UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**"DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UMA FORMA FARMACÊUTICA DE
LIBERAÇÃO SUSTENTADA CONTENDO EXTRATO PADRONIZADO DE
PRÓPOLIS PARA O TRATAMENTO DE QUEIMADURAS"**

Andresa Aparecida Berretta

Ribeirão Preto

2003

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**"DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UMA FORMA FARMACÊUTICA DE
LIBERAÇÃO SUSTENTADA CONTENDO EXTRATO PADRONIZADO DE
PRÓPOLIS PARA O TRATAMENTO DE QUEIMADURAS"**

Andresa Aparecida Berretta

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas para a obtenção
do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas, Área de concentração:
Fármacos e Medicamentos.**

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Maldonado Marchetti

Ribeirão Preto

2003

FICHA CATALOGRÁFICA

Berretta, Andresa Aparecida

Desenvolvimento e avaliação de uma forma farmacêutica de liberação sustentada contendo extrato padronizado de própolis para o tratamento de queimaduras. Ribeirão Preto, 2003.

78 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Marchetti, Juliana Maldonato.

1. Liberação sustentada. 2. Própolis. 3. Queimadura.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, assim como todas as conquistas desta vida, ao meu querido **Marcos Roberto Mantelo**, que foi para mim muito mais do que um namorado, foi um exemplo de vida, de coragem e luta.

Sua bondade, transparência, humildade, alegria, e todos os nossos momentos, ficarão eternamente em minha memória como uma fonte de inspiração, principalmente nas horas de maior dificuldade, pois foi justamente nesse momento de sua vida, que sua força e grandeza de espírito mais me marcaram e se pronunciaram. Saber lidar com a dor e o medo sem passar preocupação e nem demonstrar aos que estão mais próximos, é um comportamento de espíritos muito nobres e elevados, que realmente não poderiam viver em um mundo de tanta crueldade.

Guardarei sempre comigo seus conselhos e ideais. E quanto aos nossos sonhos, eles se realizarão um dia, em qualquer tempo ou lugar, pois o Amor não tem pressa, tem toda a eternidade!

“Ainda que possuísse o dom das profecias e conhecesse todos os mistérios, que soubesse todas as ciências, ainda que eu afirmasse tamanha fé, que me tornasse capaz de remover montanhas, se eu não tivesse amor, nada seria”

1 Coríntios, cap. 13, 1-2

Dedico este trabalho a **Deus**, que jamais abandona seus filhos. Mesmo sem conseguir entendê-Lo em sua magnitude e bondade, entrego-me em Suas mãos para que seja feita a Sua vontade e não a minha, pois minha ignorância não me permite entender Seus designios.

Dedico ainda aos **pacientes** e às **equipes médica e de enfermagem**, de forma especial às que trabalham na oncologia, pois esta área da medicina é ainda uma área que apresenta grandes limitações em relação às demais. Percebi que não importa a idade, raça, sexo ou classe social, as coisas acontecem na vida das pessoas de forma que nem sempre podemos interferir ou mudar. A única variável que me pareceu comum a todos os pacientes oncológicos que tive a oportunidade de conhecer e acompanhar no Hospital das Clínicas, foi a bondade, carisma e aceitação. Desejo que Deus continue dando força e fé aos pacientes, paciência e zelo à equipe de enfermagem e muita inteligência e sabedoria aos médicos para serem capazes de optar pelo melhor tratamento para seus pacientes, que estão ali realmente pacientes e ansiosos pela vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e amiga, **Dra. Juliana M. Marchetti**, que aceitou prontamente o desafio deste trabalho e acreditou que poderíamos atingir nossos objetivos. Agradeço muito pela sua amizade, apoio e incentivo, pois sem dúvida, este trabalho se deu em um dos momentos mais difíceis da minha vida. Obrigada por ter confiado na minha capacidade profissional e ter contribuído pelo meu crescimento científico.

Aos meus pais: **José Roberto, Eva Lúcia, Antônio e Maria Inácia**, e irmãos: **Andréia e Marcos César**, pelo apoio, carinho e amor incondicional. Mesmo distantes fisicamente, vocês me acompanham, ajudam e orientam de forma excepcional. Obrigada por tudo. As palavras não seriam suficientes para dizer o quanto vocês significam para mim. AMO VOCÊS!

Ao **Sr. Antônio Carlos Meda** e **Sr. Manoel Eduardo T. Ferreira**, que ao meu ver são pessoas que conhecem muito sobre própolis no Brasil e têm muito a contribuir com a pesquisa científica. Obrigada pela oportunidade de crescimento e estudo, pelo apoio, amizade e confiança em todos os momentos, considero-os como verdadeiros *pais*.

A toda a equipe da **Apis Flora**, que sempre contribuiu de forma muito intensa para a realização deste trabalho, de modo especial à farmacêutica e grande amiga, **Edna Barizon** e à grande amiga e companheira **Daniela Cremonez**, à equipe do laboratório: **Alexandre Oliveira, Flávio Ferreira, Israel Leandro, Marcos e Leandro Ricordi**, aos amigos **Ubiratan Molina**, pelas lições de vida, ao **João Tavares, Cristiane Ronconi, Luís Cláudio, Agostinho, Lucas e D. Celina** pela sincera amizade e carinho. Agradeço também a empresa, na pessoa da **D. Marley Ferreira**, pelo apoio financeiro destinado à viabilidade deste projeto. Obrigada pela confiança neste trabalho.

A todos os meus **professores** que cuidaram da minha formação intelectual desde o pré-primário, pois sem a formação básica não conseguiria ter chegado aonde cheguei.

À Profa. Dra. **Lusiane M. Bendhack** pela orientação na Iniciação Científica, pela intensa contribuição na minha formação acadêmica e na minha vida. Obrigada pela amizade e confiança na minha capacidade.

À Prof. Dra. **Elza Helena Guimarães Lara** por ter me concedido a oportunidade de começar minha vida científica em seu laboratório e ter trabalhado com funcionários tão especiais, como o Mário, José Orestes e Roger.

Ao Prof. Dr. **Jairo Kenupp Bastos**, ao mestrando **Luiz Elídio Gregório** e ao **Waltinho**, pela grande contribuição e ajuda.

À Profa. Dra. **Maria Cristina Marcucci**, pela intensa colaboração para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. **Rosário Bretas** e o doutorando **Marcelo Farah**, da Faculdade de Engenharia de Materiais, UFSCAR, pelo empréstimo do reômetro e valiosa contribuição para nosso trabalho.

À Profa. Dra. **Maria Vitória L. B. Bentley** e todos os colegas de laboratório, que sempre estiveram dispostos a ajudar.

Aos **funcionários da Seção de Pós-graduação** que sempre estiveram foram muito atenciosos, pacientes e gentis comigo.

Aos meus **grandes amigos da 69ª Turma de Farmácia**, que fazem parte da minha vida de forma tão especial. Vocês não são somente amigos, são verdadeiros irmãos. Jamais me esquecerei da presença na minha vida. Os amigos são verdadeiras Bênçãos de Deus. Nos momentos em que me questionava porque tinha acontecido comigo uma perda tão grande vinha imediatamente a resposta: porque Deus me concedeu a graça de tantos amigos para me segurar e ajudar a suportar tamanha dor. Obrigada por tudo! Se hoje sou novamente feliz, é, em grande parte, graças à convivência com vocês.

Ao Ms. **Alexandre Henrique Leonel**, pelo exemplo de dedicação profissional e ética. Obrigada pelo companheirismo e ajuda nos momentos tão difíceis. Você é uma pessoa que consegue nos levantar e nos deixar felizes com algumas poucas palavras de lição de vida. Sem dúvida sua participação na minha vida é muito importante.

Autor: Andresa Aparecida Berretta

Título: "Desenvolvimento e avaliação de uma forma farmacêutica de liberação sustentada contendo extrato padronizado de própolis para o tratamento de queimaduras"

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a) Juliana M. Marchetti
Orientador(a)

Trabalho defendido e aprovado pela Comissão Julgadora em
____/____/2003

SUMÁRIO

Resumo	X
Summary	XII
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	01
1.1. Generalidades.....	01
1.2 Copolímero não-iônico.....	04
1.3 Própolis.....	08
1.3.1 Histórico e definições.....	08
1.3.2 Composição química e atividades biológicas.....	09
1.3.3 Extrato Padronizado de Própolis.....	18
1.3.4 Usos Dermatológicos.....	19
1.3.5 Propriedades Cicatrizantes e Antiinflamatórias.....	21
1.3.6 Propriedade Anestésica Local.....	23
1.3.7 Atividade Antimicrobiana.....	24
1.4 Queimaduras.....	26
2. OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivos Gerais.....	31
2.2 Objetivos Específicos.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 Material.....	32
3.2 Método.....	34
3.2.1 Caracterização Físico-química da matéria.....	34
3.2.2 Identificação e Quantificação do DPB através de CLAE.....	36
3.2.3 Avaliação Microbiológica.....	37
3.2.4 Preparação do Extrato Glicólico de Própolis.....	38
3.2.5 Desenvolvimento da Formulação.....	39

3.2.6 Avaliação da Estabilidade.....	40
3.2.7 Estudo do perfil de liberação <i>in vitro</i>	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1 Estudo da Própolis.....	46
4.2 Estudo de estabilidade físico-química das formulações.....	52
4.2.1 pH.....	52
4.2.2 Teor de Própolis nas formulações.....	53
4.2.3 Estudo do Comportamento Reológico.....	54
4.3 Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i>	60
4.4 Avaliação Microbiológica.....	64
5. CONCLUSÕES	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

Resumo

Nos últimos anos houve um crescente interesse no desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação sustentada e liberação controlada para uso oral, tópico e parenteral. Tensoativos não-iônicos são vastamente empregados como solubilizantes, emulsificantes, estabilizantes, umectantes e como sistemas de liberação em cosméticos e medicamentos. O copolímero não-iônico em bloco composto por polioxietileno-polioxipropileno foi empregado neste trabalho por apresentar rearranjo micelar em solução aquosa e produzir mudança na viscosidade em função da alteração da temperatura, sendo que este pode ser aquecido e esfriado sem prejuízo das suas propriedades. Tal forma farmacêutica termorreversível foi desenvolvida e avaliada. Pacientes queimados são particularmente susceptíveis à colonização bacteriana e infecção em função da ruptura física da pele normal e redução da imunidade celular. Assim, a fim de se obter uma proteção do sistema fisiológico exposto, alguns autores recomendam o uso de uma "pele artificial" nos pacientes queimados, protegendo desta forma frente aos agressores do meio externo. Atualmente, observamos um crescente interesse em produtos naturais de aplicação tópica. Muitos tipos de inflamações de pele, queimaduras e ferimentos estão sendo tratados com extrato de própolis. A própolis, uma resina coletada pelas abelhas de muitas fontes vegetais, teve as seguintes propriedades biológicas comprovadas: antioxidante, antiinflamatória, antibiótica, antifúngica, anticancer, dentre outras. O desenvolvimento de um sistema de liberação de fármacos para uso tópico se justifica nas queimaduras, uma vez que a aplicação e reaplicação de produtos constituem um processo doloroso. Neste trabalho foi desenvolvido e caracterizado este tipo de forma farmacêutica contendo própolis. Demonstrou-se que a substância marcadora da própolis neste trabalho, DPB (2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2H-1-benzopirano), se mostrou estável nas preparações

estudadas ($\pm 10\%$), sendo que as propriedades de termorreversibilidade dos géis foram mantidas. A caracterização reológica das amostras mostrou que elas apresentam comportamento viscoelástico com temperatura de geleificação para o Gel 02 e Gel 03 de, respectivamente, 10°C e 6°C . Os controles e o Gel 01 não apresentaram temperatura de geleificação nas condições estudadas. Os estudos de liberação *in vitro* demonstraram que as amostras apresentam cinética de ordem zero. Os resultados encontrados possibilitam os estudos de fase pré-clínica e dependendo dos resultados, também a fase clínica.

Summary

In recent years there has been increasing interest in the development of prolonged-action and controlled release drug delivery systems for oral, topical, and parenteral use. Non-ionic surfactants are widely used in cosmetics and pharmaceuticals as solubilizers, emulsifiers, stabilizers, wetting agents and as delivery systems. One non-ionic polyoxyethylene-polyoxypropylene block copolymer was used in this work because its micellar rearrangement in aqueous solution will produce a change in viscosity with change in temperature and it can be cooled and warmed many times without changing its properties. This pharmaceutical preparation was developed and studied. Burn patients, are particularly susceptible to bacterial colonization and infection due to the physical disruption of the normal skin barrier and the reduction in cell-mediated immunity. In order to solve the exposition of physiologic system, some authors recommend an "artificial skin" to protect the burn patients organism of external invasors. Actually, we observed an increasing interest in natural products for topical application. Many kinds of some skin inflammatory diseases such as: burns and wounds, are being treated with propolis extract. Propolis is a resinous hive product collected by honeybees from various plant sources and also it has been reported to possess various biological activities, such as antioxidant, antiinflammatory, antibiotic, antifungal and anticancer. The development of a drug delivery systems to topical use is justified in several burns, since the application and reapplication of product is a dolorous process. In our work we developed and characterized these kind of pharmaceutical form. We demonstrated that the substance DPB (2,2-dimethyl-6-carboxy-2H-1-benzopyran-8-yl-2H-1-benzopyran-8-yl), was stable in the studied preparations ($\pm 10\%$) and the thermoreversible properties were maintained. The rheological characterization of samples showed that they are viscoelastic fluids with temperature of

gelation to GEL 02 and GEL 03, respectively, 10°C and 6°C. The controls and GEL 01 did not show temperature of gelation in the studied conditions. *In vitro* drug release experiments demonstrated that samples maintain a zero-order delivery. The found results encourage the undertaking of new experiments with the formulations in pre-clinical phase and depending on the obtained results, the clinical phase could also be undertaken.

1. Introdução e Revisão da Literatura

1.1 Generalidades

Por muitas décadas o tratamento de afecções e/ou lesões da pele, agudas ou crônicas, vêm sendo realizado por meio de formas farmacêuticas convencionais como as pomadas, os cremes, as loções, os géis e as soluções tópicas. Estas formas correspondem aos produtos farmacêuticos mais prescritos e são conhecidos por promover liberação imediata do fármaco veiculado, além de seus efeitos físicos como protetores, cicatrizantes, umectantes e emolientes. Dessa forma, para manter o fármaco na concentração terapêutica torna-se necessário a administração reiterada. (CHIEN, 1992; ANSEL, 2000).

Assim, sistemas capazes de modificar a liberação do fármaco proporcionando a liberação em quantidades adequadas e em um determinado sítio estão sendo estudados, visto que possuem vantagens sobre os sistemas convencionais tais como a manutenção de níveis terapêuticos ótimos com mínimo de flutuações, a redução dos efeitos colaterais, a diminuição da frequência de dosagem e o direcionamento do fármaco para sítios de ação específicos (MADAN, 1985).

MADAN (1985) define os sistemas de liberação sustentada como formas farmacêuticas que liberam rapidamente uma fração da dose total levando a uma resposta terapêutica rápida, e posteriormente mantém esta resposta por um período de tempo prolongado.

