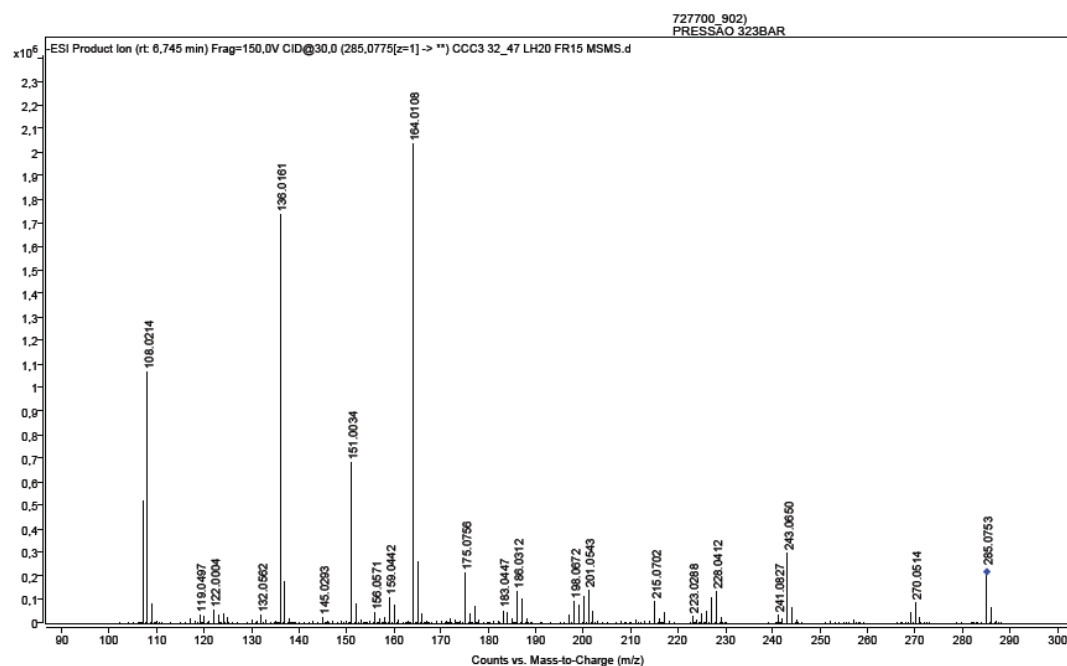


Figura A46. Análise por HPLC-ESI-MSMS (modo negativo) do Íon produto ([M-H]-285.0734) da fração 13 a 15 da cromatografia de permeação em gel confirmando a isosakuranetina (SURET *et al*, 2021).

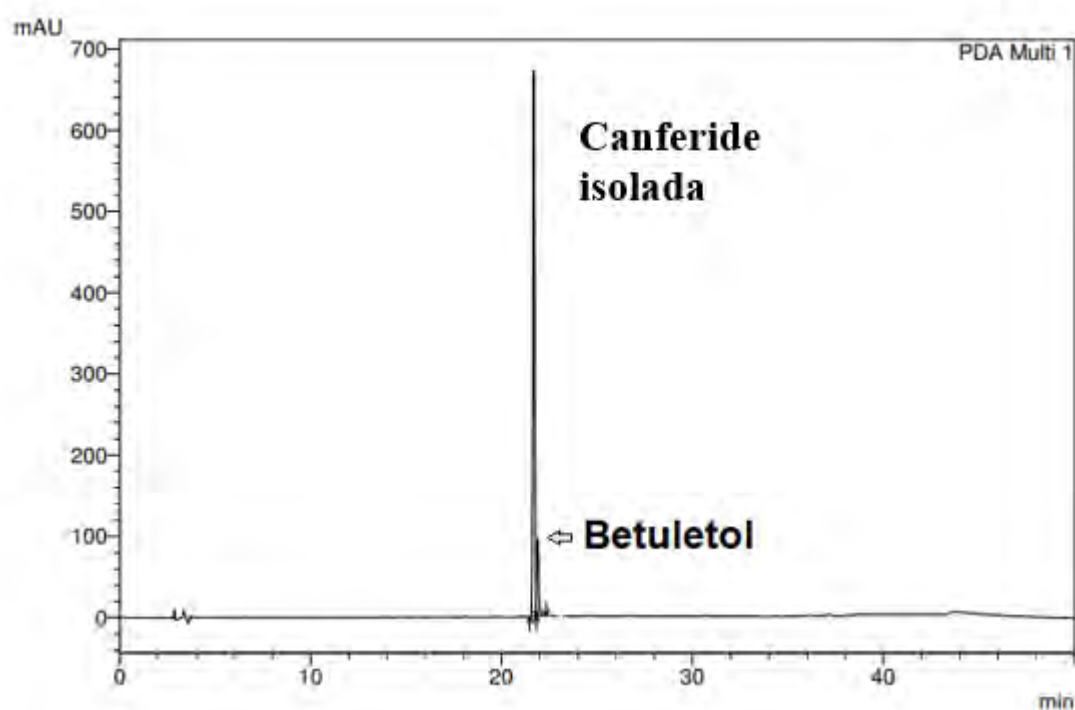


Figura A47. Perfil Cromatográfico por HPLC-PDA(280nm) em fase reversa da canferide isolada de HSCCC

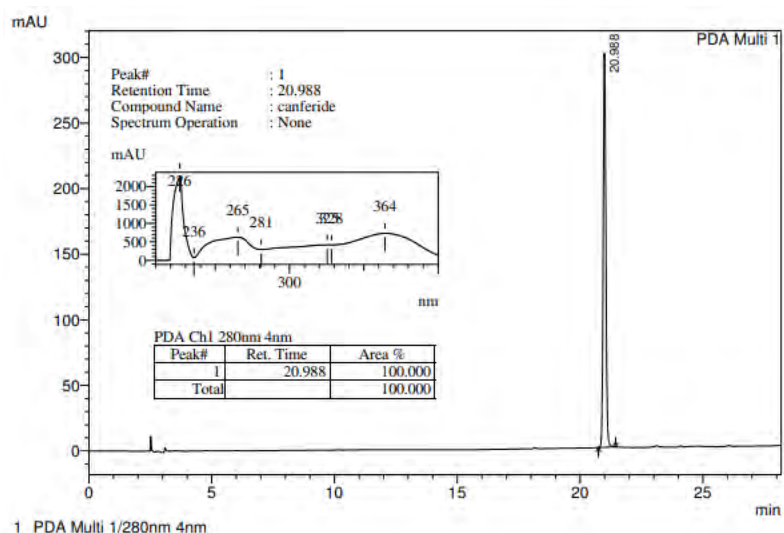
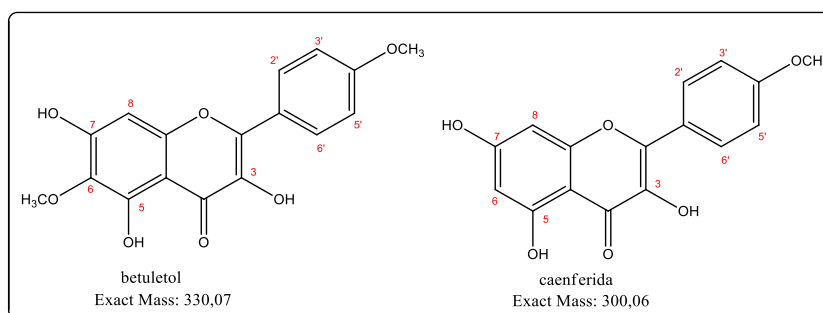


