UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de formulações tópicas fotoquimioprotetoras contendo extrato de própolis: estudos de estabilidade, permeação e retenção cutânea *in vitro* e de eficácia *in vivo*

Franciane Marquete de Oliveira

Ribeirão Preto
2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de formulações tópicas fotoquimioprotetoras contendo
extrato de própolis: estudos de estabilidade, permeação e retenção cutânea
in vitro e de eficácia *in vivo***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientada: Franciane Marquele de Oliveira

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria José Vieira
Fonseca

Ribeirão Preto
2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Marquele-Oliveira, Franciane

Desenvolvimento de formulações tópicas fotoquimioprotetoras contendo extrato de própolis: estudos de estabilidade, permeação e retenção cutânea *in vitro* e de eficácia *in vivo*
155 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Fonseca, Maria José Vieira

1. Extrato de Própolis. 2. Desenvolvimento de Formulações fotoquimioproteoras. 3. Atividade antioxidante

FOLHA DE APROVAÇÃO

Franciane Marquede de Oliveira

Desenvolvimento de formulações tópicas fotoquimioprotetoras contendo extrato de própolis: estudos de estabilidade, permeação e retenção cutânea *in vitro* e de eficácia *in vivo*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria José Vieira Fonseca

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho à minha
filhinha Clara, ao meu marido
Anderson e à toda minha
família querida.*

Agradecimentos Especiais

Agradeço a Deus por minha vida e pelas pessoas maravilhosas que Ele permite estarem perto de mim, pessoas estas que tornam minha vida cada dia mais feliz;

Agradeço do fundo do meu coração aos meus pais queridos que sempre estiveram lutando e torcendo por mim. Agradeço à minha mãe Yone por sua bondade, dedicação e perseverança, ao meu pai Luiz por sua força e alegria. ã vocês minha eterna gratidão. “Amo vocês”;

Agradeço também muito aos meus irmãos, ao Evandro, por seu otimismo e garra, à Viviane, por sua amizade e compreensão e à Daiane por sua alegria e carinho. Agradeço à vocês por estarem sempre do meu lado e por me darem tanto apoio;

Ao meu marido Anderson, tenho um agradecimento especial, muito obrigada por estar presente na minha vida, por seu amor e por ser esta pessoa tão dedicada e companheira. Mas, acima de tudo, muito obrigada por dividir comigo o nosso bem mais precioso, nossa querida filha Clara, que inesperadamente nos trouxe um novo sentido para viver. “Eu te amo”;

*“Nossos olhos tiveram a mesma culpa, os seus porque me olharam,
os meus porque te quiseram”.*

Agradeço enormemente à minha orientadora Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca, mais conhecida como Zezé. Primeiramente, muito obrigada por ter acreditado em mim, apesar de não me conhecer e por eu ter vindo de uma faculdade privada (que muitas vezes é

um empecilho). Eu me lembro até hoje do dia em que nos conhecemos e você disse que apesar de estar com muitos pós-graduandos, você aceitaria me orientar na Pós-graduação. Muito obrigada por me dar a chance de trilhar este caminho que culminou na geração deste trabalho tão importante para mim. Também agradeço pela dedicação, pelos ensinamentos e por todos os momentos que compartilhamos, sendo eles alegres ou difíceis, pois acredito que cresci muito como pessoa neste período. Muito obrigada por tudo!

Agradecimentos

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por ter me dado a oportunidade de realizar esse projeto;

Ao nosso grupo de pesquisa Ana Luiza, Carla, Fabiana, Fátima, Helaine, Rúbia, Simone, Sandra, Valéria e Viviane por todos os momentos que vivemos juntos;

À grande amiga Yris por sua sincera amizade e generosidade e, por estar sempre me apoiando;

Aos grandes amigos que me apoiaram nestes anos de pesquisa: Bianca, Karen, Igor, Daniellle e Fernando;

Aos técnicos Jabor e Cenzi pelo apoio em todos momentos;

À prof^a. Dr^a. Pierina Sueli Bonato, pelo auxílio no desenvolvimento e padronização da metodologia analítica, e por ter me cedido a utilização de equipamentos;

Aos Professores, Osvaldo de Freitas, Maria Vitória V. Bentley e Yara L. Valim por terem me cedido a utilização de equipamentos imprescindíveis para a realização deste trabalho;

Ao funcionários da seção de Pós-Graduação da FCFRP-USP, Rosana, Ana e Eleni;

À CAPES pelo auxílio financeiro concedido na forma de bolsa de estudo.