Um sistema polimérico promissor pode ser formulado a partir de polímeros hidrofílicos compostos por poli(oxietileno)-poli(oxipropileno)-poli(oxietileno), inertes e atóxicos e capazes de originar soluções coloidais tipo gel, termorreversíveis na presença de água e que pode afetar o comportamento da solução e a difusão das

moléculas da substância ativa (PAAVOLA, et al, 1995; SCHMOLKA, 1972). A baixa toxicidade e irritação cutânea causadas por estes polímeros levaram a avaliação do potencial de aplicação dermatológica destes géis, particularmente no tratamento de queimaduras (NALBANDIAN, et al, 1987), face as vantagens com relação à facilidade de aplicação e de remoção da preparação e também com relação a manutenção da concentração terapêutica no local da aplicação.

A geleificação *in situ* é uma característica intrínseca de alguns polímeros, incluindo o Poloxamer 407® , sendo que eles sofrem uma transformação do estado líquido para um estado sólido, fenômeno denominado de transformação sol-gel. Essa transformação se deve a um aumento da viscosidade da solução e pode ocorrer por alterações do pH, da temperatura, da concentração de solventes ou de íons, levando à formação de uma matriz polimérica de liberação sustentada (HAGUIND et al, 1996).

Infecções e septicemia ainda são os maiores riscos nas queimaduras severas. O exsudato seroso presente entre a escara e o tecido de granulação no sítio queimado é um excelente meio de cultura, especialmente para as espécies de *Proteus* e *Pseudomonas* (NALBANDIAN et al. 1987). Constatou-se que infecções fatais são freqüentemente causadas por microrganismos oportunistas gram-negativos altamente virulentos como a *Pseudomonas aeruginosa* e gram-positivos como *Staphylococcus aureus* (DEMLING, 1985).

De acordo com NALBANDIAN, et al (1987), uma cobertura imediata após a queimadura pode atuar prevenindo a perda de água, a perda calórica e de eletrólitos, servindo ainda como uma camada bactericida/bacteriostática constituindo uma barreira para a infecção. As propriedades requeridas para uma cobertura imediata utilizável clinicamente devem incluir a hidratação do ferimento, a prevenção da contaminação microbiana (NALBANDIAN et al. 1987) e ainda permitir a passagem de oxigênio para que possa ser desencadeada a repitelização (DEMLING, 1985).

Os produtos de origem natural têm sido amplamente pesquisados nos últimos anos, não somente a planta medicinal propriamente dita, mas também os produtos originários dos exsudatos vegetais, como é o caso da própolis.

A própolis, um produto elaborado pelas abelhas *Apis mellifera* a partir dos exsudatos vegetais, apresenta uma série de propriedades terapêuticas. Alguns estudos realizados, demonstraram sua atividade anti-séptica, cicatrizante, anestésica e antiinflamatória em lesões provocadas por queimaduras (MURESAN, et al, 1978; TSAKOFF, 1978; AZEVEDO, et al, 1986; DOBROWOLSKI, 1991; GHISALBERTI, 1979; GREGORY, et al, 2002; KOO, et al, 2002; KUJUMGIEV, et al, 1999).

1.2. COPOLÍMEROS NÃO-IÔNICOS

Um dos polímeros promissores utilizados para formação de matriz polimérica de liberação sustentada é o Poloxamer 407®, um copolímero não-iônico constituído de cadeias de polioxietileno e polioxipropileno. Possui 70% de óxido de etileno e 30% de óxido de propileno e massa molecular correspondente à 12500 Daltons. A sua fórmula molecular é $[\text{HO}(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_{106}\text{-(CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-O)}_{70}\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{106}\text{H}]$ podendo ser classificado quimicamente como um poliéter-álcool. O polímero possui caráter anfifílico, uma vez que possui uma cadeia de poli-óxido de propileno com caráter hidrofóbico e duas cadeias de poli-óxido de etileno com caráter hidrofílico. É um sólido branco com ponto de fusão correspondente a 56°C, solúvel em água e capaz de formar um gel firme na concentração de 20% p/p a 25 °C (SCHMOLKA, 1972).

As soluções concentradas do copolímero apresentam geleificação termorreversível por ação da temperatura. Em solução aquosa a 20% p/p e com o aumento da temperatura, o copolímero agrega-se em micelas para minimizar a energia livre da solução e muitos estudos têm sido realizados na tentativa de elucidar esse processo de formação de micelas. Em temperaturas baixas (5°C) o polímero existe como um unímero livre em solução aquosa e com o aumento da temperatura estabelece-se um equilíbrio entre unímeros e micelas. Em temperaturas mais altas, como a temperatura corporal (37°C) formam-se agregados de micelas aumentando a viscosidade, que passa de uma solução para um gel firme. As micelas apresentam uma estrutura esférica, onde a cadeia central de óxido de polipropileno (OPP) localiza-se no interior da micela, devido ao seu caráter hidrofóbico, e as duas cadeias laterais de óxido de polietileno (OPE) localizam-se no exterior da micela devido ao seu caráter hidrofílico (CABANA et al, 1997).

Estudos do comportamento reológico e de calorimetria diferencial de varredura demonstraram que forças intermoleculares como as pontes de hidrogênio estabelecidas entre o polímero e a água não dirigem o processo de geleificação. A viscosidade do gel depende da temperatura e da concentração do polímero em solução (CABANA et al, 1997).

Modelos matemáticos mostram que a degradação ou dissolução do gel modula a liberação do fármaco nele incorporado. Assim, quanto menor é a dissolução do gel, menor será a liberação do fármaco. Aumentando-se a concentração do fármaco aumenta-se também a difusão deste através do gel (MOORE, et al, 2000).

EDSMAN et al (1998) avaliaram as propriedades reológicas dos géis de copolímero não iônico determinando a temperatura de geleificação. O aumento da concentração do polímero resulta em aumento da firmeza e da elasticidade do gel e na diminuição da temperatura de geleificação. O processo de geleificação é resultado da formação e da agregação de micelas que provoca mudança de estado físico de solução para um gel firme. O processo de agregação aumenta a interação entre as micelas tornando difícil a separação umas das outras e conferindo firmeza ao gel, que apresenta uma dissolução lenta em água. Os géis desse polímero são de natureza micelar e, assim, tanto fármacos hidrofílicos quanto hidrofóbicos podem ser facilmente incorporados. Na teoria, os fármacos hidrofílicos localizam-se na fase externa das micelas e os hidrofóbicos sofrem partilha entre o meio externo e interno das micelas. Estudos de liberação de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos a partir dos géis foram realizados e concluiu-se que a polaridade e a massa molecular dos fármacos não influenciaram a velocidade de liberação dos mesmos (MOORE et al, 2000). A localização dos fármacos na fase interna ou externa das micelas não interfere na liberação. O mecanismo de liberação obedece a uma cinética de pseudo ordem zero, dependendo apenas da dissolução do gel no meio receptor utilizado no teste de

liberação. O aumento da concentração do polímero no gel e a incorporação de aditivos como sais inorgânicos e tampão podem alterar a dissolução do gel e a velocidade de liberação do fármaco.

Os estudos do perfil de liberação realizados para este tipo de sistema revelaram que a liberação do fármaco em meio aquoso e não aquoso seguem o modelo proposto por HIGUCHI, 1962. Estes estudos também mostraram que o aumento da concentração do polímero diminuiu o coeficiente de difusão do fármaco no gel, o que já era esperado devido ao aumento da viscosidade. Entretanto, embora a viscosidade do gel aumente com o aumento da temperatura, a taxa de liberação do fármaco também aumenta com o aumento da temperatura. Este fato tem levado os autores a propor que a liberação do fármaco é controlada mais pela microviscosidade do gel do que pela viscosidade geral da matriz (MOORE et al, 2000).

Os estudos realizados por PANDIT e WANG, 1998, mostraram que a adição de sais às soluções de copolímero não-iônico pode alterar a formação do gel, além de modificar a temperatura de transição líquido-gel. Estudos do comportamento reológico do polímero à 5°C mostraram que a adição de 1% de NaCl à solução polimérica 25% p/v teve um pequeno efeito enquanto que a adição de 5% de NaCl aumentou drasticamente a viscosidade da solução. Como consequência retardou-se ainda mais a liberação de fármacos com a adição de aditivos iônicos na solução de gel. Como causa para este efeito atribuiu-se o aumento da microviscosidade dos canais aquosos do gel.

Os fármacos que são administrados na forma de sal (moléculas carregadas) não são encontrados no interior hidrofóbico das micelas formadas na solução de gel de Poloxamer 407®, levando a acreditar que estes estejam localizados predominantemente na região aquosa, próximo às cadeias de polioxietileno. Portanto, uma mudança na difusão destes fármacos, como a do propranolol, por exemplo, reflete uma mudança

esperada na microviscosidade da região ao redor das micelas, embora as propriedades das micelas também sejam alteradas com a adição de sal (RICCI et al, 2002).

Os membros do grupo de polímeros denominados Poloxamer, em especial o 407, são inertes e não causam lise das membranas celulares. Esse polímero não causa ruptura na membrana de hemácias, hepatócitos e linfócitos em *in vitro*, em cultura de células, e em *in vivo* quando injetados em organismos (JOHNSTON & MILLER, 1985).

LI et al (1996), efetuaram estudos farmacocinéticos do polímero em ratos, após administração de 300 mg do polímero por injeção intraperitoneal. Eles determinaram o tempo de meia-vida, que foi de 21 horas e o "clearance" renal que foi de 0,0024 L.h-1Kg-1 e quantificaram o polímero acumulado nos rins e fígado. A eliminação ocorre por reabsorção do polímero do local de administração para o plasma e posterior excreção renal por filtração glomerular.

O polímero apresenta a capacidade de estabilizar proteínas e enzimas nas formulações farmacêuticas (PEC et al, 1992), visto não desnaturar a urease e a interleucina-2 quando incubadas com o polímero em água à temperatura de 37°C (JOHNSTON et al, 1992).

Muitos estudos demonstram que o copolímero não-iônico tem sido utilizado como um sistema de liberação sustentada para veicular fármacos de diversas classes terapêuticas tais como: midriáticos (DESAI e BIANCHARD, 1998), antiinflamatórios (PAAVOLA et al, 1998a e 1998b), anestésicos (PAAVOLA et al, 1995, 1998a, 1998b e 2000; SCHERLUND et al., 1998 e 2000; RICCI et al, 2002), analgésicos e anti-piréticos (TAYEL & OSMAN, 1995; SHIN et al., 2000), contraceptivos e antiinflamatórios esteroidais (SAFWAT et al, 1994), antiinflamatórios não esteroidais (KIN et al, 2000), antibióticos (VEYRIES et al, 1999) e peptídeos e enzimas (FULTS & JOHNSTON, 1990; WANG & JOHNSTONS, 1993 ; BARICHELLO et al, 1999a e 1999b ; TOBÍO et al, 1999).

1.3 Própolis

1.3.1 Histórico e definições

A própolis tem sido usada desde tempos remotos na medicina tradicional em diversas partes do mundo. Muitos países estão interessados na utilização de produtos naturais para a cura das doenças e a própolis tem sido proposta com diversas finalidades terapêuticas. Tem sido muito pesquisada nos países europeus e também em outros da América, como Cuba e Brasil.

A própolis tem sido usada para obtenção de produtos farmacêuticos e cosméticos como as loções anti-acne, cremes faciais, pomadas para ferimentos e queimaduras, loções e soluções para as mais diversas aplicações, considerando principalmente a sua atividade antimicrobiana, antiinflamatória e cicatrizante (GHISALBERTI, 1979).

A própolis (*pró*: em prol de, em defesa + *polis*: cidade), é uma substância resinosa natural coletada de partes das plantas, brotos e exsudatos vegetais, e transformada pelas abelhas, sendo utilizada para a proteção da colméia. Assim, percebeu-se que os insetos e microrganismos eram imobilizados pela própolis mantendo-se o meio ambiente da colméia asséptico (BANKOVA et al, 2000). A "cola das abelhas", como também é conhecida a própolis, possui odor aromático característico e coloração variada, em função da fonte e da idade. Os componentes identificados na resina de própolis originam-se de três fontes: exsudatos coletados de plantas, ceras originárias do metabolismo das abelhas e materiais que são introduzidos durante a elaboração da própolis, como o pólen, tricomas, brotos, etc.

1.3.2 Composição Química e Atividades Biológicas

A própolis é um material pegajoso e de coloração escura que as abelhas coletam das plantas, misturam com cera e utilizam na construção e na adaptação de suas colméias (BANKOVA et al, 2000). O exsudato é coletado de diferentes plantas, dependendo da localização geográfica. Em zonas temperadas, o exsudato é coletado pelas abelhas preferencialmente de "álamo" e a própolis contém principalmente fenólicos típicos do botão de "álamo" (MARCUCCI, 1998). A composição química da própolis originária da Europa, da Ásia e da América do Norte é rica em flavonóides e ésteres substituídos do ácido cinâmico (BANKOVA et al, 1996). Estes polifenóis (flavonóides e ésteres do ácido cinâmico) são conhecidos por apresentarem atividade antibacteriana. Os principais constituintes da própolis (flavonóides), estão ausentes ou em baixas concentrações na própolis Brasileira, mas quantidades substanciais dos derivados prenilados das benzofenonas e ácido cinâmico foram encontrados (BANKOVA et al, 1995). Nas amostras européias, o conteúdo em flavonóides esteve na faixa de 20-30%, enquanto que na própolis brasileira encontrou-se de 3-7% (MARCUCCI e BANKOVA, 1999). Pode-se concluir que a própolis brasileira é caracterizada por baixa concentração de flavonóides e ésteres do ácido fenólico e altas concentrações do ácido diidrocinâmico, acetofenonas preniladas e de alguns terpenóides específicos (BANKOVA et al, 1995). Apesar da diferença, as amostras da própolis brasileira mostraram atividade antibacteriana similar à própolis européia (BANKOVA et al, 1996).

A composição da própolis é quali e quantitativamente variável, dependendo da ecologia da região da planta (KOO et al, 1999). O efeito sazonal também pode contribuir para sua composição química, porém SFORCIN et al (2000) demonstraram que não há diferença significativa com relação ao efeito sazonal na curva de sobrevivência de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, após incubação com

própolis. A atividade antimicrobiana mostrou-se eficiente, principalmente frente a bactérias gram positivas. O efeito sazonal também não afetou a atividade imunomoduladora da própolis Brasileira, conforme demonstrado por SFORCIN et al (2002) e tampouco os parâmetros bioquímicos séricos pesquisados, demonstrando assim que, apesar da complexa composição química da própolis, os parâmetros como concentração de proteína total, glicose, uréia, creatinina, colesterol e a determinação de aminotransferases (AST e ALT) e a dehidrogenase láctica (LDH), não foram afetados, indicando assim que não foram observadas alterações clínicas nos animais estudados quando da administração de própolis via oral obtida em diferentes estações do ano (SFORCIN et al, 2002).

Em virtude das diferenças químicas encontradas nas própolis de diferentes regiões do país, é de suma importância conhecer as características de cada própolis para compor um extrato padronizado.

A composição precisa da própolis bruta varia de acordo com a fonte vegetal. Em geral a mesma é composta por 50% de resinas e bálsamos vegetais, 30% de cera, 10% de óleos aromáticos e essenciais, 5% de pólen e 5% de várias outras substâncias (JENG et al, 2000).