Figura A48. Perfil Cromatográfico por HPLC-PDA (280nm) em fase reversa do padrão comercial canferide

Tabela A4. Dados de ressonância magnética nuclear (RMN) do ^1H e ^{13}C da fração 21-35 (betuletol) utilizando DMSO e de canferide utilizando acetona- d_6



Betuletol (DMSO)	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	COSY
C					
2	146,85	--			
3	136,23				
5	152,20	--			
6	131,37	--			
7	151,86	--			
9	157,78	--			
10	103,96				
1'	123,67				
CH					
8	94,21	6,56 (s)	C7,C9	C6,C10	
2'' e 6''	129,84	8,13 (d)		C2,C4'	7,13
3' e 5'	114,45	7,13 (d)	C4'	C1'	8,13
CH₂					
--		--	-		
CH₃					
4'-OMe	55,74	3,84 (s)		C4'	
6-OMe	60,39	3,75 (s)		C6	
OH -3		9,53 (s)	C3	C2,C4'	
OH -5		12,53 (s)	C5	C10,C6	
OH-7		10,75 (s)		C6,C8	

Canferide acetona-d6	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	COSY
C					
2	145,87	--			
3	nd	nd			
5	152,68	--			
6	98,47	6,29 (d)			
7	nd	--			
9	156,69	--			
10	102,81	--			
1'	123,42	--			
CH					
8	93,66	6,56 (s)	C7,C9	C6,C10	
2'' e 6''	129,31	8,24 (d)	C1'	C2,C4'	7,17
3' e 5'	114,04	7,17 (d)	C4'	C1'	8,24
4'	161,14				
CH₂					
CH₃					
4'-OMe	55,04	3.92 (s)			
OH -3		nd			
OH -5		12,14 (s)			
OH-7		nd			

ndSinal não detectável no RMN utilizando solvente acetona-d6

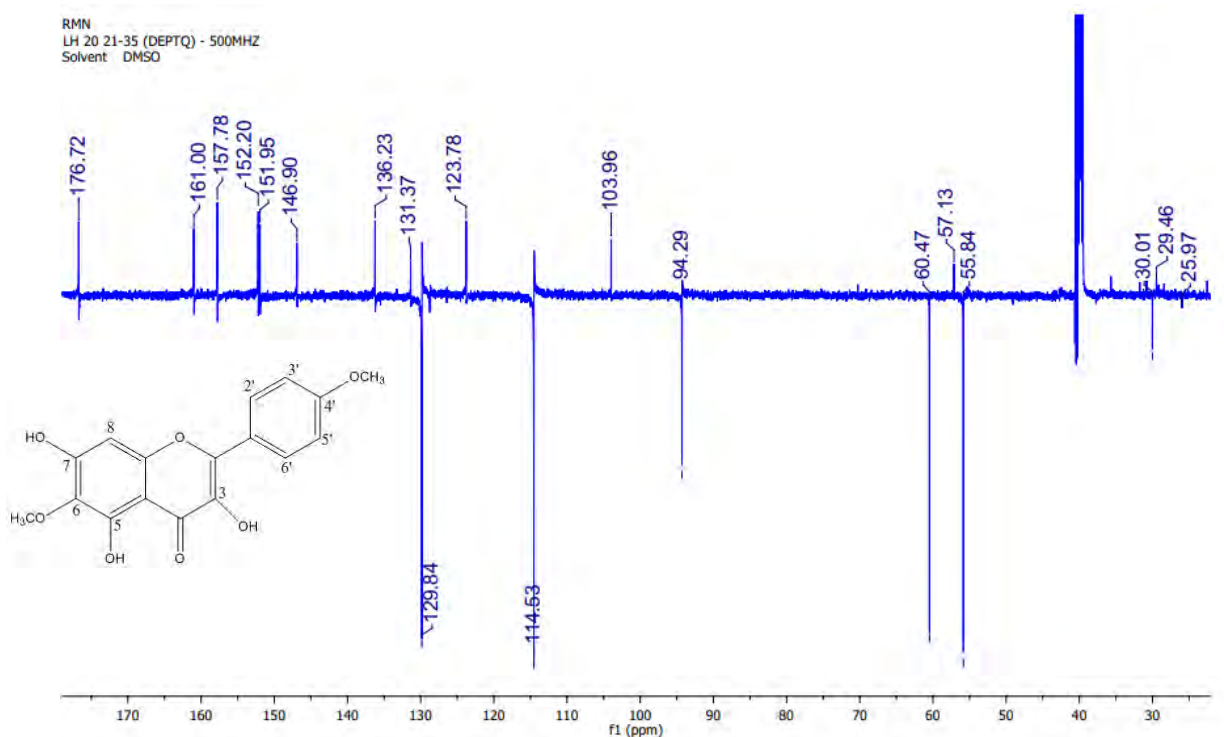


Figura A49. DEPTQ do flavonoide betuletol

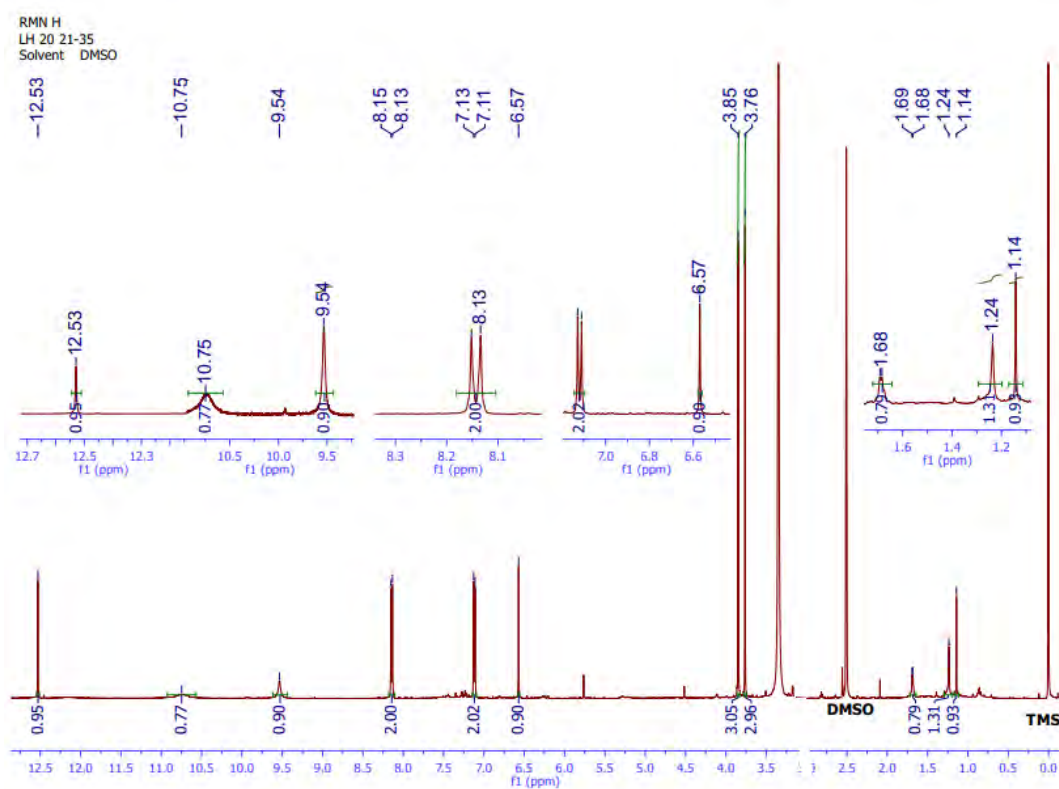


Figura A50. Espectro de RMN de ^1H do flavonoide betuletol (DMSO- d_6)