RESUMO

MARQUELE-OLIVEIRA, F. **Desenvolvimento de formulações tópicas fotoquimioprotetoras contendo extrato de própolis: estudos de estabilidade, permeação e retenção cutânea *in vitro* e de eficácia *in vivo***. 2007. 155 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

A exposição à radiação ultravioleta (RUV) pode levar a um desequilíbrio no balanço oxidante/antioxidante da pele causando prejuízos à sua integridade e levando a diversas alterações, entre as quais o envelhecimento precoce e o câncer de pele. Na tentativa de diminuir os efeitos biológicos mediados pelos radicais livres gerados pela RUV na pele, tem sido proposto a fotoquimioproteção com a utilização de antioxidantes tópicos. Dentre a gama de compostos disponíveis para serem empregados na fotoquimioproteção, a própolis, por sua pronunciada atividade antioxidante, entre suas inúmeras atividades biológicas, é uma matéria-prima com promissora ação tópica. Desta forma, extratos de própolis alcoólico e glicólico (EPA e EPG) foram caracterizados quanto à sua composição polifenólica e quanto à sua capacidade antioxidante frente a diversos radicais livres. Formulações adicionadas destes extratos foram desenvolvidas e submetidas a estudos de estabilidade física e funcional, estudos de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro*, bem como estudos preliminares de eficácia *in vivo*. Os resultados demonstraram que os extratos de própolis são capazes de sequestrar eficientemente diversos radicais livres, principalmente radicais superóxido. Quando estes extratos foram adicionados em formulações de produtos para uso tópico, a atividade antioxidante foi mantida. Nos estudos prévios de estabilidade física foi observado que as formulações mais estáveis foram desenvolvidas com Hostacerin[®] SAF (menor conteúdo graxo) e Polawax[®] (maior conteúdo graxo). No entanto, somente a formulação desenvolvida com Polawax[®] apresentou estabilidade satisfatória por 1 ano quando armazenada à temperatura ambiente e a 40°C $\pm$ 2°C/70%UR $\pm$ 5%. Nos estudos de liberação, permeação e retenção cutânea foi observado a influência do conteúdo graxo na performance das formulações. A cinética de liberação das formulações tanto do ácido *p*-cumárico (utilizado como marcador), como dos compostos equivalentes ao extrato de própolis (EEP) demonstraram seguir o modelo de Higuchi. A formulação desenvolvida com Polawax[®] apresentou a melhor retenção cutânea, com retenção de 0,013 e 0,030 μ L de EEP.cm⁻² para as peles de camundongo e de porco, respectivamente. Em adição, esta formulação apresentou baixos níveis de permeação cutânea, sendo adequada para aplicação tópica fotoquimioprotetora. Nos estudos *in vivo*, esta formulação adicionada de EPA, foi capaz de diminuir o eritema, inibir o edema e aumentar a cicatrização de camundongos sem pêlo expostos à radiação UVB. Além disso, também foi observado a proteção da depleção da glutathiona endógena (GSH). Os resultados preliminares de eficácia *in vivo* sugerem que formulações contendo o extrato de própolis apresentam boas perspectivas para serem utilizadas para prevenir e tratar os danos causados na pele pela radiação UV.

Palavras chave: Própolis, Atividade Antioxidante, Fotoquimioproteção, Formulações Tópicas, Permeação Cutânea.