Os compostos isolados da própolis possuem uma série de atividades terapêuticas, porém, no extrato de própolis, seus efeitos se potencializam. Os grupos químicos mais importantes que apresentam grande influência na atividade terapêutica são:

Compostos fenólicos como:

- ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (PHCA), ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (DHCA) e também prenilados derivados do ácido cinêmico compostos por benzofenonas como o 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano (DCBEN) e o 2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2H-1-benzopirano (DPB), parecem ser os maiores responsáveis pelas atividades antimicrobiana, antitumoral,

antiinflamatória, antiedematogênica e também cicatrizante da própolis (MARCUCCI et al, 2001);

- Flavonóides, tais como quercetina, galangina, pinocembrina, crisina dentre outros;
- Ácido benzóico e seus derivados;
- Ácido caféico e *p*-cumárico e seus derivados;
- Derivados do ácido e álcool cinâmico;
- Ácido salicílico;
- Derivados do benzaldeído;

Terpenos;

Compostos voláteis, dentre muitos outros.

A própolis apresenta uma série de substâncias capazes de agir terapeuticamente no organismo. Dentre suas principais atividades, encontramos a atividade antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, anestésica, antiviral, frente a herpes simplex tipo I e II (VYNOGRAD et al, 2000) e imunomoduladora (SFORCIN et al, 2002; HOHEISEL, 2001).

Muitos estudos têm sido realizados a fim de se obter maiores informações sobre a composição química e atividades biológicas da própolis das diferentes regiões do Brasil.

MARTINS et al. (2002) avaliaram o efeito do extrato etanólico de própolis comercial no crescimento *in vitro* de *Candida albicans* coletada de pacientes brasileiros HIV soro-positivos e soro-negativos em candidíase oral. Demonstrou-se que o extrato de própolis inibiu o crescimento *in vitro* da *Candida albicans* coletadas dos pacientes HIV soro-positivos, formando uma zona de inibição como a formada pelo medicamento referência, nistatina (anti-fúngico).

JENG et al (2000) demonstraram que o extrato etanólico de própolis é um inibidor para a mutagenicidade de dois mutágenos diretos, 4-nitro-O-fenilenediamina e 1-nitropireno e para dois mutágenos indiretos, 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinolina e benzo[a]pireno.

As seguintes substâncias foram isoladas do extrato de própolis e suas atividades farmacológicas foram testadas: PHCA, Artepillin C ou DHCA, DCBEN e DPB (Figuras 01, 02, 03 e 04). Observou-se que o DPB apresentou atividade frente a *T. cruzi* (ED_{50} / 24 horas – mg/mL – de $0,743 \pm 0,052$), atividade antimicrobiana frente a bactérias gram negativas como a *E. coli* e a *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias gram positivas como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis* e também um efeito relaxante em traquéia isolada de porcos (MARCUCCI et al, 2001).

Figura 01: Estrutura química do DHCA

Figura 02: Estrutura química do PHCA

Figura 03: Estrutura química do DCBEN

Figura 04: Estrutura química do DPB

O Artepillin C (DHCA) é o principal componente da própolis brasileira, este é um composto que foi isolado por AGA et al. (1994) a partir do extrato alcoólico de própolis. Apresenta a fórmula química $C_{19}H_{24}O_3$, massa molecular 300.40, nome químico ácido 3-[4-hidroxi-3,5-bis-(3-metil-2-butenilfenil)]-2-propenoico, é pouco solúvel em água. Exibe atividade antibacteriana, antiviral e citocida, frente a tumores sólidos e em células leucêmicas (KIMOTO et al, 2001), sendo que os efeitos mais marcantes foram observados em linhagens de células T, através de indução apoptótica e fragmentação de DNA (KIMOTO et al, 2000). Observou-se ainda que o Artepillin C não afetou os linfócitos normais (KIMOTO et al, 2001). Sabe-se que a atividade antibacteriana desta classe de estruturas pode ser aumentada pelo aumento do número de resíduos prenil na mesma. O ácido 3,5-prenil-4-hidroxicinâmico foi avaliado também por BANSKOTA et al. (2001) mostrando uma importante atividade contra o tumor humano fibrosarcoma (BANKOVA e MARCUCCI, 2000).

KIMOTO et al (2000) demonstraram que o extrato alcoólico de própolis e o Artepillin C exerceram efeito protetor frente a carcinogênese induzida por Fe-NTA (nitrilotriacetato férrico) e preveniram contra os danos renais oxidativos.

MARCUCCI, et al. (1996) analisaram as amostras de própolis de diferentes origens (São Paulo, Paraná, Ceará e Barbosa-SP) onde foram quantificados os aminoácidos. Sete dos aminoácidos encontrados estavam presentes nas mesmas porcentagens próximas em todas as amostras analisadas (ácido aspártico, ácido glutâmico, treonina, prolina, valina, tirosina e histidina), indicando que as abelhas podem ter obtido os aminoácidos de 3 fontes: das plantas, da contaminação polínica e/ou do seu próprio metabolismo. O excesso de aminoácido é convertido a intermediários metabólicos comuns para uso nos processos bioquímicos. A prolina, o ácido glutâmico e a arginina aumentam o nível de insulina no sangue pela ativação de enzimas pancreáticas, enquanto a sua descarboxilação leva à formação de agmatina, que por sua vez, aumenta a mitose e a biossíntese protéica, afetando a habilidade da própolis em estimular a cicatrização de tecidos. Os aminoácidos da própolis podem ser responsáveis, em parte, pelos processos regenerativos como a cicatrização e o crescimento celular nos tecidos dos mamíferos (MARCUCCI et al, 1996).

Assim, MARCUCCI (1995), propõem a seguinte composição em aminoácidos para diferentes regiões como demonstrado na Tabela 01.

Tabela 01: Aminoácidos encontrados nas amostras de própolis ($\mu\text{g/g}$).

Regiões	SP (Brunelli)	PR	Ceará	SP (Barbosa)
Aminoácidos Totais	87,04	18,89	13,56	62,37

Os flavonóides apresentam não menos que 41 ações farmacológicas. Entre as que se destacam pela eficácia terapêutica está a ação que exerce sobre a rede capilar, diminuindo sua fragilidade e sua permeabilidade. Esta propriedade, similar à que

possui a vitamina PP ou niacina, determina que os flavonóides sejam denominados "bioflavonóides" (GHISALBERTI, 1979).

Com relação às diferenças na composição em flavonóides e na atividade antimicrobiana frente a *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* e *Staphylococcus aureus*, obtidas através de análise por HPLC e halo de inibição em placa respectivamente, das amostras de própolis, obtidas em regiões distintas do Brasil, KOO et al (1999) e PARK et al (1998), demonstram os resultados, em média por região, listados na Tabela 02.

A quercetina, um flavonol presente na própolis, apresenta um amplo espectro de ação farmacológica. ZHAO, et al. (1999) demonstraram que a quercetina modula a liberação de endotelina, PGI₂ de células endoteliais vasculares e o ativador de plasminogênio tecidual. Assim, a quercetina causa vasodilatação por mecanismos dependentes e independentes de endotélio, atua ainda diminuindo a concentração sérica da fração LDL do colesterol, em função de sua atuação como agente sequestrante de radicais livres e inibidor da peroxidação lipídica.

Tabela 02 – Flavonóides (mg/g) e atividade antimicrobiana (halo de inibição – mm) encontrados nas amostras de própolis das diferentes regiões, em média (KOO, et al (1999) e PARK et al (1998).

Regiões Flavonóides	RS	PR	SP	MG
Quercetina	3,40	1,303	2,20	1,05
Kaempferol	3,85	1,10	3,32	1,80
Apigenina	1,81	1,50	2,78	0,50
Isoramnetina	N	2,30	N	1,10
Ramnetina	0,80	0,50	1,35	N
Pinocembrina	12,05	12,60	0,40	1,55
Sakuranetina	14,60	7,50	9,24	14,40
Isosakuranetina	N	N	N	0,20
Crisina	11,6	9,70	9,55	2,10
Acacetina	14,7	4,90	13,00	6,30
Galangina	7,88	7,00	7,02	0,50
Kaempferide	2,15	3,20	N	11,30
Tectocrisina	3,30	1,00	N	N
Total	76,14	52,60	48,86	40,80
Atividade Antimicrobiana				
<i>S. mutans</i>	2,25	1,0	1,5	1,0
<i>A. naeslundii</i>	2,75	1,5	2,0	2,25
<i>S. aureus</i>	1,50	1,0	1,0	0,75

N: não detectado

1.3.3 Extrato de Própolis Padronizado

A composição de um lote padronizado se justifica em função dos constituintes e atividades biológicas encontradas nas diversas regiões, conforme Tabela 03.

Tabela 03 – Justificativa da composição do lote padronizado de própolis, de acordo com regiões, com embasamento na constituição química preconizada pela literatura, visando otimização da atividade biológica da própolis (KOO, et al (1999) , PARK et al (1998) e MARCUCCI, et al., 1995, 1996, 1998, 1999 e 2001).

Região	Substância Ativa	Atividade Biológica
RS	Flavonóides	Antimicrobiana, antiinflamatória, antioxidante, anti-radicais livres
PR	DPB	Atividade Antimicrobiana marcante principalmente frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus faecalis</i>
SP	Aminoácidos	Reepitelização tissular, fonte de aminoácido para produção de tecidos (uso tópico) em pacientes queimados
MG	Compostos prenilados PHCA, DHCA, outros	Atividade Antimicrobiana, antitumoral e relaxante traqueal

Obs. Todas as regiões apresentam os constituintes acima descritos, porém quantitativamente observamos variações que podem contribuir para a obtenção de um extrato enriquecido.

1.3.4 Usos Dermatológicos

A própolis tem sido utilizada para o tratamento de muitas enfermidades da pele: nas intervenções queratóxicas ou seborréicas, na fragilidade cutânea, nas contusões, no tratamento de feridas, de queimaduras, de abscessos, de furúnculos, de supurações diversas, de úlcera por decúbito, de verrugas, de cicatrizes, de certas micoses e de manifestações cutâneas diversas da herpes, entre outras.

As ações terapêuticas seriadas são: anti-séptica, cicatrizante, regeneradora, protetora, emoliente e refrescante da pele, atividades imprescindíveis na elaboração de cosméticos e produtos de beleza.

GREGORY et al. (2002) realizaram uma comparação entre um creme de própolis e outro de sulfadiazina de prata em tratamento de pacientes apresentando queimaduras brandas. Seus resultados demonstraram que não houve diferença significativa quanto à contaminação microbiana, porém, as lesões tratadas com creme de própolis mostraram menor inflamação e cicatrização mais rápida do que o antibiótico convencional.

ATIASOV et al (1978) relataram trabalhos realizados aplicando-se própolis na forma de pomada em 830 pacientes de 17 meses a 87 anos de idade com queimaduras profundas, estendendo-se até 75% da superfície do corpo. Estes concluíram que a própolis tem ação bactericida contra os microrganismos gram negativo e gram positivo, influência estimulativa no processo de regeneração das feridas, intensificando a proliferação epitelial e o crescimento da granulação, melhorando a circulação sangüínea e linfática, e diminuindo a permeabilidade de vasos da superfície da ferida. Em outra pesquisa o autor notou uma visível tendência de diminuição dos neutrófilos, o que demonstra ativação do processo de regeneração das

feridas. Notou também que a troca do curativo é menos dolorida, e não origina traumas nas granulações, o que é de suma importância na fase pós-enxerto da pele.

BOLSHAKOVA (1975) tratou 110 pacientes infectados com *trichophyton* na zona capilar na cabeça com 50% de própolis (como um unguento). Em 97 pacientes obteve excelentes resultados. Outros exemplos de tratamento das doenças dermatológicas foram descritos quando a própolis era usada como um agente anti-séptico, antimicótico, bacteriostático, antiviral e fungistático. Muitas outras aplicações dermatológicas foram descritas para a própolis. Tem sido usada para cicatrização de ferimentos, regeneração tissular, tratamento de queimaduras, de neurodermatitis, de úlceras, de psoríasis, de herpes simples e genital, de prurido, de gangrenas e como adstringente (BOLSHAKOVA, 1975).

A própolis é, ainda, um agente reparador de tecido em cicatrização de ferimentos e em procedimentos cirúrgicos (MAGRO-FILHO e de CARVALHO, 1990).

Os pesquisadores continuam buscando a dosagem e concentração ideal do produto para o organismo humano, embora os resultados obtidos, de modo geral, sejam satisfatórios, confirmando o grande valor terapêutico demonstrado nos estudos científicos.

1.3.5 Propriedades Cicatrizantes e Antiinflamatórias

MARCUCCI, *et al.* (2001), demonstraram que os compostos fenólicos (ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico e ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) presentes na própolis brasileira, apresentaram potente atividade antiinflamatória, nas doses testadas (0,01 e 0,1 mg/kg via intraperitoneal), podendo explicar, pelo menos em parte, o efeito antiinflamatório também encontrado para o extrato de própolis bruto, sobre o mesmo modelo experimental - pleurisia induzida por bradicinina.

DIAZ et al (1996, 1997), estudaram o mecanismo pelo qual a própolis acelera a cicatrização e observaram diminuição do exsudato inflamatório agudo com o aumento da quantidade de fibroblastos maduros, inibição da degranulação das células, que explicaria a diminuição do edema e da inflamação observada clinicamente com o emprego tópico destes medicamentos, aumento do índice mitótico do estrato basal da epiderme, aumento da queratinização, que explica o porquê das feridas serem reparadas em menor tempo.

No tratamento local de queimados, constatou-se a propriedade revitalizante da própolis, mediante a diminuição da infiltração linfocitocitária e do aumento do tecido de granulação que tem aplicação local em queimaduras de segundo e terceiro graus. Esta propriedade, de acordo com grupos médicos, facilita o trabalho com os pacientes ambulatoriais, permitindo considerar esta terapêutica como um valioso recurso.

Em 1990, TROSHEV et al, observaram os benefícios terapêuticos da própolis em queimaduras empregando modelos animais e comparando com outros medicamentos. Estudos anatomopatológicos minuciosos realizados em ratos permitiram concluir que a aplicação tópica de própolis acelera o processo de reparação epitelial.

A propriedade antiinflamatória foi verificada em 75 pacientes que foram expostos a uma insolação. Observou-se que as zonas protegidas com própolis apresentaram menor edema e que o eritema retrocedeu mais rapidamente do que os grupos controles.

1.3.6 Propriedade Anestésica Local

Esta propriedade intrínseca da própolis lhe confere grande utilidade para o tratamento de lesões dolorosas como aftas e queimaduras. Nestes casos, os pacientes relataram “ardor” nos primeiros segundos, seguido do efeito anestésico local, que trazia alívio para as dores (VYNOGRAD, et al (2000); HOHEISEL, 2001).

Estudos *in vitro* demonstraram que a própolis possui uma potência anestésica local similar à da novocaína a 5% e que em uma concentração de 2 – 4%, é de 3 a 5 vezes mais potente que a cocaína (GHISALBERTI, 1979).

HAVSTEEN (2002) descreveu que um apicultor, desejando convencer espectadores sépticos do poder anestésico local dos flavonóides, colocou uma abelha na porção posterior da mão, uma área ricamente suprida com neurônios sensoriais, e estimulou a abelha para picá-la. Então a abelha saiu e o apicultor mascarou um pedaço de própolis. Na sequência, ele esfregou sobre a picada, a emulsão de flavonóide e saliva sobre o ferimento. Após alguns segundos, disse que a dor havia desaparecido. Os flavonóides atuam inibindo as ciclooxigenases (COX), impedindo assim a síntese das prostaglandinas que são responsáveis pelos sinais da inflamação. A própolis poderia estar exercendo sua atividade, neste caso, através da ação dos flavonóides de sua constituição.