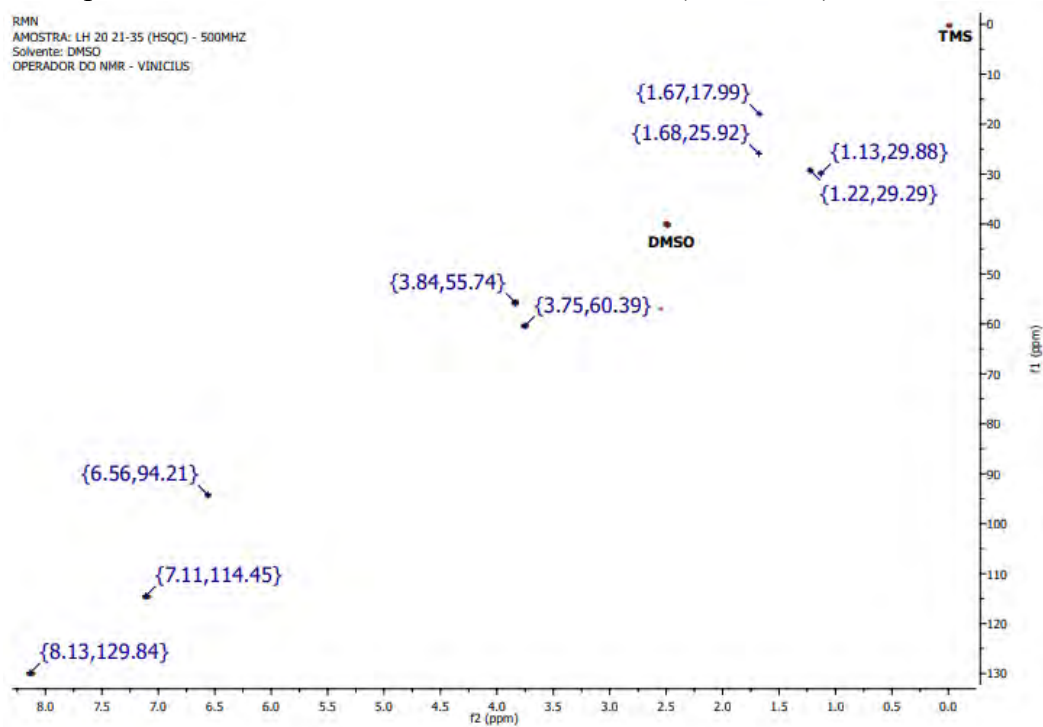


Figura A51. Espectro de HSQC do flavonoide betuletol

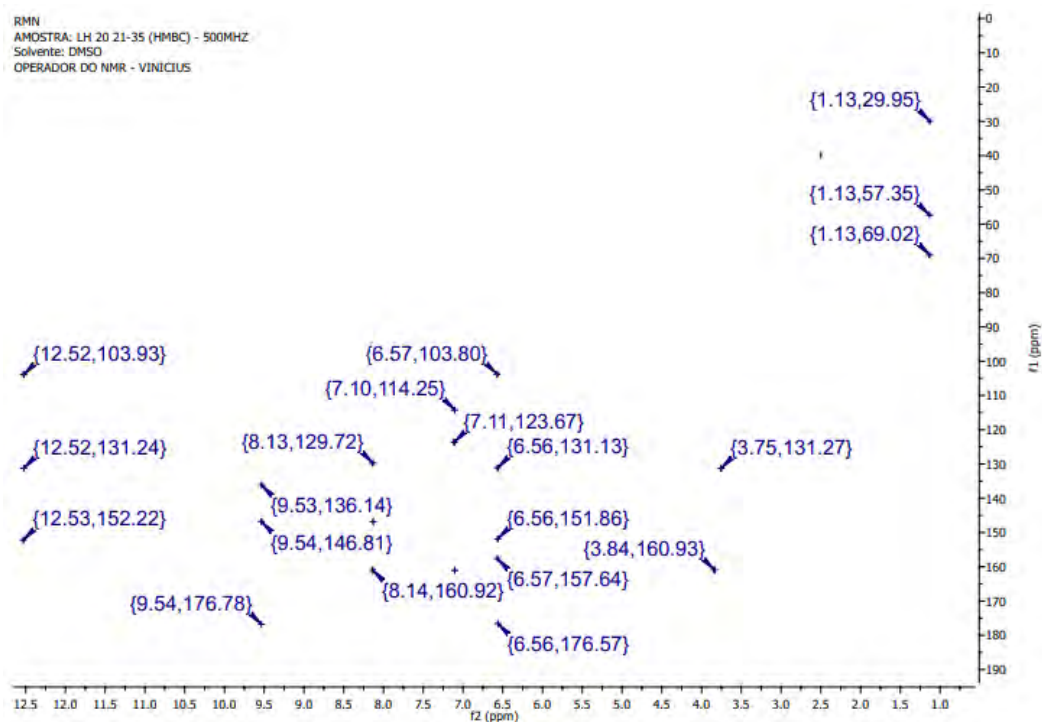


Figura A52. Espectro de HMBC do flavonoide betuletol

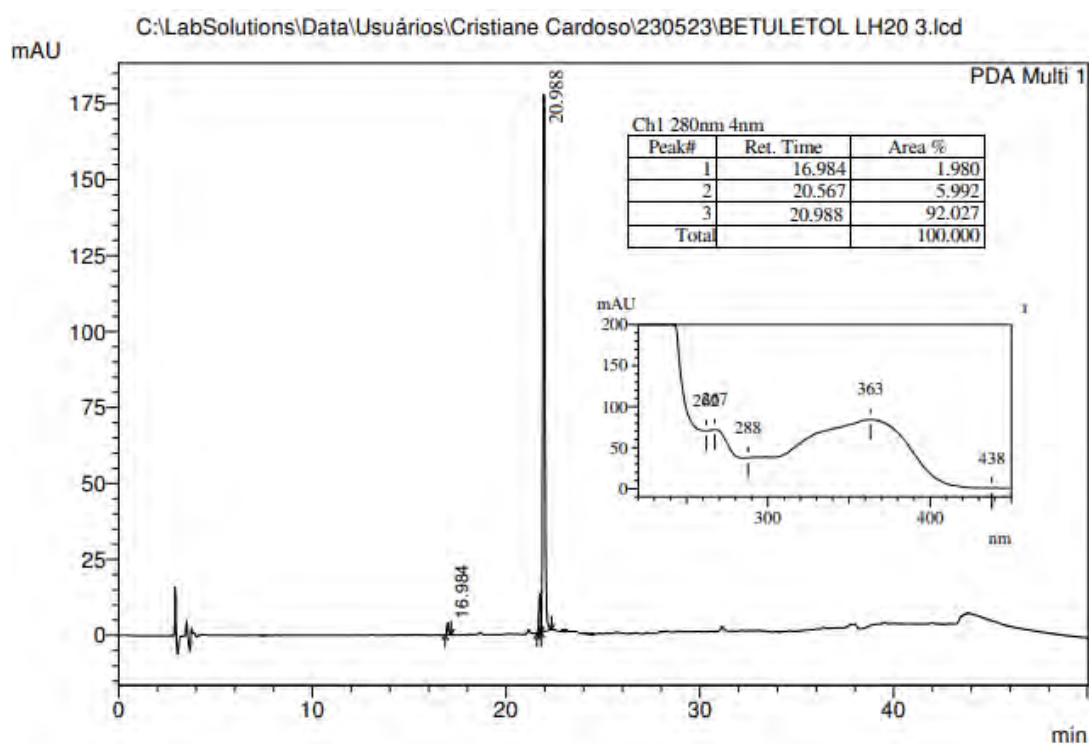


Figura A53. Perfil Cromatográfico por HPLC-PDA em fase reversa (280nm) do flavonóide betuletol

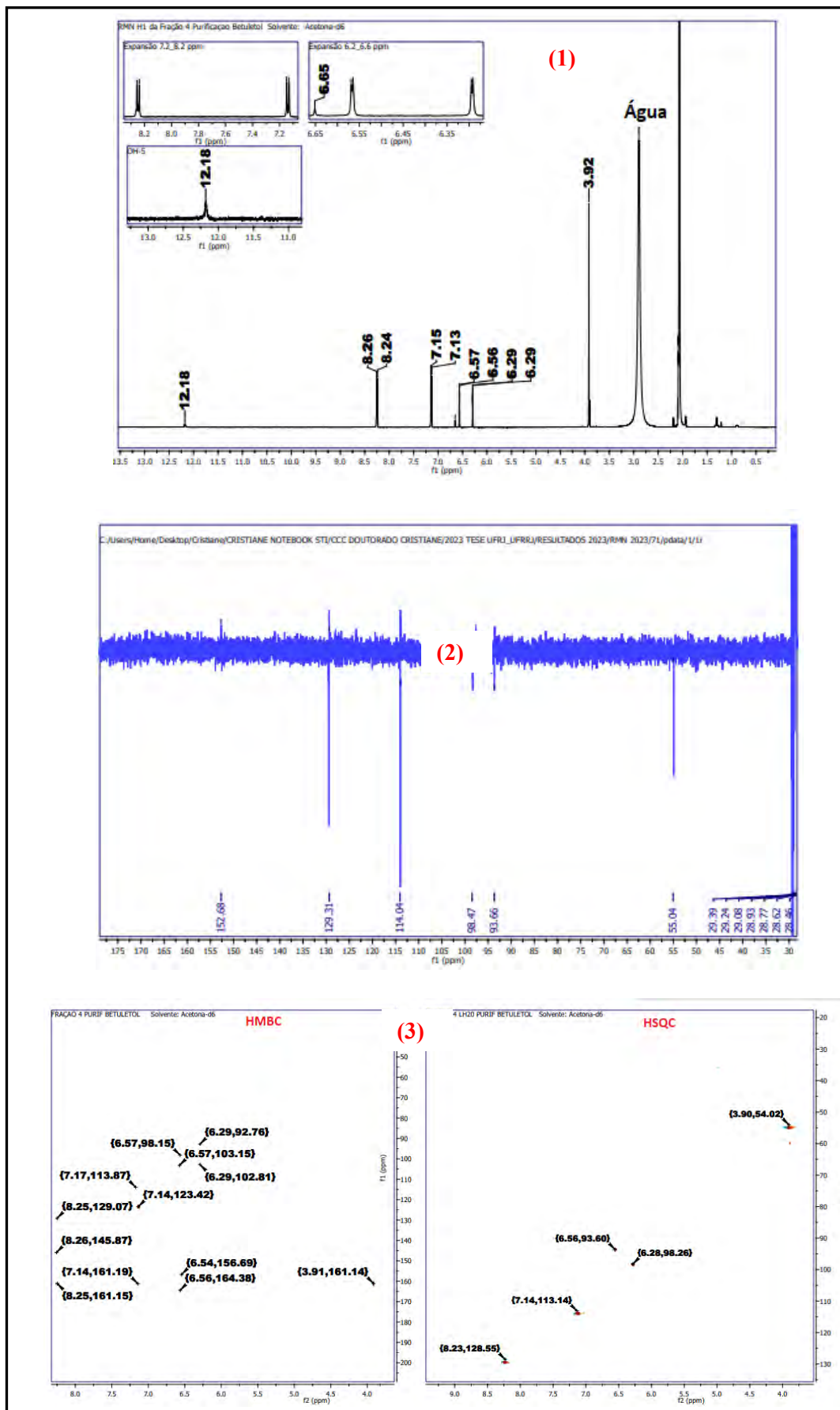


Figura A54. Espectro de RMN ¹H (1), DEPTQ (2) e HMBC/HSQC (3) da canferide

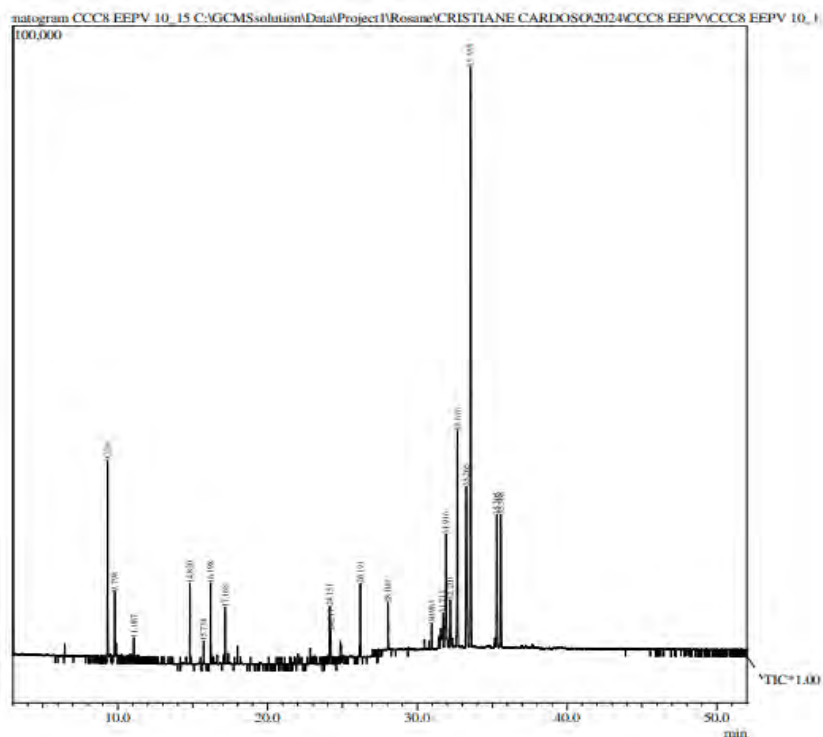


Figura A55. Perfil GC-MS da fração 10-15 (CCC2) obtido por impacto de elétrons

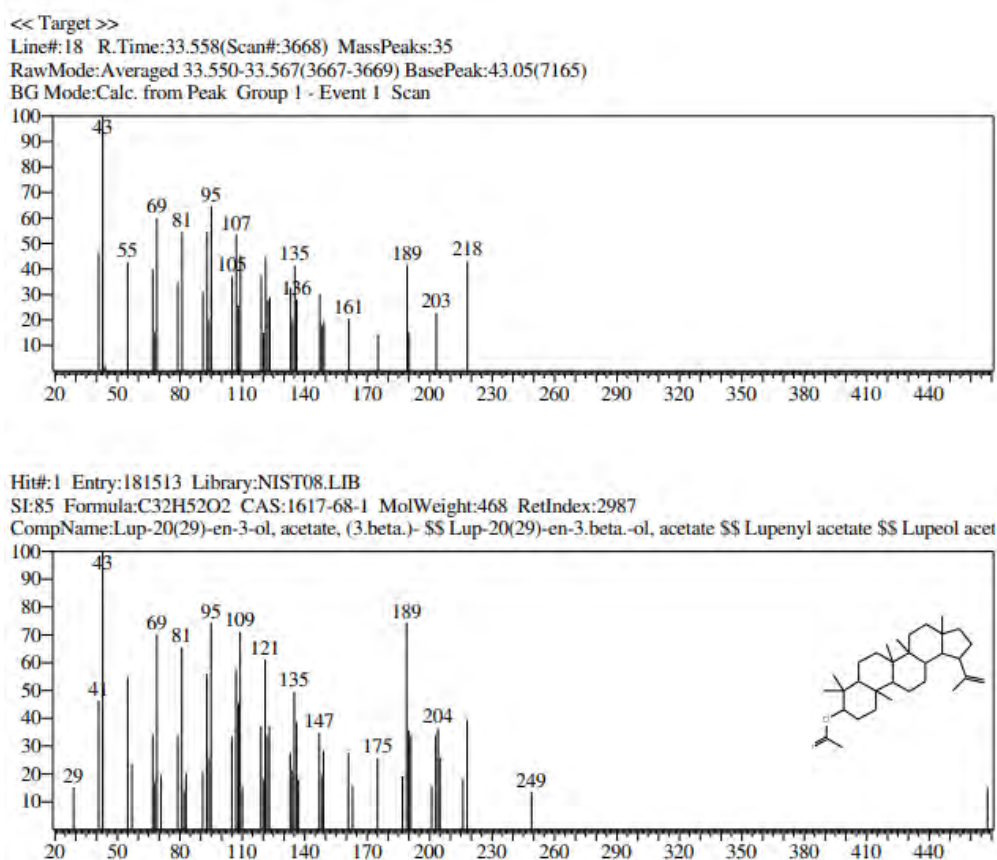


Figura A56. Perfil GC-MS obtido por impacto de elétrons e espectros de MS do íon majoritário da fração 10-15 (CCC2) no tempo de retenção revelando pela NIST08 o perfil de fragmentação do lupenil acetato

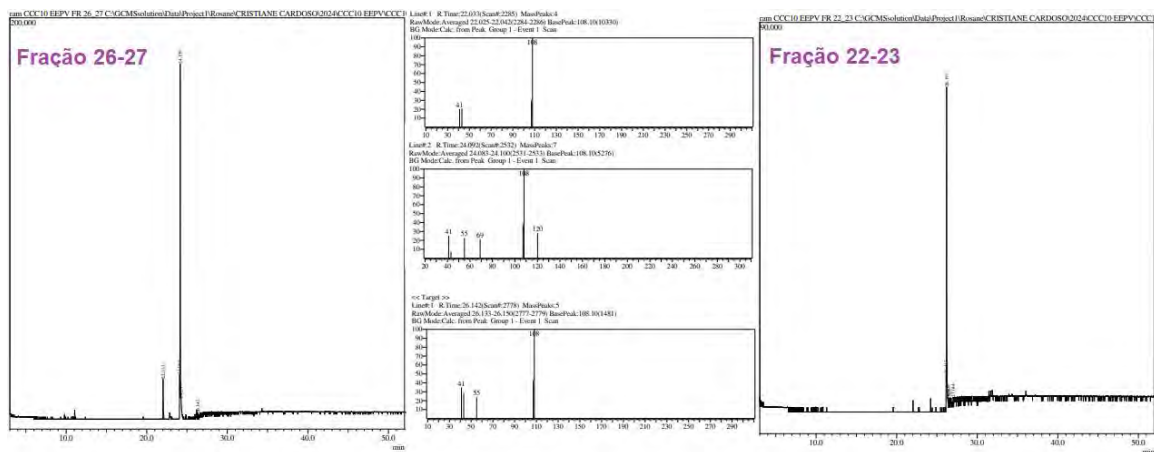