1.3.7 Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi uma das primeiras atividades a serem pesquisadas, e se deu em função das observações nas colméias. Várias cepas de microrganismos foram testadas. MERESTA E MERESTA (1985) estudaram a sensibilidade de 75 cepas bacterianas frente à ação da própolis. Todas as cepas exibiram uma alta sensibilidade ao extrato de própolis, sendo que a sensibilidade foi marcante frente as cepas de *Staphylococcus* spp e *Streptococcus* spp. A atividade antimicrobiana da própolis contra *S. aureus* 209P teve uma concentração inibitória mínima (CIM) e uma concentração bacteriana mínima de 10 e 120 mg/ml respectivamente. VALDEZ et al. (1985) observaram que o extrato etanólico de própolis inibiu o crescimento de várias bactérias incluindo as cepas de *Streptococcus* e *Bacillus*. GRANGE E DAVEY (1990) relataram que as preparações de extrato etanólico de própolis (3 mg/mL) inibiram completamente o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli*, mas não tiveram efeito sobre a *Klebsiella pneumoniae*.

Além das bactérias aeróbicas o efeito antimicrobiano do extrato etanólico de própolis foi testado contra um total de 267 cepas anaeróbicas. As culturas de bactéria, de forma geral, mostraram sensibilidade maior para 1 mg/mL de extrato etanólico (KEDZIA, 1988).

A atividade antimicrobiana de própolis é devida aos flavonóides, aos ácidos aromáticos e aos ésteres presentes na resina. Galangina, pinocembrina e pinostrobin, foram os flavonóides reconhecidos como os agentes mais efetivos contra as bactérias (DIMOVE et al. 1992). Ácido ferúlico e caféico também contribuíram para a ação bactericida da própolis.

KEDZIA et al. (1988) publicaram que o mecanismo de ação para a atividade antimicrobiana é complexo e que pode ser atribuído ao sinergismo dos flavonóides, hidroxiácidos e sesquiterpenos.

Foi também demonstrado que a própolis, exibiu efeito antimicrobiano pela inibição da divisão celular, desorganização da membrana citoplasmática na parede celular e inibição da síntese protéica (TAKAISI-KIKUNI and SCHILCHER, 1994).

1.4. Queimaduras

Dano celular, inflamação e regeneração são fenômenos muito comuns e freqüentes. As causas destes danos celulares são normalmente causados por agentes físicos, químicos ou biológicos. Embora estes processos sejam iniciados por diferentes origens, seguem os mesmos passos.

Os flavonóides podem ser usados efetivamente neste sistema complexo de processos bioquímicos. O ponto de ataque na célula é geralmente a membrana plasmática e suas reações são restritas a uma faixa limitada de processos, em função dos diferentes processos desencadeadores da lesão (TILL e THIELMANN, 1989).

Os radicais livres são substâncias agressivas ou íons que carregam elétrons desemparelhados. Eles são formados em localizações fisicamente restritas, como peroxissomas e mitocôndria, como resultado de processos metabólicos normais e como produto da radiólise da água. A célula sobrevive a pequenas quantidades de radicais livres, que são formados no curso normal do metabolismo. Entretanto, quando a produção de radicais livres se torna excessiva em situações patológicas, se torna necessária a administração de antioxidantes e sequestrantes de radicais livres a fim de se minimizar os danos nas membranas, enzimas e genes. Os flavonóides são excelentes agentes para este objetivo, mas eles devem ser ingeridos regularmente e em quantidades consideráveis, devido a sua vida curta no organismo (HAVSTEEN, 2002).

A falta de oxigênio desencadeia reações de radicais livres que são tão nocivos à bioquímica celular quanto o seu aumento na presença de um excesso de oxigênio ou por intoxicação.

A deficiência de oxigênio pode ter uma causa respiratória, mas freqüentemente isto é resultado de um fluxo sangüíneo deficiente (isquemia). A isquemia pode ser

resultado de aterosclerose, choque ou ruptura vascular. A primeira vítima da falta de oxigênio é a cadeia respiratória, a fonte mais importante de ATP. Uma demanda de curto prazo para esta substância na célula aumenta a fosforilação de substrato que causa acúmulo de ácido láctico e uma queda no pH, que leva uma dissolução lisossomal e um dano irreversível.

Alguns flavonóides dão suporte à regeneração tissular após o dano. Entretanto este processo é tão complexo e incompletamente entendido que a sinalização de mecanismos específicos para os efeitos dos flavonóides é somente possível em poucos dos seus aspectos. Por milênios, os flavonóides têm sido usados como esterilizante, anestésico local e como agente promotor de regeneração em pomadas, produzidos por própolis ou mel, para cobrir, proteger e iniciar a cicatrização de ferimentos.

O tecido conectivo saudável é uma barreira efetiva contra a invasão de infectantes. A perda do tecido conectivo, que está envolvido aqui primeiramente, consiste de uma rede fechada de proteínas fibrosas, como colágeno, elastina e sulfato de condroitina. A próxima consiste principalmente de hexosamimas sulfatadas e ácido hexúrico arranjados em longos conjuntos de cadeias que são sustentadas por pontes conectivas de peptídios.

Dispersas nesta rede, encontramos células como fibroblastos, mastócitos e macrófagos. Alguns deles produzem elementos, proteínas e heterogliconas da matriz. No evento da invasão, de vírus, células bacterianas ou metástases, estes intrusos secretam enzimas como hialuronidase, collagenase (aqui especialmente do tipo III) e elastase, que hidrolisam os polímeros da malha, assim facilitando a dispersão da infecção. A hialuronidase é uma glicanase simples que às vezes é inibida por flavonóides (KUTTAN et al. 1981). Ainda, os flavonóides previnem a perda do tecido conectivo pelo seqüestro de radicais livres e pelo crosslinking com a elastina (complexo flavonóide - Cu^{2+}). No caso das collagenases, nós estamos lidando com metaloenzimas,

com Zn^{2+} como uma parte integrante do sítio catalítico. Desde que os flavonóides formam complexos ligantes fortes com íons de metais pesados, é provável que alguns complexos previnam a formação do estado de transição.

A reconstrução do tecido lesado requer ação coordenada de um grande número de sistemas bioquímicos; a natureza deles depende da presença ou ausência de toxinas contaminantes no ferimento. Flavonóides podem matar ou pacificar muitas bactérias, viroses e outras toxinas (GUTTNER, et al. 1982). Além do mais, eles agem contra a decomposição do tecido conectivo, pelas collagenases e elastases, desde que eles inibem a COX (ciclooxigenase) ou a prostaglandina H_2 sintase, que produzem eicosanóides que via um receptor de membrana plasmática e um sinal em cadeia, induz a expressão de genes proteases (WAHL, et al, 1990). Assim, os flavonóides talvez poderiam ser administrados transientemente e não continuamente por um longo período, uma vez que alguns dos auxiliares, processos não-anabólicos como a atração quimiotática de fagócitos, que combatem os agentes tóxicos, requerem eicosanóides como guias (HAVSTEEN, 2002).

Outro sistema auxiliar, que opera no ferimento, é a coagulação sangüínea. No seu ramo venoso, a fibrinogênese não é significativamente afetada pelos flavonóides, embora estruturalmente relatado os derivados da cumarina são inibidores clássicos destes processos. O ramo arterial da trombogênese, entretanto, é influenciada pelos flavonóides, desde que ele depende da agregação irreversível dos trombócitos, que são fortemente favorecidos pela TxA_2 (troboxana A_2) que também causa vasoconstrição local, que previne o excessivo sangramento. O efeito da TxA_2 no tônus vascular é contrariado pela prostaciclina (PGI_2) das células endoteliais, uma vez que a PGI_2 causa vasodilatação pelo aumento a contração de AMP_c . Os flavonóides ainda são conhecidos por reduzirem a agregação plaquetária.

Os danos celulares liberam todos os mediadores inflamatórios. As quimiotaxinas nas fases iniciais exercem um papel importante na atração fagocítica, que removem as células debrís. Subseqüentemente, permite-se a entrada de tecido conectivo, fibroblastos e células endoteliais neste cenário. Acredita-se que estes passos são controlados por uma proteína inibidora da quimiotaxia liberada pelos granulócitos. O relaxamento vascular induzido pela epinefrina e NO e o aumento de permeabilidade induzido por estresse aumenta o fornecimento de substrato para a regeneração.

Importantes agentes quimiotáticos para a produção de colágeno a partir de fibroblastos são a fibronectina e seus fragmentos, colágeno e seus peptídios, assim como fator de crescimento derivado de plaquetas, linfocinas, tropoelastina, fator complemento C_{5a} e leucotrieno B₄.

As células endoteliais também produzem outros componentes da matriz. Fibronectina, que é sintetizada no fígado e secretada para o sangue, liga-se a fibrina, isto é, esta é concentrada na lesão. Hidrolases lisossomais liberam peptídios da fibronectina, que atrai fibroblastos pela quimiotaxia. Fibronectina também se liga a todos os tipos de colágeno, assim como endócitos, fibroblastos e células do músculo liso, por interações hidrofóbicas. As células endoteliais são alinhadas desta forma ao longo das fibrilas de colágeno. A fibronectina plasmática é não-adesiva devido a sua conformação especial, mas posteriormente é modificada até sua ligação ao colágeno ou interação com proteoglicanas sulfatadas como heparina.

O ferimento é coberto por células epiteliais devido a interação da última com colágeno IV. Este processo envolve efeito mitogênico nestas células, que em uma hora começam a replicar. A zona de proliferação na ponte do ferimento progride em uma proporção de 1mm/dia e as primeiras formam uma camada fina, que subseqüentemente espessa. Com 12 dias, os fatores angion gênicos, como a forma básica do fator de crescimento do fibroblasto, começa a formação de capilares que

melhoram o suprimento de nutrientes no ferimento. Quando o ferimento fecha-se com uma escara, a proliferação celular diminui e as miofibrilas contraem a escara.

Ferimentos infectados são reparados mais lentamente. Isto enfatiza a importância de manter o ferimento estéril e justifica os remédios antigos incluindo a aplicação de produtos contendo flavonóides, como mel ou própolis na lesão (HAVSTEEN, 2002).

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Desenvolvimento e avaliação de uma forma farmacêutica de liberação sustentada para uso tópico contendo própolis.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterização físico-química da matéria prima;
- Padronização e preparação do extrato de própolis;
- Avaliação da atividade antimicrobiana da matéria prima e da própolis padronizada;
- Desenvolvimento da formulação;
- Avaliação da estabilidade físico-química das formulações;
- Estudo do comportamento reológico;
- Estudos do perfil de Liberação *in vitro*.

3. Material e Métodos

3.1 Material

3.1.1 Reagentes e soluções

- Metanol, grau de pureza analítico, Merck®;
- Padrão de quercetina, Sigma® - lote 109H0882;
- Propilenoglicol, grau farmacêutico, Synth lote 47397;
- Poloxamer 407®, Makeni Chemicals, lote 41-0127;
- Ácido fórmico, grau analítico, Merck®;
- Metanol, grau cromatográfico, Merck®;
- Própolis - matéria prima de diferentes regiões (R1, R2, R3 e R4) e Extrato Padronizado de Própolis, obtidos da empresa Apis Flora Indl. e Coml. Ltda;
- Meios de Cultura: Mac Conkey Agar (lote 10909005), Manitol Salt Agar (L. 1055000), Bacto Selenite Broth desidratado (L. 31512), Potato Dextrose Agar (L. 2189533), Bacto Brilliant Green Agar (L. 143600), todos obtidos da DIFCO®;
- Petrifilm, placa para contagem de leveduras e bolores (L. 2004-12 PC) e placa para contagem de aeróbios (L. 2004-12PG), obtidos da 3M®;
- Cepas padrões: *Micrococcus luteus* ATCC 9.341 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923

3.1.2 Equipamentos

- Estufa, marca Fanem, modelo 515 C;
- Capela de Fluxo Laminar, marca VECO®, modelo VLFS-12M
- Balança analítica, marca Marte® – modelo 220809 (sensibilidade 0,001g);
- Aparelho de Soxhlet, marca Quimis®
- Rotaevaporador, marca Fisatom®;
- Banho-de-aquecimento, marca Fisatom®;
- Refrigerador termostatzado, marca Tecnal® – modelo TE – 184;
- Espectrofotômetro, marca Spectronic® – modelo Genesis 5;
- Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência, Merck-Hitachi® modelo D-7000 com rede de fotodiodos e injetor automático;
- Coluna em fase reversa Lichrochart 100 RP-18 (12,5 x 0,4 cm, diâmetro de partícula de 5 µm) (Merck®, Darmstadt, Alemanha);
- Reômetro, modelo ARES
- Tubo de diálise com retenção para macromoléculas de peso molecular acima de 12000 Daltons.- Sigma-Chemical (St. Louis, EUA)
- Sistema de Liberação desenvolvido no laboratório e composto por uma cuba de vidro com sistema de aquecimento e agitação.

3.2 Método

3.2.1 Caracterização Físico-Química da Matéria-prima

3.2.1.1 Amostras de própolis utilizadas neste estudo

Estudou-se a própolis "*in natura*" obtida do Brasil, proveniente de diferentes regiões denominadas PR (Paraná), SP (São Paulo), RS (Rio Grande do Sul) e MG (Minas Gerais). Além destas matérias-primas, estudou-se também o Extrato de Própolis Padronizado da empresa Apis Flora Industrial e Comercial Ltda, sendo que o lote padronizado foi composto pelas matérias-primas avaliadas, visando à obtenção de lotes otimizados e reprodutíveis.

3.2.1.2 Preparação da Amostra

As amostras (cerca de 25,0g) foram estocadas em um freezer por um período de 12h, sendo posteriormente trituradas em liquidificador para redução do tamanho das partículas.

3.2.1.3 Perda por Dessecação

A análise foi realizada através de perda por dessecação até peso constante, de acordo com o método preconizado pela Farmacopéia Brasileira, IV edição, 1988.

3.2.1.4 Cinzas Totais

A análise foi realizada em mufla até a obtenção de peso constante, de acordo com o método preconizado pela Farmacopéia Brasileira, IV edição, 1988.

3.2.1.5 Massa Mecânica

A análise foi realizada de acordo com o método preconizado por ASIS, 1989, sendo que a massa mecânica é o resíduo da matéria-prima obtido após a extração das substâncias através de soxhlet.

3.2.1.6 Determinação de Cera

A análise foi realizada de acordo com o método preconizado por ASIS, 1989, sendo que a cera foi obtida através da filtração do extrato de própolis refrigerado e previamente obtido em aparelho de soxhlet.

3.2.1.7 Determinação do Resíduo Seco

A análise foi realizada em estufa até a obtenção de peso constante, de acordo com o método preconizado pela Farmacopéia Brasileira, IV edição, 1988.

3.2.1.8 Determinação de Flavonóides Totais por Espectrofotômetro

A análise foi realizada em espectrofotômetro utilizando-se como padrão a quercetina, de acordo com o método preconizado por Woisky, 1996.

3.2.2 Identificação e Quantificação do DPB (marcador para a própolis) através de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

As amostras foram analisadas por CLAE utilizando-se equipamento da marca Merck-Hitachi modelo D-7000 com rede de fotodiodos e injetor automático. As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna em fase reversa Lichrochart 100 RP-18 (12,5 x 0,4 cm, diâmetro de partícula de 5µm) (Merck, Darmstadt, Alemanha) utilizando-se como fase móvel água-ácido fórmico (Merck) (95:5, solvente A) e metanol (solvente B) (grau cromatográfico, Merck). A eluição foi desenvolvida em um fluxo de 1mL/min utilizando-se um gradiente linear. O tempo máximo de análise foi de 60 minutos e a detecção foi efetuada em comprimentos de onda correspondente a 280 e 340nm (Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI: PI 0006272-3).

3.2.3 Avaliação Microbiológica

3.2.3.1 Contagem do Número Total de Microrganismos Aeróbios (Bactérias e Fungos) e Pesquisa de Patógenos

Avaliou-se a contaminação microbiológica (contagem de bactérias e fungos totais) dos géis em todos os tempos da estabilidade acelerada para a verificação do comportamento microbiológico destes nas condições estudadas, para tanto, empregou-se a técnica de semeadura em profundidade, conforme recomendado pela Farmacopéia Brasileira, 4º. Ed., 1988.

Para a pesquisa de patógenos, nas mesmas amostras, empregou-se o método de enriquecimento e isolamento, conforme recomendado pela Farmacopéia Brasileira, 4º. Ed., 1988.

3.2.3.2 Determinação da Atividade Antimicrobiana – Método Difusão em Agar

Para a avaliação da atividade antimicrobiana das matérias-primas e do extrato de própolis padronizado, foi utilizado o método de difusão em ágar (KUJUMGIEV, et al 1999). Os microrganismos teste foram *Micrococcus luteus* – cepa ATCC 9341 e *Staphylococcus aureus* - cepa ATCC 25923. A atividade antimicrobiana foi medida através da formação do halo de inibição sobre uma camada de ágar, após incubação por 72 horas a temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

3.2.4 Preparação do Extrato Glicólico de Própolis

3.2.4.1 Obtenção do Extrato Alcoólico de Própolis

Após a avaliação da matéria-prima das diferentes regiões e de posse dos dados da literatura, obteve-se a definição da constituição do lote para a preparação do extrato padronizado de própolis, que foi obtido com a mistura da matéria-prima triturada ("blend").

O "blend" obtido foi colocado em um tanque extrator, e submetido à agitação mecânica intermitente por 8 horas, seguido de decantação, utilizando-se solução hidroalcoólica como solvente, conforme PARK e Ikegaki, 1998. Após a decantação, percolou-se o extrato hidroalcoólico obtido, utilizando-se como agente filtrante a própria matéria-prima que permaneceu no fundo do tanque.

3.2.4.2 Obtenção do Extrato Glicólico de Própolis

O extrato alcoólico obtido anteriormente foi concentrado a baixa temperatura e pressão e diluído em propilenoglicol de forma a obter um teor de extrato seco de 30,0% p/v de própolis.

3.2.5 Desenvolvimento da formulação

O desenvolvimento da formulação envolveu a pesquisa da concentração do polímero, a escolha do extrato de própolis (hidroalcoólico ou glicólico), pesquisa de agentes de solubilização do extrato de própolis no gel, uma vez que as características físico-químicas da formulação se alteram em função dos constituintes adicionados à formulação.

3.2.5.1 Preparação dos géis

Os géis foram preparados pelo método a frio descrito por SCHMOLKA (1972), onde se dispersou o polímero em água destilada fria, sob agitação constante. Foram preparadas duas amostras controle, sendo a primeira constituída pela dispersão do polímero (controle) e a segunda composta ainda pelo agente solubilizante utilizado para a obtenção de um gel límpido (controle 01). As três formulações estudadas contendo extrato padronizado de própolis apresentavam respectivamente 1,2% (GEL 01), 2,4% (GEL 02) e 3,6% (GEL 03) p/v de extrato seco de própolis.

3.2.6 Avaliação da estabilidade

3.2.6.1 Avaliação da estabilidade química

O teste de estabilidade submete a formulação a condições de tensão que desafiam sua estabilidade, sendo uma ferramenta útil para predizer a viabilidade da formulação (RIEGER, 1996). A estabilidade das formulações pode ser avaliada por mudanças bruscas nas condições de temperatura ou centrifugação, por exemplo. A estabilidade das formulações foi avaliada de acordo com o programa de estabilidade proposto pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) na Resolução 391, de 9 de agosto de 1999, onde se propõe que as formulações são submetidas à estufa ($40^{\circ}\text{C} \pm 2$ – Umidade Relativa $75\% \pm 5$) pelo período de 6 meses sendo realizadas as análises em 0, 30, 60, 90 e 180 dias. Estas formulações, após as condições de tensão foram analisadas para detecção de alterações nas suas características físico-químicas, mediante os ensaios de pH e quantificação de seus marcadores por CLAE.

3.2.6.2 Determinação da estabilidade física

Os frascos foram abertos nos tempos pré-estabelecidos e uma inspeção visual da aparência física das formulações foi realizada para observar se houve contaminação microbiana ou quebra da estrutura do gel com perda de suas propriedades termorreversíveis.

3.2.6.3 Estudo do Comportamento Reológico

Para a avaliação do comportamento reológico utilizou-se um reômetro modelo ARES. As medidas foram efetuadas utilizando-se um cilindro concêntrico, tipo Couette, com diâmetro interno de 25 mm, diâmetro externo de 27 mm e altura de 27 mm. O cilindro é envolvido por um forno ligado a um cilindro de nitrogênio líquido. O forno pode ser aquecido ou resfriado e a temperatura é detectada por um sensor conectado ao cilindro. Na caracterização reológica dos géis, o equipamento foi ajustado no módulo oscilatório, onde o cilindro externo promove oscilações a um dado valor de frequência.

A temperatura de transição sol-gel foi determinada na velocidade angular de 1rad/s, com velocidade de aquecimento de 2°C/min. O gráfico da temperatura de transição foi obtido variando-se a temperatura em função do módulo elástico (G'). A temperatura de transição é calculada passando-se uma reta no intervalo onde os valores do módulo elástico aumentam em função do aumento da temperatura; então, calcula-se o ponto médio da reta e, a partir desse ponto, demarca-se uma reta até o eixo (x) determinando-se a temperatura de transição sol-gel. A temperatura de transição sol-gel é definida como o ponto onde o módulo elástico situa-se na metade do caminho entre o G' da solução e o G' do gel (EDSMAN et al., 1998).

Os módulos elástico (G') e viscoso (G'') foram determinados pelas medidas do módulo complexo (G^*). O módulo elástico (G'), o módulo viscoso (G'') e a viscosidade dinâmica (η') são calculados por:

$G' = G^* \cdot \cos(\delta)$ $G'' = G^* \cdot \sin(\delta)$ $\eta' = G'' / \omega$

Onde: ω é a velocidade angular

O módulo elástico (G') e o módulo viscoso (G'') foram determinados em frequências de 0,1 a 100 rad/s na temperatura de 37°C, para obter a caracterização física do material.

As medidas de viscosidade foram realizadas à temperatura de 37°C, similar à temperatura corporal, para valores de taxa de cisalhamento entre 0,1 a 500 s⁻¹.

Realizou-se um estudo de variação de tensão em função do módulo elástico (G') e do módulo viscoso (G'') para todas as amostras, visando determinar a amplitude máxima de tensão desse material. Essas medidas foram realizadas na temperatura de 37°C com uma velocidade angular correspondente a 1 rad/s. Assim, deve-se tomar cuidado para que a tensão não rompa a rede tridimensional do gel. As medidas reológicas devem ser feitas no módulo oscilatório do equipamento, aplicando uma tensão e frequência de oscilação pequenas para manter a estrutura do gel intacta durante o tempo de análise. As medidas oscilatórias fornecem dados das propriedades dinâmicas do gel como determinação dos módulos elástico (G') e viscoso (G'').

3.2.7 Estudo do perfil de liberação "*in vitro*"

Os estudos de liberação da própolis a partir das formulações desenvolvidas foi realizado em um sistema de difusão que simula as condições *in vivo* de transferência do fármaco da matriz do gel para o seu local de ação. O sistema de difusão é constituído por um tubo de diálise cilíndrico fechado nas extremidades que permanece imerso em um meio receptor. A área superficial de exposição do gel é de 6 cm². O tubo de diálise consiste de uma membrana de acetato de celulose que retém macromoléculas com peso molecular superior a 12000 Daltons. A membrana não é uma barreira contra a difusão da própolis, entretanto, não permite a difusão do polímero que possui massa molecular de 12500 Daltons.

Exatamente 500 mg do gel foram pesados no tubo de diálise e este foi fechado nas suas extremidades. Os géis possuem uma concentração fixa do polímero para as três amostras estudadas (GEL 01, GEL 02 e GEL 03) e concentrações variadas de própolis, sendo GEL 01 (1,2% extrato seco de própolis), GEL 02 (2,4% extrato seco de própolis) e GEL 03 (3,6% extrato seco de própolis). O tubo foi imerso em um becker contendo 60 mL da solução tampão fosfato de sódio isotônico pH 7,2. O meio receptor foi mantido a temperatura de $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por meio de um banho termostatizado e continuamente agitado por meio de uma barra magnética a velocidade de aproximadamente 200 rotações por minuto (rpm). Alíquotas de 3 mL foram retiradas nos intervalos de tempo correspondentes à 0, 8 e 12 horas e repostas por 3 mL do meio limpo para evitar perda de volume e concentração do fármaco. Os experimentos de liberação foram efetuados em duplicata (n=2).

A concentração de própolis das amostras, quantificada através do DPB, foi determinada por CLAE, através do método descrito pela patente INPI: PI 0006272-3. Os dados obtidos foram relacionados em um gráfico da porcentagem (%) de fármaco liberado em função do tempo.

Os dados obtidos nos estudos do perfil de liberação foram utilizados para o estudo da cinética de liberação que envolve dois modelos matemáticos o de ordem zero e o de pseudo ordem zero (HIGUCHI, 1961). O modelo de ordem zero é analisado por regressão linear direta relacionando-se a concentração com o tempo. O modelo de pseudo ordem zero exige cálculo da raiz quadrada do tempo e posterior regressão linear relacionando-se a concentração com a raiz quadrada do tempo. Os valores relativos ao coeficiente de correlação foram comparados e o modelo matemático que melhor ajusta-se a cinética de liberação do fármaco da formulação corresponde àquele que apresentar maior coeficiente de correlação linear.

As formulações desenvolvidas são sistemas onde o fármaco está completamente dissolvido no veículo. Esse sistema segue a lei da raiz quadrada (HIGUCHI, 1962):

$$Q=2.C_0[(D.t)/\pi]^{1/2}$$

onde Q é a quantidade de fármaco liberado por unidade de área, C_0 é a concentração de fármaco inicial, D é o coeficiente de difusão do fármaco e t é o tempo. Assim, se o fármaco liberado obedece a essa lei, a quantidade de fármaco liberado é uma função linear da raiz quadrada do tempo ($t^{1/2}$) e D pode ser calculado no intervalo estudado. Nesse modelo matemático a difusão do fármaco depende das características do veículo, isto é, da viscosidade do gel e do processo de dissolução do gel no meio receptor. As condições de "sink" devem ser mantidas no meio receptor para que o coeficiente de difusão (D) seja constante para um determinado tempo e posição no veículo.

Figura 05 – Esquema do aparelho de liberação *in vitro*.

4. Resultados e Discussão

4.1 Estudo da Própolis

Nos últimos anos houve aumento significativo no interesse pelo desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos para uso oral, tópico e parenteral. Esta tendência dos pesquisadores e laboratórios industriais se dá em função dos benefícios proporcionados pelos novos sistemas, como: possibilidade de modulação da liberação do fármaco, maior segurança, efetividade e menores custos (avaliação risco/benefício). Com isto, pode-se monitorar a concentração do fármaco e minimizar os efeitos colaterais provocados pelos sistemas convencionais.

As propriedades utilizadas para prolongar a liberação de fármacos são muitas e dependem da característica do fármaco a ser veiculado, do sistema de liberação proposto, constituintes da formulação e suas interações, propriedades reológicas, etc. Para se atingir o desenvolvimento de tais sistemas, uma vasta área do conhecimento está empenhada e trabalhando em pesquisas que abrangem desde a ciência de materiais, a bioquímica, a tecnologia farmacêutica até a medicina.

Neste projeto, um polímero não-iônico foi o utilizado para proporcionar a liberação sustentada da própolis, visando o desenvolvimento de uma "pele artificial" (SCHMOLKA, 1972) que beneficie o paciente queimado.

O polímero não-iônico empregado em nosso trabalho apresenta propriedade de geleificação termorreversível, assim, com o aumento da temperatura o polímero agrega-se em micelas para minimizar a energia livre da solução. Em baixas temperaturas o polímero apresenta-se sob a forma de unímero e micela e, em temperatura mais elevada e presença de sais, ocorre a desidratação da cadeia

hidrofóbica de polipropileno e há a formação de agregados de micelas, que se organizam no gel, conferindo rigidez ao mesmo.

O paciente queimado é um paciente que tem particularidades e requer cuidados diferenciados, uma vez que está em condições imunológicas debilitadas e, normalmente, apresenta uma grande área de exposição ao ambiente externo. A pele é o órgão do corpo responsável por funções de grande importância para o ser humano, principalmente como proteção frente aos agentes agressores do meio externo, dentre eles os microrganismos patogênicos gram positivos ou gram negativos, perda de água e eletrólitos, dentre outras. Esta região do organismo é muito irrigada e apresenta muitas terminações nervosas, sendo assim, as lesões apresentadas nesta área corporal apresentam muita sensibilidade e dor.

A proposta do desenvolvimento das formulações apresentadas neste projeto visa reduzir o número de aplicações de medicamentos aos pacientes queimados, diminuir o tempo de cicatrização da área lesada, impedir a contaminação e possibilitar uma melhor qualidade de vida do paciente. A troca diária de curativos busca proteger o paciente de infecções oportunistas e matar os microrganismos que já infectam o local. Assim, este cuidado é imprescindível. Com as formulações propostas, apresentamos uma barreira física hidrofílica frente ao meio externo capaz de hidratar a região queimada (NALBADIAN, 1972; SCHMOLKA, 1972), e ainda favorecer a reepitelização tissular de forma mais rápida do que a convencional (DÍAZ, 1996; GREGORY, 2002; HOHEISEL, 2001; VYNOGRAD, 2000) e oferecer a atividade bactericida e bacteriostática presentes na própolis (SFORCIN, 2000; KUJUMIEV, 1990; FERNANDES, 1995; DOBROWOLSKI, 1991).

Como observado através do extenso levantamento bibliográfico, o extrato de própolis, apresenta diversas atividades biológicas interessantes para o paciente queimado e esta matéria-prima requer uma padronização para que possa originar uma forma farmacêutica que caracterize um medicamento, ou seja, que este produto

futuramente possa passar à escala industrial de forma a preservar as características físico-químicas e biológicas e assim poder proporcionar eficácia e segurança ao paciente.