Figura A57. Perfil GC-MS da fração 26-27 e 22-23 (CCC2) obtido por impacto de elétrons e espectros de MS das frações com m/z 108.

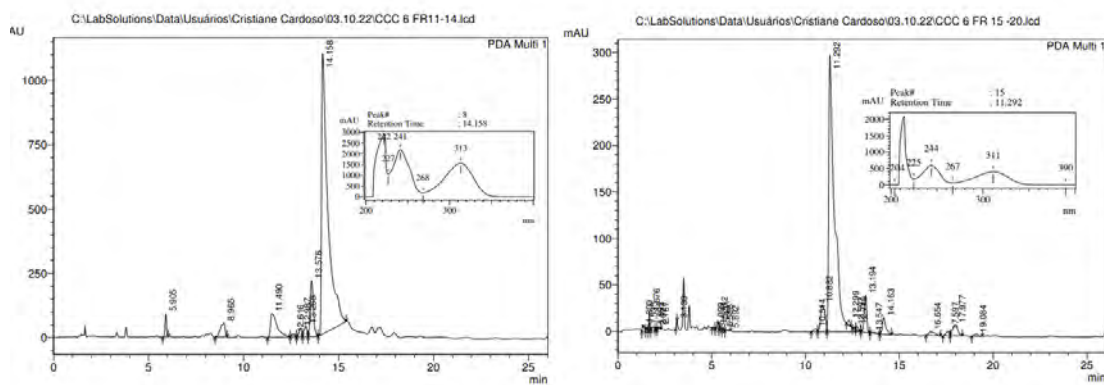


Figura A58 Perfil Cromatográfico por HPLC-PDA (280nm) em fase reversa dos ácidos anacárdico 17:1 (esquerda) e 19:1 (direita) das frações obtidas de CCC2 e purificação em CPG.

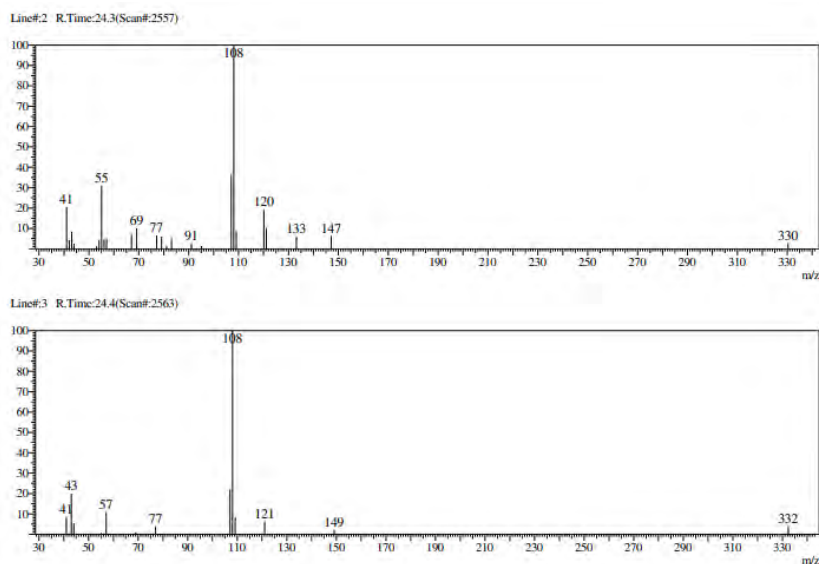
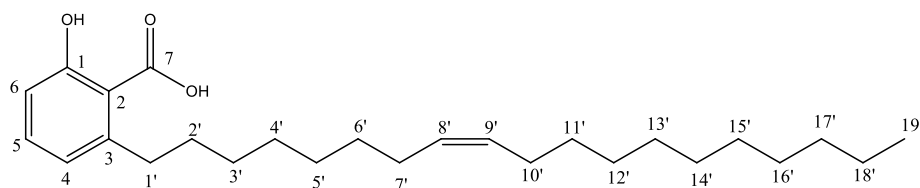


Figura A59. Perfil GC-MS dos ácidos anacárdicos purificados obtidos por impacto de elétrons e espectros de MS das frações com m/z 108.

Tabela A5. Dados de ressonância magnética nuclear (RMN) do ^1H e ^{13}C do ácido anacárdico 19:1 presente na fração I+J utilizando CDCl_3



I+J: ÁCIDO ANACÁRDICO 19:1 monoênica				
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
1	163.51	-		H-5
2	110.70	-		H-4; 2H-1'
3	147.57	-	2H-1'	H-5
7	175.12	-		
CH				
4	122.57	6.77 (d, 7.8)		
5	134.99	7.35 (t, 7.8)		
6	115.72	6.86 (d, 7.8)		
8'	130.03	5.37 (m)	2H-7'	2H-10'
9'	129.84		2H-10'	2H-7'
11'	-	-	-	-
12'	-	-	-	-
14'	-	-	-	-
15'	-	-	-	-
CH ₂		-		
1'	36.45	2.97 (m)		H-4
2'	32.05	1.59 (m)	2H-1'	
3'-6'	29.77- 29.03	1.34 – 1.27		
7'	27.20	2.04 (m)		
10'	27.16			
13'	-	-	-	-
16'	-	-	-	-
11'-13'	-	-	-	
11'-16"	29.77- 29.03	1.34 – 1.27		
14'-17'	-	-	-	-
14'	-	-	-	-
17'	31.92	1.34 – 1.27		
18'	22.68	1.34 – 1.27		
CH ₃				
15'	-	-	-	-
19'	14.11			

Comparado com Morais *et al.*, 2017

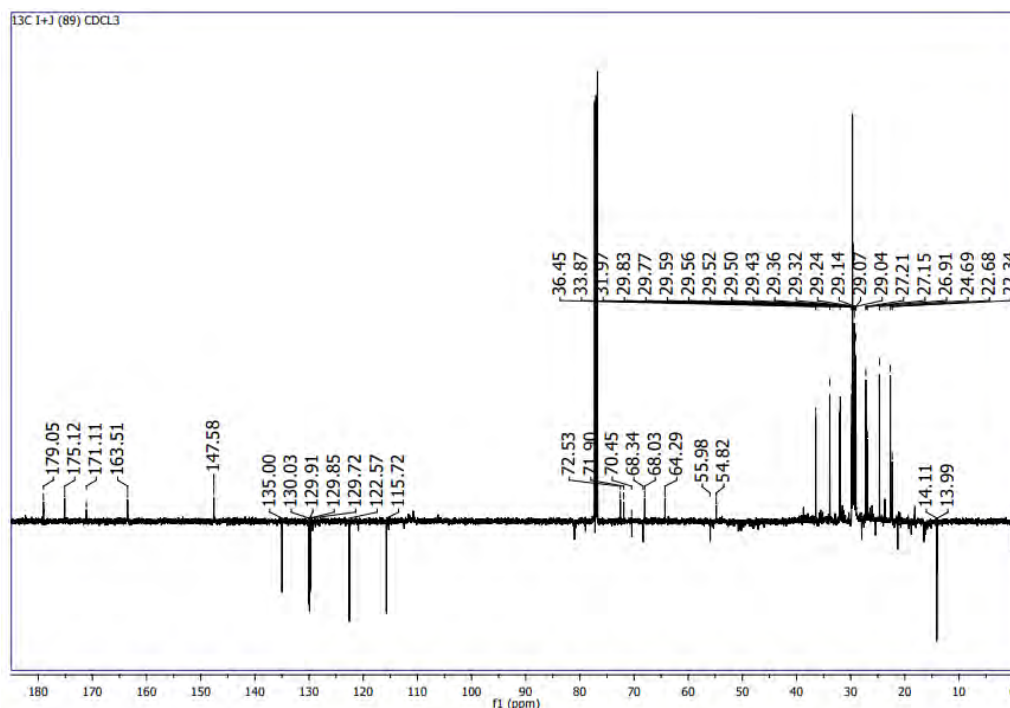


Figura A60. Espectro de RMN de ^{13}C do ácido anacárdico 19:1 obtido de CCC2 e purificação em CPG (CDCl₃, 500MHz)

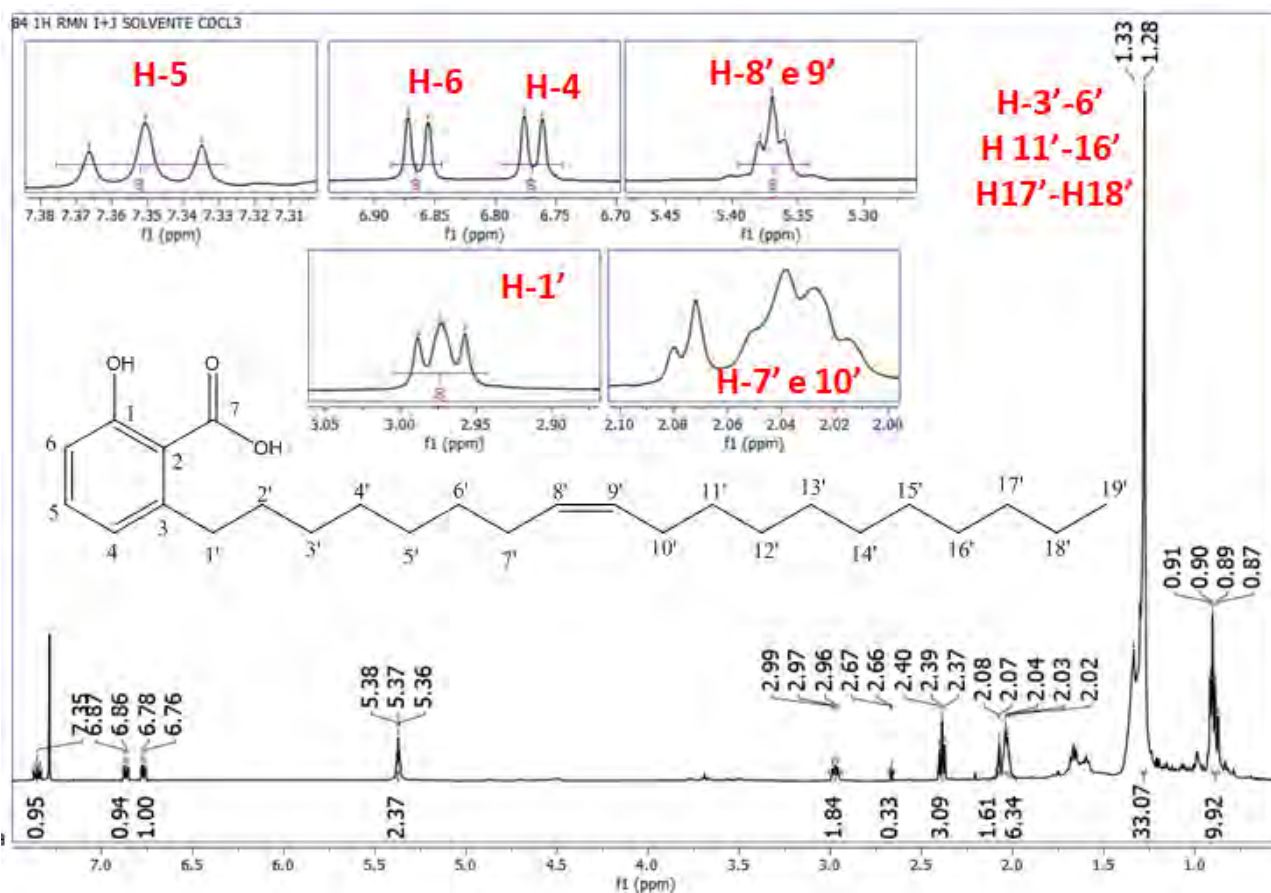


Figura A61. Espectro de RMN de ^1H do ácido anacárdico 19:1 obtido de CCC2 e purificação em CPG (CDCl₃, 500MHz)