Tendo como objetivo inicial a padronização do extrato, estudou-se a própolis de diferentes regiões, identificadas como RS, MG, SP e PR com relação às características físico-químicas, químicas e biológicas, permitindo a identificação e quantificação de substâncias, como o DPB, e a verificação de que as amostras utilizadas apresentavam atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*. O marcador (DPB) foi selecionado através da literatura consultada e também em função de ser um constituinte majoritário nas amostras. O DPB se mostrou uma substância muito interessante, em função, principalmente da atividade antimicrobiana frente a microrganismos gram positivos como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis* e também frente a microrganismos gram negativos como a *Escherichia coli* e a *Pseudomonas aeruginosa* (MARCUCCI, et al. 2001), microrganismos freqüentemente encontrados na clínica médica, e responsáveis pelas infecções letais de pacientes com queimaduras de grande extensão (GANG et al, 2000). A quantificação deste constituinte foi realizada por Cromatografia Líquida de alta Eficiência (CLAE) em função da sensibilidade e da reprodutibilidade do método.

Foi possível observar que todas as amostras analisadas apresentavam os parâmetros de qualidade físico-químicos dentro dos limites pré-estabelecidos pelo Regulamento Técnico de Própolis (BRASIL. Ministério da Agricultura. **Instrução Normativa nº 03**, de 19 de janeiro de 2001. Brasília, 2001.), conforme apresentado na Tabela 04. Nota-se que as maiores variações regionais ocorrem com os teores de ceras (máx. 15,733 % m/m $\pm$ 1,466, n=3 e min. 8,587 % m/m $\pm$ 1,270, n=3) e os teores de flavonóides totais (máx. 3,007 % m/m $\pm$ 0,133 e min. 0,845 % m/m $\pm$ 0,038, n=3). A determinação de resíduo seco, ou sólidos solúveis em etanol 96%, nos

dá informação a respeito dos teores de substância extraída da matéria-prima. Assim, esta avaliação mostrou que a própolis do PR apresenta os menores teores (40,900 % m/m $\pm$ 0,614) e a MG os teores mais elevados (52,330 % m/m $\pm$ 1,272).

Tabela 04 –Análises físico-químicas das amostras estudadas PR, SP, RS e MG (resultados expressos em % m/m).

Regiões	PR		SP		RS		MG		Especif.
	média	SEM*	média	SEM*	média	SEM*	média	SEM*	
Umidade	6,333	0,557	5,353	0,104	6,930	0,258	7,013	0,784	Max. 8,000
Cinzas	2,750	0,125	3,640	0,403	2,320	0,329	2,773	0,312	Max. 5,000
Massa Mecânica	31,867	2,567	35,767	1,795	35,200	2,402	31,300	1,127	Max. 40,000
Cera	15,733	1,467	14,433	0,296	9,623	2,293	8,587	1,270	Max. 25,000
Resíduo Seco	45,600	0,700	40,900	0,624	46,600	2,822	52,330	1,272	Min. 35,000
Flavonóides Tot.	0,845	0,038	1,210	0,255	1,243	0,091	3,007	0,133	Min. 0,500
DPB	58,8	0,01	16,04	11,48	0,0	0,0	14,55	5,46	Não especificado

* SEM: Erro padrão da média ($\pm$)

n=3

Após a avaliação dos parâmetros físico-químicos e químicos das amostras e do extenso levantamento bibliográfico sobre as regiões, a empresa produtora da matéria-prima compôs um "blend", ou seja, uma mistura das matérias-primas trituradas, visando otimizar a atividade biológica da própolis. Após esta composição, o lote foi avaliado, como pode ser observado na Tabela 05. A matéria-prima, agora padronizada e de constituição conhecida, foi submetida ao processo de extração hidroalcoólica e

posterior concentração à vácuo e baixas temperaturas para obtenção do extrato glicólico.

Tabela 05 - Parâmetros físico-químicos e quantificação do DPB nos Lotes Padronizados (resultados expressos em % m/m) e no Extrato Glicólico de Própolis empregado neste estudo.

Análises	Amostras Lotes Padronizados		Extrato Glicólico Própolis 30%	
	média	SEM*	média	SEM*
Umidade	6,617	0,187	-	-
Cinzas	2,867	0,249	-	-
Massa Mecânica	29,389	1,918	-	-
Cera	11,902	1,643	-	-
Resíduo Seco	50,967	1,666	30,89	0,800
Flavonóides Totais	2,170	0,253	10,84	0,350
DPB	8,903	2,231	5,713	0,233

* SEM: Erro padrão da média ($\pm$)

n=3

Uma vez padronizada a matéria-prima, com vistas às atividades ora propostas, partiu-se para o desenvolvimento dos géis. Esta etapa envolveu o teste de diversas concentrações do polímero, uma vez que a interação deste com a própolis modificou consideravelmente a viscosidade da formulação. Desta forma, a concentração do polímero suficiente para geleificar em água descrita na literatura foi alterada em função dos ensaios. Testamos o extrato de própolis alcoólico e glicólico, onde constatamos que o glicólico foi o que demonstrou maior facilidade de dispersão. As preparações obtidas empregando-se o extrato alcoólico apresentaram formação de "grumos" e

aumentavam demais a viscosidade das formulações, dificultando sua preparação. O uso de extrato glicólico não dispensou o emprego de agentes de solubilização que facilitaram a obtenção de formulações mais límpidas e estáveis. Foram propostas para acompanhamento e avaliação três formulações, sendo que as únicas variáveis foram a concentração de extrato seco de própolis em cada uma, sendo GEL 01 (1,2%), GEL 02 (2,4%) e GEL 03 (3,6%) e o agente solubilizante. O objetivo das três formulações foi verificar o comportamento físico e atividade terapêutica das mesmas, possibilitando assim uma escolha adequada da melhor formulação para os futuros testes pré-clínicos e clínicos, aplicando-os da melhor forma possível.

Após o desenvolvimento das formulações, preparou-se 1,5 kg de cada gel, sendo que este foi preparado em condições assépticas. Os géis foram envasados em frascos de vidro âmbar e estes foram lacrados com tampa de PVC e lacre de alumínio. O lote preparado possibilitou a realização de todos os ensaios, desde a realização dos estudos de estabilidade acelerada em câmara climática, avaliação reológica, perfil de liberação *in vitro*, avaliação físico-química e microbiológica, restando ainda material para as futuras pesquisas envolvendo os testes de irritabilidade cutânea e eficácia de cicatrização em lesões cirúrgicas em pele de ratos.

As etapas que deram sequência ao desenvolvimento foram a avaliação através de inspeção visual, onde pudemos perceber que o controle (polímero disperso em água), controle 01 (polímero, agente de solubilização em água) e o GEL 01 apresentaram menor viscosidade do que o GEL 02 e 03. As preparações contendo própolis apresentaram coloração âmbar e odor característico. A estabilidade acelerada foi proposta para verificarmos se a termorreversibilidade, teor de própolis e contagem microbiológica se alterariam nas condições de estresse físico aplicados.

4.2 Estudo de estabilidade físico-química das formulações

O estudo envolveu uma inspeção visual onde não constatou-se contaminação microbiana aparente e nem quebra da estrutura do gel durante todo o teste de estabilidade.

Foram avaliados também o pH das formulações, pois grandes oscilações neste parâmetro permitem perceber possíveis alterações qualitativas na constituição química, como degradação e formação de subprodutos bem como crescimento de microrganismos, que poderiam estar se proliferando no meio e alterando assim as condições iniciais dos géis.

4.2.1 Medida do pH

Os valores correspondentes às medidas de pH das formulações durante o teste de estabilidade estão apresentados na Tabela 06, onde podemos perceber que não foram observadas alterações significativas neste parâmetro.

Tabela 06 – Valores de pH dos géis 01, 02 e 03 durante o estudo de estabilidade acelerada.

Amostras	GEL 01	GEL 02	GEL 03
Tempo (meses)	pH		
T0	4,35	4,31	4,33
T1	4,26	4,36	4,31
T2	4,43	4,29	4,19
T3	4,28	4,30	4,23
T6	4,17	4,17	4,21

4.2.2 Teor de Própolis nas formulações

O teor de própolis foi avaliado durante o estudo de estabilidade acelerada. Os resultados (expressos em %) estão apresentados na Figura 06.

Figura 06 - Concentração de própolis (expressos no marcador DPB) nos géis 01, 02 e 03 submetidos ao estudo de estabilidade acelerada, sob as condições de temperatura e umidade drásticas ($40 \pm 2^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ UR) pelo período de 6 meses.

Após a preparação das formulações, observou-se que as amostras que geleificavam não perdiam a termoreversibilidade quando submetidas a mudanças bruscas de temperatura e umidade relativa, mostrando a estabilidade das formulações frente ao estresse físico aplicado. As amostras foram submetidas a um programa de estabilidade acelerada com duração de 6 meses ($40^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ UR), onde pode-se notar que o constituinte estudado (DPB) se manteve estável, ou seja, variando dentro do limite de 10%, estando em conformidade com a regulamentação vigente, como pode ser observado na Figura 06.

4.2.3 Estudo do Comportamento Reológico

Para avaliar as propriedades reológicas das formulações propostas estudou-se a temperatura de transição sol-gel, utilizando-se um reômetro modelo ARES, onde mediu-se o componente elástico (G') em função da variação crescente da Temperatura ($^{\circ}\text{C}$). Na Figura 07, podemos observar que os dois controles e a amostra 01 não apresentam a forma física gel, enquanto as amostras 02 e 03, que apresentam respectivamente 2,4% e 3,6% p/v de extrato seco de própolis geleificam em temperaturas correspondentes a 10°C e 6°C respectivamente. É possível perceber que as duas últimas amostras apresentam o perfil de G' , porém sendo a amostra 03 com um deslocamento da curva para a esquerda, o que é coerente, uma vez que apresenta maior concentração de extrato padronizado de própolis e conseqüentemente maior concentração de sais, aumentando a viscosidade do gel e diminuindo a temperatura de transição (Tabela 07).

Através dos resultados encontrados pode-se observar que as amostras Controle, Controle 01 e o GEL 01 não geleificaram com o aumento da temperatura. Este fato ocorreu em função da concentração do polímero. Porém, observou-se que, mantendo-se a mesma concentração do polímero não-iônico e aumentando-se a concentração de extrato padronizado de própolis, houve geleificação do GEL 02 na temperatura de 10°C e para o GEL 03 na temperatura de 6°C , conforme apresentado na Tabela 07. Isso pode ocorrer em função dos íons presentes na própolis, pois, de acordo com GHISALBERTI (1979), as cinzas obtidas da própolis apresentaram em sua constituição os seguintes íons: ferro, cálcio, alumínio, vanádio, estrôncio e manganês, e, conforme descrito por PANDIT (1998), a presença de íons afeta drasticamente a viscosidade da solução, provavelmente modificando o comportamento de agregação das micelas, que está relacionada à desidratação da cadeia hidrofóbica de polipropileno e maior

compactação da rede micelar (MOORE, 2000). Além disso, a própolis é constituída por uma infinidade de compostos de cadeia longa que poderiam estar modificando o comportamento do polímero. A relação entre concentração de extrato de própolis e viscosidade fica evidente quando observamos que no GEL 01 onde a concentração de própolis é mais baixa, a termorreversibilidade não ocorre nas temperaturas estudadas neste trabalho, ou seja, a geleificação é diretamente proporcional à concentração de substâncias presentes no extrato, que provavelmente interferem no processo de agregação micelar (JAIN, 1998).

Em função da propriedade reológica do gel, é possível explorarmos algumas características com o objetivo de propor uma embalagem que proporcione maior comodidade ao paciente queimado.

O Gel 02 permanece na forma física de solução, quando a baixas temperaturas e geleifica *in situ*, assim, seria interessante propor o desenvolvimento de uma embalagem na forma de spray para proporcionar ao paciente queimado a aplicação da preparação na área afetada sem a utilização de pressão, o que certamente aliviaria a dor da aplicação da medicação convencional.

O Gel 01, não geleifica *in situ* como o Gel 02 e 03, assim, o mesmo poderia ser empregado substituindo ou complementando a terapêutica convencional que utiliza curativos contendo a sulfadizina de prata.

Com relação ao GEL 03, observamos que este apresenta viscosidade mais acentuada que os demais e temperatura de geleificação mais baixa, assim esta formulação não seria a mais apropriada para os pacientes queimados, mas poderia ser empregada para outros casos que requerem as atividades propostas para o produto, quais sejam: antimicrobiana, antiinflamatória, antiviral (herpes genital), cicatrizante, etc. (SFORCIN, 2000; KUJUMGIEV, 1990; FERNANDES, 1995; DOBROWOLSKI, 1991).

Tabela 07: Temperatura de transição sol-gel (°C)

Formulação	Temperatura Transição (°C)
Controle	-
Controle 01	-
Amostra 01	-
Amostra 02	10,0 °C
Amostra 03	6,0 °C

A variação da viscosidade em função da tensão de cisalhamento (0,1 a 500 s⁻¹), na temperatura de 37°C, foi avaliada e pode-se perceber que o material tende a perder a viscosidade com o aumento da taxa de deformação, ou seja, quando aplicado uma força sobre o gel, este deforma-se, o que é desejado, pois possibilita o espalhamento da preparação (Tabela 08 e Figura 08).

Figura 07: Temperatura de transição sol-gel para as amostras estudadas: efeito da presença do extrato de própolis. Módulo elástico, G' (Pa), em função da temperatura na frequência de 1 rad/s ($\square$) controle; ($\circ$) controle 01; (Δ) amostra 1, (∇) amostra 2 e ($\diamond$) amostra 3.

Tabela 08: Valores de viscosidade (Pas) obtida em função das diferentes tensões de cisalhamento (1/s).

Formulação	Tensão de Cisalhamento (s^{-1})				
	0,1	1,0	10	100	500
Controle	256,746	6,47822	0,24265	0,08643	0,07198
Controle 01	433,329	2,55134	0,26513	0,06919	0,06057
Amostra 01	221,057	3,00122	0,06411	0,03411	0,03313
Amostra 02	1497,50	180,619	18,3590	2,07937	0,64763
Amostra 03	1493,79	173,957	17,8610	2,30129	0,73069

Figura 08: Viscosidade medida a 37°C em função da tensão de cisalhamento (■) controle; (●) controle 01; (▲) amostra 1, (▼) amostra 2 e (♦) amostra 3.

Figura 09: Viscosidade em função da temperatura (°C). (□) controle; (○) controle 01; (Δ) amostra 1, (▽) amostra 2 e (◇) amostra 3.

Figura 10: Módulo Elástico, G' (símbolo vazio) e módulo viscoso, G'' (símbolo cheio) a 37°C em função da frequência angular. (■) controle; (●) controle 01; (▲) amostra 1, (▼) amostra 2 e (◆) amostra 3.

Foi possível ainda caracterizar as amostras como viscoelásticas, uma vez que apresentam o módulo viscoso (G'') que caracteriza materiais líquidos e o módulo elástico (G'), que caracteriza materiais sólidos, conforme apresentado na Figura 10.

Considerando que o objetivo da nossa pesquisa é o desenvolvimento de uma forma farmacêutica capaz de sustentar a liberação do fármaco veiculado visando a otimização da terapia do paciente com queimaduras, é imprescindível a avaliação do perfil de liberação *in vitro*.

Estes estudos nos dão informação sobre como a forma farmacêutica desenvolvida disponibiliza a própolis. Considerando ainda que as etapas posteriores envolverão estudos pré-clínicos e clínicos, os estudos *in vitro* constituem uma ferramenta importante, uma vez que servem como "screening" para seleção das formulações a serem submetidas a estes ensaios, uma vez que possuem um custo elevado e são laboriosos.