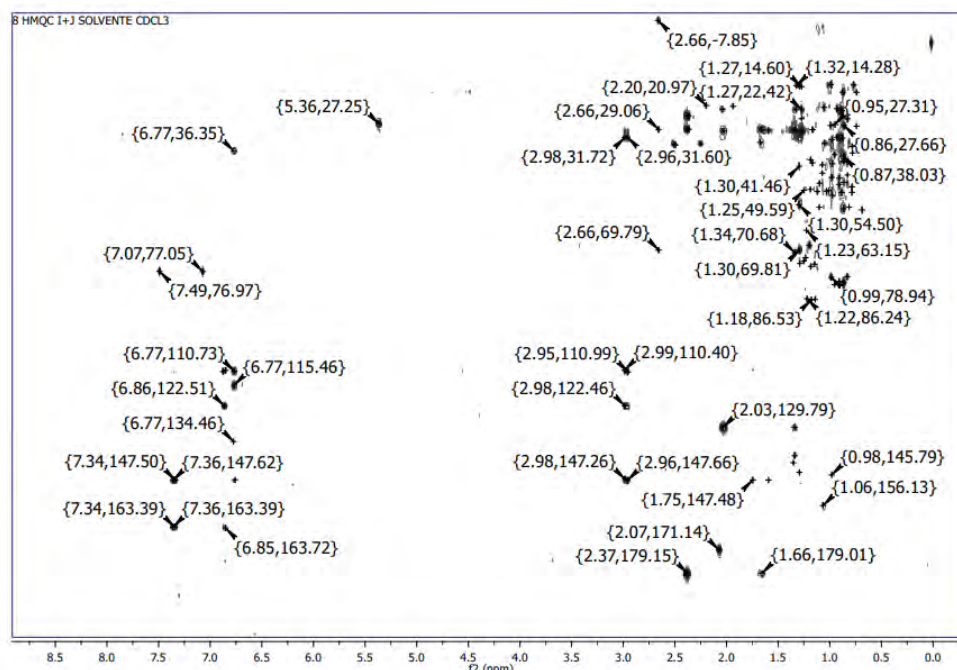


Figura A62. –Espectro de RMN de HMQC do ácidos anacárdico 19:1 obtido de CCC2 e purificação em CPG (CDCl_3 , 500MHz)

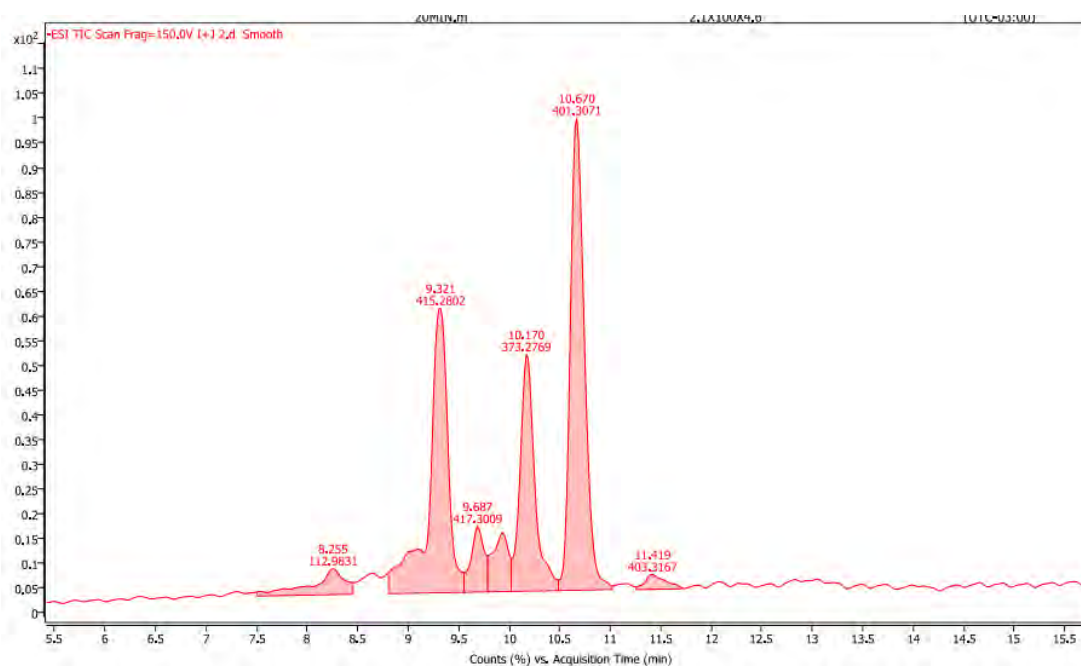


Figura A63. Análise por HPLC-ESI-MS (modo negativo). Íon molecular verificado em LC-ESI-MS do ácido anacárdico 402 g/mol ($[\text{M}-\text{H}]^-$ 401)

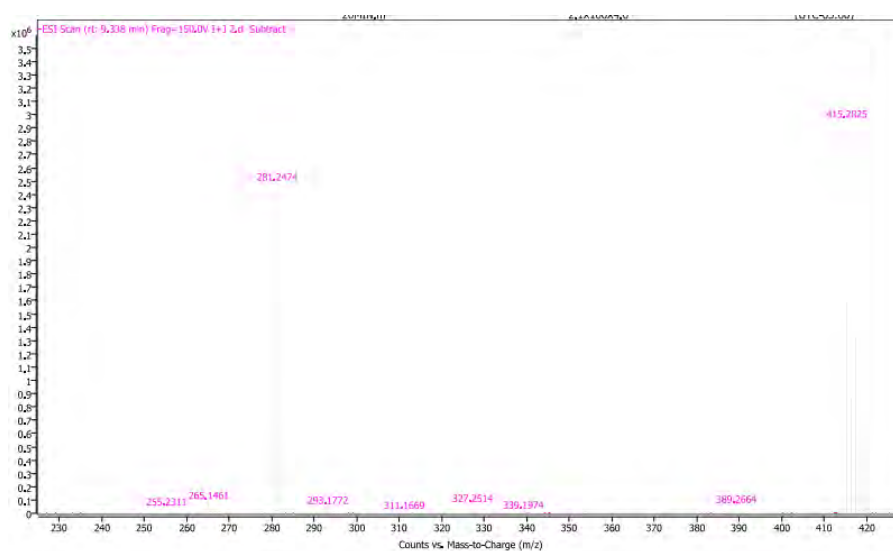


Figura A64. Análise por HPLC-ESI-MS (modo negativo). Espectro de massas do Íon molecular extraído 415.2825 verificado em LC-ESI-MS do ácido anacárdico 402 g/mol ($[M-H]^{-401}$)

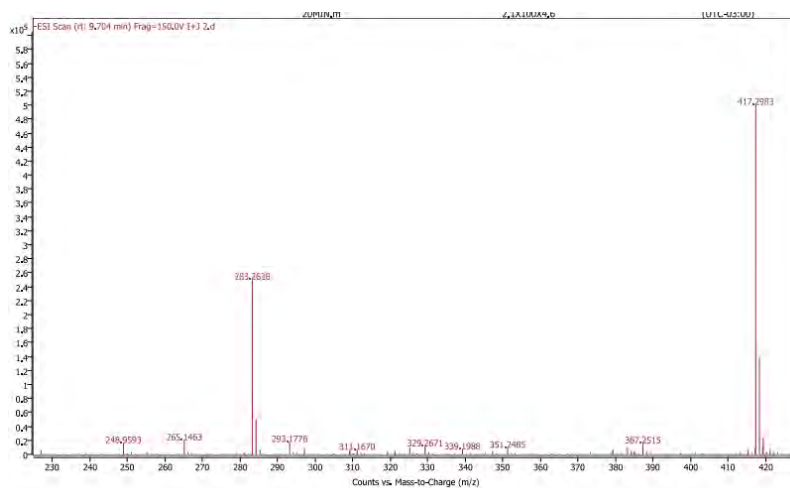


Figura A65. Análise por HPLC-ESI-MS (modo negativo). Espectro de massas do Íon molecular extraído 417.2983 verificado em LC-ESI-MS do ácido anacárdico 402 g/mol ($[M-H]^{-401}$)

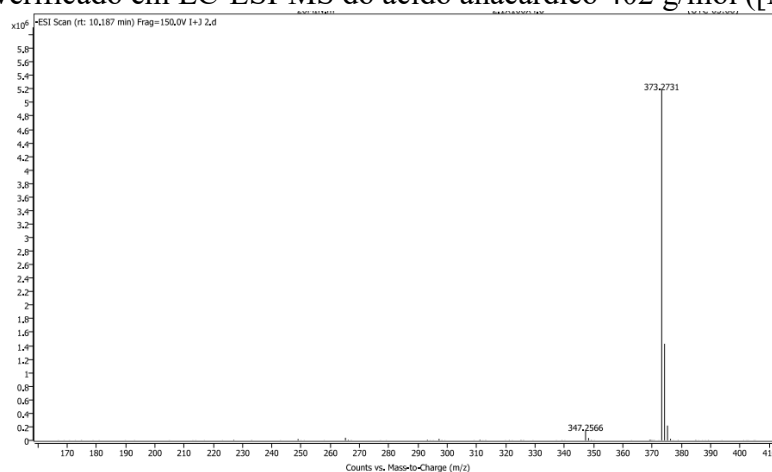


Figura A66. Análise por HPLC-ESI-MS (modo negativo). Espectro de massas do Íon molecular extraído 373.2731 verificado em LC-ESI-MS do ácido anacárdico 402 g/mol ($[M-H]^{-401}$)

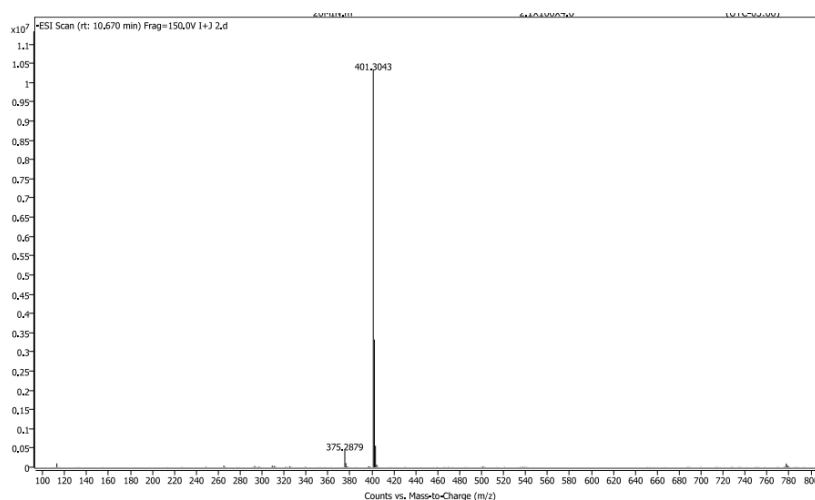


Figura A67. Análise por HPLC-ESI-MS (modo negativo). Espectro de massas do Íon molecular extraído 401.3043 verificado em LC-ESI-MS do ácido anacárdico 402 g/mol ($[M-H]^-$ 401)

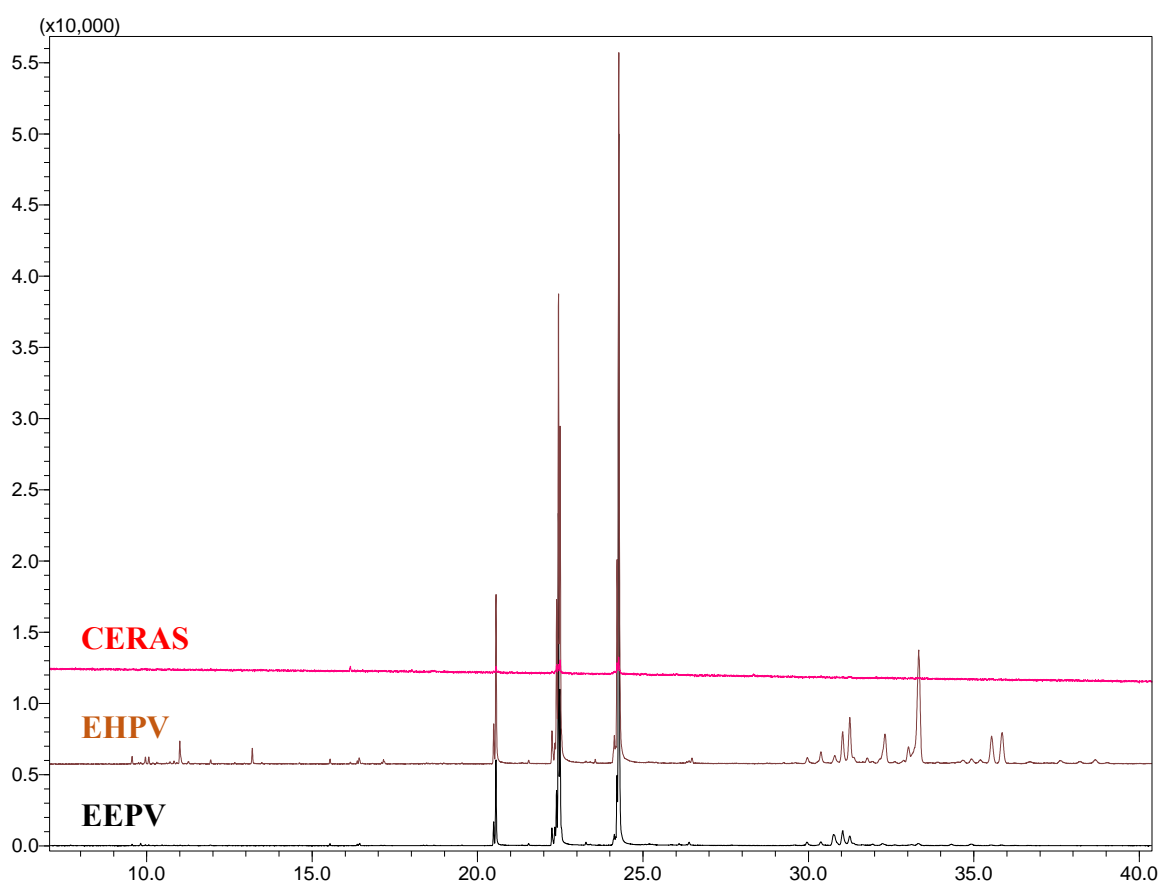


Figura A68. Perfil GC-MS obtido por impacto de elétrons no modo *syn* para o m/z 108