4.3 Avaliação do perfil de liberação *in vitro*

4.3.1 Liberação *in vitro*

Foram realizados estudos para avaliação do perfil de liberação *in vitro*. Os resultados estão apresentados na Tabela 08 e Figura 11.

Após o desenvolvimento de uma forma farmacêutica, os testes de avaliação do perfil de liberação *in vitro* servem para avaliar a quantidade de fármaco liberado por unidade de tempo.

O sucesso do método para o estudo do perfil de liberação do fármaco *in vitro* é atingido quando as condições experimentais são adequadas, simulando ao máximo as condições *in vivo*, ou seja, temperatura próxima da fisiológica (37°C), agitação homogênea e meio de dissolução adequado levando-se em consideração o pH e a isotonicidade. A escolha do meio de dissolução deve ser criteriosa para garantir a veracidade dos resultados. A metodologia exige ainda que as condições de "sink" sejam atendidas, ou seja, a concentração do fármaco no meio de dissolução não deve exceder a 10 % da sua concentração de saturação.

Os estudos são realizados em um aparelho de dissolução, desenvolvido em nosso laboratório, constituído por uma cuba com banho termostatizado onde estão imersos recipientes contendo o meio receptor e a preparação em estudo. Alíquotas do meio são retiradas em intervalos de tempo pré-estabelecidos, repostas pelo meio limpo e quantificadas por metodologia adequada.

Os resultados obtidos são relacionados em um gráfico de porcentagem de liberação e tempo e, posteriormente serão submetidos a cálculos matemáticos para determinação da cinética de dissolução.

A determinação dos parâmetros cinéticos relacionados aos processos de dissolução permite o conhecimento de detalhes a respeito desse processo. De acordo

com SERRA (1998), os modelos cinéticos aplicáveis aos ensaios de dissolução são: (i) modelo cinético de ordem zero, no qual a velocidade de liberação do fármaco independe da concentração deste na forma farmacêutica, (ii) modelo de primeira ordem, onde o mecanismo de liberação do fármaco está associado à difusão através dos poros do núcleo, (iii) modelo de HIGUCHI, no qual também o mecanismo de liberação do fármaco está associado à difusão dos poros do núcleo, (iv) modelo de HIXON-CROWEL, onde a dissolução do fármaco processa-se independente do pH, do meio e da metodologia empregada. Após análise por regressão linear e cálculo do coeficiente de correlação linear pode-se indicar qual dos modelos propostos melhor se ajusta ao perfil de liberação do fármaco estudado.

Tabela 08 - Resultados obtidos para a liberação da própolis (expressa no marcador DPB, em % de liberação) nas formulações desenvolvidas GEL 01, GEL 02 e GEL 03.

Tempo Formulações	1 hora		12 horas		24 horas	
	$\bar{x}$	SEM*	$\bar{x}$	SEM*	$\bar{x}$	SEM*
Gel 01	8,56	1,53	17,02	1,63	31,30	1,94
Gel 02	9,21	0,88	15,28	0,51	30,56	0,02
Gel 03	7,69	0,73	6,92	0,65	17,31	0,92

* SEM: Erro padrão da média ($\pm$)

n=2

Figura 11 - Perfil de Liberação do marcador DPB a partir dos géis, em função do tempo, em tampão fosfato de sódio pH 7,4 a 37°C. Os dados apresentados correspondem à média $\pm$ desvio padrão da média de duas determinações.

4.3.2 Estudo cinético

Os parâmetros cinéticos calculados estão apresentados na Tabela 09. A comparação dos coeficientes de correlação linear (r) para os dois modelos matemáticos propostos indica que o modelo matemático de ordem zero é o que melhor ajusta-se ao processo de liberação da própolis das formulações estudadas.

Assim, apresentamos os gráficos de liberação *in vitro* para as três formulações propostas, onde podemos observar uma cinética de liberação de ordem zero, ou seja, a liberação do fármaco está sendo controlada pela dissolução do gel e não pelas propriedades e concentração do fármaco, estando estes resultados de acordo com o observado por MOORE, 2000. Alguns autores propõem uma cinética de pseudo ordem-zero, como HIGUCHI (1963), onde a concentração e viscosidade da formulação influenciam diretamente a liberação do fármaco, sendo então a difusão do fármaco

pela preparação o fator limitante. Neste estudo, observamos que houve uma liberação crescente para as três formulações, sendo que a viscosidade da formulação retardou a liberação do fármaco no GEL 03 em relação ao GEL 01 e GEL 02, de acordo com o preconizado pela literatura, onde o gel de maior viscosidade tende a liberar o fármaco mais lentamente, conforme Figura 11. A formação micelar está relacionada à desidratação da cadeia de polioxipropileno (porção apolar) do polímero, através do efeito da temperatura e presença de sais (JAIN, 1998; RICCI, 2002), assim confirmando os nossos resultados onde o gel que apresenta maior concentração de sais e própolis demonstrou maior viscosidade e maior dificuldade de dissolução liberando as substâncias mais lentamente, como pode ser visto através da Tabela 10, análise do parâmetro (r).

Tabela 09 - Parâmetros cinéticos calculados para avaliação do processo de liberação da própolis (expresso no marcador DPB) nas formulações desenvolvidas GEL 01, GEL 02 e GEL 03.

Modelo Estudado	Regressão linear			Modelo de Higuchi		
	Concentração (%) x			Concentração (%) x		
	Tempo (h)			Tempo(h) ^½		
Formulações	a	b	r	a	b	r
Gel 01	0,9917	6,7286	0,9926	5,5716	1,5710	0,9559
Gel 02	0,9335	6,8371	0,9761	5,1484	2,2818	0,9228
Gel 03	0,4250	5,3980	0,8445	2,1652	3,8825	0,7374

4.4 Avaliação Microbiológica

Avaliou-se a contaminação microbiana das formulações submetidas ao estudo de estabilidade acelerada para verificar como as amostras se comportariam diante das condições propostas.

Os resultados demonstraram que as amostras 01 e 03 mantiveram contagem de bactérias totais e fungos totais dentro de condições satisfatórias de contaminação, uma vez que a Farmacopéia Européia VI, 1997, recomenda a contagem máxima de 10^2 UFC/g, como pode ser observado nas Tabelas 10 e 11.

Nenhuma das amostras apresentou presença de microrganismos patogênicos.

Todos os extratos estudados (matéria-prima *in natura*, extrato padronizado e glicólico) apresentaram atividade antimicrobiana.

Tabela 10 – Contagem de Bactérias Totais nas amostras submetidas ao estudo de estabilidade acelerada (UFC/g)

	T0	T1	T2	T3	T6
Controle	<100	-	-	-	17000
Controle 01	<100	-	-	-	67000
GEL 01	<100	<100	<100	<100	<100
GEL 02	<100	<100	<100	<100	1260
GEL 03	<100	<100	<100	<100	70

UFC: unidade formadora de colônia

Tabela 11 – Contagem de Fungos Totais nas amostras submetidas ao estudo de estabilidade acelerada (UFC/g)

	T0	T1	T2	T3	T6
Controle	<100	-	-	-	<100
Controle 01	300	-	-	-	<100
GEL 01	<100	<100	<100	<100	<100
GEL 02	<100	<100	<100	<100	<100
GEL 03	<100	<100	<100	<100	<100

UFC: unidade formadora de colônia

5. Conclusões

Obtivemos como forma farmacêutica de liberação sustentada contendo extrato padronizado de própolis, três géis a base de polímero não-iônico, que diferiram basicamente em função da concentração da substância ativa. Os géis obtidos apresentaram estabilidade físico-química, química e microbiológica frente ao estresse físico aplicado. A propriedade viscoelástica foi atingida para as três propostas, sendo que o GEL 01 não apresentou termorreversibilidade nas temperaturas estudadas. A liberação sustentada foi alcançada para todas as formulações, obtendo-se a cinética de ordem zero para a liberação da própolis. Os géis 01 e 02 foram os mais promissores para o desenvolvimento de uma embalagem que permite uma aplicação sem contato físico com o paciente, uma vez que o GEL 03 apresenta viscosidade e temperatura de geleificação mais baixos do que os demais.

6. Referências Bibliográficas

AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M.; NAKAJIMA, S.H. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, Tokyo, v. 58, p. 945-946, 1994.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN-JÚNIOR, L.V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 6. ed. São Paulo:Premier, 2000. p.318.

ASÍS, M. **Propóleos: el oro púrpura de las abejas**. La Habana:Ed. CIDA, 1989.

ATIASOV, N.I. The use of propolis ointment in the treatment of wounds with granulation: the 10 years experience in the Russian central Hospital for the treatment of burns and scalds. **Apimondia— Standing Commission on beekeeping techonologys and equipment**. Bucharest, 1978, p. 207-208.

AZEVEDO, I. B. S.; SAMPAIO, R.F. Tratamento das escaras de decúbito com própolis. **Rev. Bras. Enf.**, Brasília, v. 39, n. 2/3, p. 33-37, abr./set.,1986.

BANKOVA, V.; NIKOLOVA, N.; MARCUCCI, M. A new lignan from brazilian propolis. **Z. Naturforsch.**, Zeitschrift, v. 51b, p. 735-737, 1996.

BANKOVA, V.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, Paris, v. 31, p. 3-15, 2000.

BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M.C.; POPOV, S. Chemical composition and antibacterial activity of brazilian própolis. **Z. Naturforsch.** Zeitschrift, v. 50c, p. 167-172, 1995.

BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S.; MARCUCCI, M.C.; TSVETKOVA. I.; KUJUMGIEV, A. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. **Fitoterapia**, Milano, v. 70, p. 190-193, 1999.

BANKOVA, V.; MARCUCCI, M.C.; SIMOVA, S.; NIKOLOVA, N.; KUJUMGIEV, A. Antibacterial diterpenic acids from brazilian propolis. **Z. Naturforsch.**, Zeitschrift, v. 51C., p. 277-280, 1996.

BANSKOTA, A.H.; TESUKA, Y.; ADNYANA, I.K.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A.A.G.; KADOTA, S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 72, p.239-246, 2000.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytother. Res.**, London, v. 15, p. 561-571, 2001.

BARICHELO, J.M. ; MORICHITA, M. ; TAKAYAMA, K. ; NAGAI, I. Absorption of insulin from Pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats. **Int. J. Pharm.** Amsterdam. v. 184, p. 189-198, 1999a.

BARICHELO, J.M.; MORISHITA, M.; TAKAYAMA, K.; CHIBA, Y.; TOKIWA, S.; NAGAI, T. Enhanced rectal absorption of insulin-loaded Pluronic F-127 gels containing unsaturated fatty acids. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 183, p. 125-132, 1999b.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Instrução Normativa nº 03**, de 19 de janeiro de 2001. Brasília, 2001.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food Chem. Toxicol.**, London, v. 36, p. 347-363, 1998.

CABANA, A.; AIT-KADI, A.; JUHASZ, J. Study of the gelation process of polyethylene oxide-polypropylene oxide- polyethylene oxide copolymer (poloxamer 407®) aqueous solution. **J. Colloid. Interf. Sci.**, Orlando, v. 190, p. 307-312, 1997.

CETINKALE, O.; SENEL, O.; BULAN, R. The effect of antioxidant therapy on cell-mediated immunity following burn injury in an animal model. **Burns**, Guildford, v. 25, p.113-118, 1999.

CHIEN, Y. **Novel drug delivery systems.** Concepts and system design for rate controlled drug delivery. New York:Marcel Dekker, 1992, p.1-42.

DEMLING, R.H. Medical progress. **The New England Journal of Medicine.** London, v. 313, n. 22, p. 1389-1398,1985.

DESAI, S.D.; BIANCHARD, J. "In vitro" evaluation of pluronic F-127 based controlled release ocular delivery systems for pilocarpine. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 87, p. 226-230, Feb. 1998.

DÍAZ, J.C.Q. Efectos del propóleos en los tratamientos quirúrgicos y las úlceras bucales. **Rev. Cubana Estomatol.**, Habana, v. 33, n. 1, 1996.

DÍAZ, J.C.Q.; RODRIGUEZ, O.A.; VELÁZQUEZ, M.D.; MILIÁN, M.L. Empleo de la tintura de propóleo al 5% em la cura de heridas sépticas faciales. **Rev. Cubana Estomatol.**, Habana, v.34, n. 1, p. 25-27, 1997.

DIMOV, V.; IVANOVSKA, N.; BANKOVA, V.; POPOV, S. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivative. **Vaccine**, London, v. 10, n. 12, p. 817-823, 1992.

DOBROWOLSKI, J.W. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 35, p. 77-82, 1991.

EDSMAN, K.; CARLFORS, J.; PETERSON, R. Rheological evaluation of poloxamer 407® as a in situ gel for ophthalmic use. **Eur. J. Pharm. Sci.**, Amsterdam., v. 6, p.105-112, 1998.

FARMACOPÉIA Brasileira, 4. ed., São Paulo:Atheneu, 1988, pt 1.

FERNANDES. A. Jr.; SUGIZAKI, M.F.; FOGO, M.L.; FUNARI, S.R.C.; LOPES, C.A.M. *In vitro* activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. **J. Venom. Anim. Toxins**, Botucatu, v.1, n. 2, 1995.

FITZPATRICK, L.R.; WANG, J.; LE, T. Caffeic acid phenethyl ester, an inhibitor of nuclear factor- κ B, attenuates bacterial peptidoglycan polysaccharide-induced colitis in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 299, n. 3, p. 915-920, 2001.

FULTS, K.A. ; JOHNSTON, T.P. Sustained release of urease from a poloxamer 407®gel matrix. **J. Parent. Sci. Techn.**, v. 44, n.2, Mar/Apr, 1990.

GANG, R. K.; SANYAL, S.C.; BANG, R.L., MOKADDAS, E.; LARI, A.R. Staphylococcal septicaemia in burns. **Burns**, Guildford, v. 26, p. 359-366, 2000.

GHISALBERTI, E.L. Própolis: a review. **Bee World**, v. 60, p. 59-84, 1979.

GIRAL, T.; MENENDEZ, V.; SANTANA, J.; PORRO, H.; PEÑA, P. Y.; RUIZ, M. Estudio preliminar del empleo del propoleo en el tratamiento del acné. **Cienc. Tec. Apicultura**, Habana, v. 5, p. 17-24, 1985.

GRANGE, J.M.; DAVEY, R.W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **J. R. Soc. Med.**, v. 83, n. 3, p. 159-60, Mar, 1990.

GREGORY, S.R; PICOLLO, N., PICOLLO, M. T.; PICOLLO, M.S.; HEGGERS, J.P. Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: a naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. **J. Altern. Complement. Med.**, New York, v. 8, n. 1, p. 77-83, 2002.

GUTTNER, J.; VECKENSTEDT, A.; HEINECKE, H.; PUSZTAI, R. Effect of quercetin on the course of mengo virus infection in immunodeficient and normal mice. A histological study. **Acta Virol.**, Prague, v. 26, p. 148-155, 1982.

HAGUIND, B.O.; JOSHI, R.; HIMMELSTEIN, K.J. A "*in situ*" gelling system for parenteral delivery. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 41, p. 229-235, 1996.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol. Ther.**, New York, v. 96, p. 67-202, 2002.

HIGUCHI, T. Analysis of rate on the medicament release from ointment. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 51, n. 8, p. 802-4, 1962.

HIGUCHI, T. Mechanism of sustained action medication. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 52, n. 12, p. 1145-9, 1963.

HOEISEL, O. The effects of Herstat⁸ (3% propolis ointment ACF) application in cold sores: a double-blind placebo-controlled clinical trial. **J. Clin. Res.**, v. 4, p.65-75, 2001.

JAIN, N.J.; ASWAL, V.K.; GOYAL, P.S.; BAHADUR, P. Micellar structure of an ethylene oxide-propylene oxide block copolymer: a small-angle neutron scattering study. **J. Phys. Chem. B**, v. 102, p. 8452-8458, 1998.

JENG, S.N.; SHIH, M.K.; KAO, C.M.; LIU, T.Z.; CHIEN, S.C. Antimutagenicity of ethanol extracts of bee glue against environmental mutagens. **Food Chem. Toxicol.**, London, v. 38, p.893-897, 2000.

JOBIN, N.; GARREL, D.R.; CHAMPOUX, J.; BERNIER, J. Improved immune functions with administration of a low-fat diet in a burn animal model. **Cell. Immunol.**, New York, v. 206, p. 71-84, 2000.

JOHNSTON, T.P. ; BERIS, H. ; WOUT, Z.G. ; KENNEDY, J.L. Effects on splenic, hepatic, hematological and growth parameter following high-dose poloxamer 407[®] administration to rats. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam. v. 100, p. 279-284, 1993.

JOHNSTON, T.P. ; PUNJABI, M.A. ; FRELICH, C.J. Sustained delivery of interleukin-2 from a poloxamer 407[®] gel matrix following intraperitoneal injection in mice. **Pharm. Res.**, New York, v. 9, n. 3, p. 425-433, Oct, 1992.

JOHNSTON, T.P.; MILLER, S.C. Inulin disposition following intramuscular administration of na Inulin/ poloxamer 407[®] gel matrix. **J. Parent. Sci. Technol.**, Philadelphia, v. 43, n. 6, Nov-Dec, 1989.

JOHNSTON, T.P.; MILLER, S.C. Toxicological evaluation of poloxamer 407® vehicle for intramuscular use. **J. Parent. Sci. Technol.**, Philadelphia, v. 39, n. 2, Mar/Apr, 1985.

KEDZIA, A.; KALOWSKI, . Estimation of the effectiveness of ethanol extract of propolis on obligate anaerobes of oral cavity. **Czas Stomatol.**, v. 41, n. 12, p. 757-62, Dec, 1988.

KIMOTO, T.; AGA, M.; HINO, K.; KOYA-MIYATA, S.; YAMAMOTO, Y.; MICALLEF, M.J.; HANAYA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Apoptosis of human leukemia cells induced by artemisinin C, an active ingredient of brazilian propolis. **Anticancer Res.**, Attiki, v. 21, p. 221-228, 2001.

KIMOTO, T.; KOYA, S.; HINO, K.; YAMAMOTO, Y.; NOMURA, Y.; MICALLEF, M.J.; HANAYA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Renal carcinogenesis induced by ferric nitriloacetate in mice, and protection from it by Brazilian propolis and Artemisinin C. **Pathol. Int.**, Victoria, v. 50, p. 679-689, 2000.

KIN, S.Y. ; HÁ, J.C. ; LEE, Y.M. Poly(ethylene oxide)- poly(propylene oxide)- poly(ethylene oxide)/ poly(caprolactone) (PCL) amphiphilic block copolymeric nanospheres. II Thermo responsive behaviour. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 65, p. 345-358, 2000.

KOO, H.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; BOWEN, H. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. **Antimicrobial Agents Chemother.**, Detroit, p. 1302-1309, May, 2002.

KOO, H.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; SATTLER, A. Effect of *Apis mellifera* propolis from two brazilian regions on caries development in desalivated rats. **Caries Res.**, Basel, v. 33, p. 393-400, 1999.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, YU; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 64, p. 235-240, 1999.

KUTTAN, R.; DONNELLY, P.V.; DI FERRANTE, N. Collagen treated with (+)-catechin becomes resistant to the action of mammalian collagenase. **Experientia**, Basel, v. 37, p. 221-223, 1981.

LAZARUS, J.; COOPER, J. Absorption, testing and clinical evaluation of oral prolonged action drug. **J. Pharm. Sci.**, Amsterdam, v. 50, p. 215-232, 1961.

LI, C. ; PALMER, W.K. ; JOHNSTON, T.P. Disposition of poloxamer 407® in rats following a single intraperitoneal injection assessed using a simplified colorimetric assay. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v. 14, p. 659-665, 1996.

MADAN, P.L. Sustained release drug delivery systems: Part I, An overview. **Pharm Manuf.**, Surrey, p. 23-7, Feb. 1985.

MAGRO-FILHO, O. ; de CARVALHO, A.C. Application of propolis to dental sockets and skin wounds. **J. Nihon Univ. Sch. Dent.**, v. 32, p. 4-13, 1990.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, Paris, v.26, p. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M.C.; BANKOVA, V. Chemical composition, plant origin and biological activity of brazilian propolis. **Curr. topics Phytochem.**, v. 2, p.115-123, 1999.

MARCUCCI, M.C., CAMARGO, F.A., LOPES, M.A. Identification of amino acids in brazilian propolis. **Z. Naturforsch.**, Zeitschrift, v. 51C, p. 11-14, 1996.

MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V.S.; DE CASTRO S.L.; DANTAS, A.P.; VALENTE, P.H.M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from brazilian propolis with pharmacological activities. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 74, p. 105 – 112, 2001.

MARCUCCI, M.C.; RODRIGUEZ, J.; FERRERES, F.; BANKOVA, V. Chemical composition of brazilian propolis from Sao Paulo State. **Z. Naturforsch.**, Zeitschrift, v. 53c, p. 117-119, 1998.

MARTINS, R.S.; PEREIRA, E.S.J.; LIMA JR., S.M.; SENNA, M.I.B.; MESQUITA, R.A.; SANTOS, V.R. Effect of commercial ethanol propolis extract on the *in vitro* growth of *Candida albicans* collected from HIV-seropositive and HIV-seronegative Brazilian patients with oral candidiasis. **J. Oral Sci.**, Tokyo, v. 44, n. 1, p. 41-48, 2002.

MOORE, T.; CROY, S.; MALLAPRAGADA, S.; PANDIT, N. Experimental investigation and mathematical modeling of Pluronic F-127 gel dissolution: drug release in stirred system. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 67, p. 191-202, 2000.

MORALES, W. F. Empleo del propoleos en las clinicas medicas y quirurgicas – parte II, **Apiter**, Montevideo, p.1-16, 1994.

MORALES, W. F. Propiedades terapeuticas del propoleos – puesta al dia – parte I, **Apiter**, Montevideo, p.1-16, 1994.

MURESAN, E. The use of propolis spray for treating burns induced experimentally in guinea pigs. **Apimondia – Standing Commission on beekeeping techonologys and equipment.**, Bucharest, p. 189-191, 1978.

NALBANDIAN, R.M.; HENRY, R.L.; BALKO, K.W.; ADAMS, D.V.; NEUMAN, N.R. Pluronic F-127 gel preparation as an artificial skin in the treatment of third-degree burns in pigs. **J. Biomed. Mater. Res.**, Detroit, v. 21, p.1135-1148, 1987.

NALBANDIAN, R.M.; HENRY, R.L.; WILKS, H.S. Artificial skin. II. Pluronic F-127 silver nitrate or silver lactate gel in the treatment of thermal burns. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v. 6, p. 583-590, 1972.

PAAVOLA, A.; TARKILA, P.; XU, M.; WAHLSTROM, T.; YLIRUUSI, J.; ROSENBERG, P. Controlled release gel of ibuprofen and lidocaine in epidural use – analgesia ad systemic absorption in pigs. **Pharm. Res.**, New York, v. 15, n. 3, p.482-487, Dec. 1998a.

PAAVOLA, A., YLIRUUSI, J., ROSENBERG, P. Controlled and dura mater permeability of lidocaine and ibuprofen from injectable poloxamer bases gels. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 52, p. 169-178, 1998 b.

PAAVOLA, A.; YLIRUUSI, J.; KAJIMOTO, Y.; KALSO, K.; WAHLSTROM, T.; ROSENBERG, P. Controlled release of lidocaine from injectable gels and efficacy in rat sciatic nerve block. **Pharm. Res.**, New York, v.12, n.12, p.1997-2002, Aug, 1995.

PAAVOLA, A., KILPELAINE, I., YLIRUUSI, J., ROSENBERG, P. Controlled release injectable liposomal gel of ibuprofen for epidural analgesia. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 199, p. 85-93, 2000.

PANDIT, N.K., WANG, D., Salt effects on the diffusion and release rate of propranolol from poloxamer 407® gels. **Int. J. Pharm**, Amsterdam, v.167, p. 183-189, 1998.

PARK, Y.K., IKEGAKI, M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, Tokyo, v. 62, n. 11, p. 2230-2232, 1998.

PARK, Y.K., KOO, M.H., IKEGAKI, M., CURY, J.A., ROSALEN, P.L. Effects of propolis on *Streptococcus mutans*, *Actinomyces maeslundii* and *Staphylococcus aureus*. **Rev. Microbil.**, São Paulo, v. 29, p. 143-148, 1998.

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL. Maria Cristina Marcucci Ribeiro. **Processo de identificação de tipagem da própolis Brasileira**. BR n. PI 0006272-3, 22 dez. 2002.

PEC, A.E.; WOUT, Z.G; JOHNSTON, T.P. Biologycal activity os urease formulated in poloxamer 407 after intraperitoneal injection in the rats. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 81, n.7, p.626-630, Jul. 1992.

RAJAN, P.; VEDERNIKOVA, I.; COS, P.; BERGHE, D.V.; AUGUSTYNS, K.; HAEMERS, A.; Synthesis and evaluation of caffeic acid amides as antioxidants. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, Oxford, v. 11, p. 215-217, 2001.

REIS, C.M.F., et al., Atividade antiinflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis. **Revis. Brás. Farmacogn.**, São Paulo, v. 9/10, p.43-52, 2000.

RICCI, E.J.; BENTLEY, M.V.L.B.; FARAH, M.; BRETAS, R.E.S.; MARCHETTI, J.M. Rheological characterization of poloxamer 407® lidocaine hydrochloride gels. **Eur. J. Pharm. Sci.**, Amsterdam, v. 17, p. 161-167, 2002.

RIEGER, M.M. Teste para estabilidade de macroemulsões. **Cosmet. & Toilet.** (Ed. em Português), v. 8, p. 47-53, Set./Out., 1996.

SAFWAT, S.M. Drug release from Pluronic gels. **Bull. Pharm. Sci. Asswit Univ.** v. 17, n.1, p.41-48, 1994.

SCHERLUND, M., MALMSTEN, M.; BRODIN, A. Stabilization of a thermosetting emulsions system using ionic and nonionic surfactants. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 173, p. 103-116, 1998.

SCHERLUND, M.; MALMSTEN, M.; HOLMQVIST, P.; BRODIN, A. Thermosetting microemulsions and mixed micellar solutions as drug delivery systems for periodontal anesthesia. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 194, p. 103-116, 2000.

SCHMOLKA, I.V. Artificial Skin I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels of treatment of Burns. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v. 6, p.571-82, 1972.

SFORCIN, J.M., FERNANDES JR. A., LOPES, C.A.M., BANKOVA, V., FUNARI, S.R.C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 73, p. 243-249, 2000.

SFORCIN, J.M.; NOVELLI, E.L.B.; FUNARI, S.R.C. Seasonal effect of Brazilian propolis on seric biochemical variables. **J. Venom. Toxins**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 244-254, 2002.

SHIN, S.; CHO, C.; OH, I. Enhanced efficacy by percutaneous absorption of piroxicam from the poloxamer gel in rats. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 193, p.213-218, 2000.

SILVEIRA, G.M.; GODOY, A.G.; TORRIENTE, R.O.; ORTIZ, M.C.P.; CUÉLLAR, M.A.F. Estudio preliminary sobre los efectos del propalan en el tratamiento de la gingivitis

crónica y de las úlceras bucales. **Rev. Cubana Estomatol.**, Habana, v. 25, n. 3, sep.-dec., p.36-44, 1988.

TAKAISI-KIKUNI, N.B. and SCHILCHER, H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. **Planta Med.**, 60, p. 222-227, 1994.

TAYEL, S.; OSMAN, A. Formulation and evaluation of piroxicam gels. **Egypt J. Pharm. Sci.**, v. 36, n.1-6, p.1-14, 1995.

TILL, V., THIELMANN, K. Pathobiochemie. 2 nd ed. Weinheim:VCH Verlag, 1989.

TOBÍO, M. ; NOLLEY, J. ; GUO, Y. ; McIVER, J. ; ALONSO, M.J. A novel system based on poloxamer/PLGA blend as a tetanus toxoid delivery vehicle. **Pharm. Res.**, New York, v. 16, n. 5, p. 682-687, 1999.

TROSHEV, K.; KOZAREV, I.; MARKOV, D. Regulation of traumatic skin wound healing by influencing the process in the neighbouring zone of the wound. **Acta Chir. Plast.**, v. 32, n. 3, p.152-163, 1990.

TSAKOFF, T. Study of the local anaesthetic characteristics of propolis and their effect in operations on sheep and dogs. **Apimondia**, Bucharest, p. 67-71, 1978.

UTO, Y.; HIRATA, A.; FUJITA, T.; TAKUBO, S.; NAGASAWA, H.; HORI, H. First total synthesis of artemisinic acid established by o,o'-diprenylation of p-halophenols in water. **J. Org. Chem.**, Japan, v. 67, p.2355-2357, 2002.

VALDEZ, G.; RUÍZ, M.; MARTÍN, M. **Características de los propóleos de los municipios Mariel y Madruga de la provincia La Habana**. Memorias del I Simposio sobre los Efectos del Propóleos en la Salud Humana y Animal. Varadero:Editora, 1988 p. 28..

VEYRIES, M.L.; COUARRAZE, G.; GEIGER, S.; AGNELY, Y.F.; MASSIAS, L.; KUNZLI, B.; FAURISSON, F.; ROUVEIX, B. Controlled release of vancomycin from poloxamer 407 gels. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.192, p.183-193, 1999.

VYNOGRAD, N.; VYNOGRAD, I.; SOSNOWSKI, Z. A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). **Phytomedicine**, v. 7, n.1, p.1-6, 2000.

WAHL, L.M.; CORCORAN, M.E.; MERGENHAGEN, S.E.; FINBLOOM, D.S. Inhibition of phospholipase activity in human monocytes by IFN- γ blocks endogenous prostaglandin E₂-dependent collagenase production. **J. Immunol.**, v.144, p.3518-3522, 1990.

WANG, P, AND JOHNSTON, T.P. Kinetics os sol-to-gel transition for poloxamer 407® polyols. **J. Appl. Polymer Sci.**, v. 43, p. 283-292, 1991.

WANG, P. & JOHNSTON, T.P. Enhanced stability of two model proteins in na agitable solution enviroment using poloxamer. **J. Parent. Sci. Technol.**, v. 47, n.4, Jul./Aug., 1993.

WOISKY, R.G.R. **Métodos de controle químico de amostras de própolis.** Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1996.

ZHAO, X.; GU, Z.; ATTELE, A.S.; YUAN, C.S. Effects of quercetin on the release of endothelin, prostacyclin and tissue plasminogen activator from human endothelial cells in culture. **J. Ethonopharmacol.**, v. 67,p. 279-285, 1999.