ABSTRACT

MARQUELE-OLIVEIRA, F. **Development of photochemoprotective topical formulations containing propolis extract: *in vitro* stability, permeation and retention and *in vivo* efficacy studies.** 2007. 155 p. Thesis (Doctoral Degree). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

The ultraviolet radiation (UVR) exposition may lead to the skin oxidant/antioxidant imbalance injuring its integrity and leading to several disorders, such as ageing and skin cancer. In order to improve the biological effects caused by free radicals generated by UVR in skin, it has been suggested the photochemoprotection by using topical antioxidants. Among the available compounds to be employed in photochemoprotection, propolis, due to its important antioxidant activity, among its innumerable biological activities, is a promising topical raw-material. Next, ethanolic and glycolic propolis extracts (EPE, GPE) were characterized in relation to their polyphenolic composition, and in relation to their antioxidant activity against several free-radicals. Formulations added with these extracts were developed and undergone to physical and functional stability studies, *in vitro* release and skin permeation and retention studies, as well as *in vivo* preliminary efficacy studies. The results showed that the propolis extracts are able to scavenge several free radicals efficiently, mainly superoxide radicals. When these extracts were added to formulations of topical products, their antioxidant activity were maintained. In the physical stability studies, it was observed that the most stable formulations were developed with Hostacerin[®] SAF (lower fat content) and Polawax[®] (higher fat content). However, only the formulation developed with Polawax[®] showed satisfactory stability for 1 year stored at room temperature and at 40°C ± 2°C/70%UR ± 5%UR. In the release, permeation and retention studies, it was observed the fat content influence in the formulation performance. The release profile of *p*-coumaric acid (used as marker compound) and the compounds equivalent to propolis extract (EPE) followed the Higuchi model. The formulation developed with Polawax[®] showed the best skin retention, retaining 0,013 and 0,030 µL EPE.cm⁻² in hairless mouse skin and in pig skin, respectively. In addition, this formulation presented low permeation, which is desired for photochemoprotective topical employment. In the *in vivo* studies, this formulation added with EPE was able to diminish erythema, inhibit oedema and increase cicatrization in hairless mice exposed to UVB radiation. In addition, it was also observed the protection of the endogenous glutathione (GSH) depletion. The *in vivo* preliminary efficacy results suggest that formulations added with propolis extract present good perspectives to be employed to prevent and treat the injuries caused in skin by UV radiation.

Keywords: Propolis, Antioxidant Activity, Photochemoprotection, Topical Formulations, Percutaneous absorption.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 – Ação dos agentes fotoquimioprotetores na pele. Adaptado de AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005.	6
Figura 2 – Alterações que podem ocorrer nas emulsões: Coalescência, Flocculação; Cremeação. Disponível em: < http://www.agsci.ubc.ca/courses/fnh/410/emulsify/4_14.htm >. Acesso em 20 Fev. 2006. Palavra chave: creaming.	12
Figura 3 – Estrutura da pele. Adaptado de imagem disponível em: < http://www.nurse-prescriber.co.uk/education/visual_lib/vl_skincondprep.htm >. Acesso em 10 Jan. 2006. Palavra chave: skin layers.	15
Figura 4 – Mecanismos de penetração na pele. Adaptado de imagem disponível em: < http://www.ijpr-online.com/Docs/20041/IJPR226.htm >. Acesso em 20 Fev. 2006. Palavra chave: skin.	17
Figura 5 – Estrutura do ácido <i>p</i>-cumárico. Adaptado de imagem disponível em: < http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/jsp/common/PhysicalProperties.jsp > U.S. National Library of Medicine – Chemical information, Acesso em 10 Jan 2006. Palavra chave: coumaric-acid.	43
Figura 6 – Célula de difusão tipo Franz modificada.	54
Figura 7 – Compartimento de madeira contendo a fonte de luz UVB utilizado nos experimentos de indução de estresse oxidativo na pele de camundongos sem pêlo. 1: tampa superior; 2: lâmpada UVB; 3: tampa frontal; 4: local para ventilação; 5: acionamento da lâmpada UVB.	61
Figura 8 – Representação da avaliação da formação do eritema nos animais expostos à radiação UVB por 2, 4 e 6 minutos. Animal com a fita plástica durante a exposição à radiação UVB.	62
Figura 9 – Medida da atividade inibidora da peroxidação lipídica pelo extrato de própolis alcoólico. As concentrações finais do extrato de própolis no meio reacional foram: 0,00625; 0,0125; 0,02; 0,025; 0,03; 0,04; 0,05 e 0,1 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações.	70
Figura 10 – Medida da atividade inibidora da peroxidação lipídica pelo extrato de própolis glicólico. As concentrações finais de extrato de própolis no meio reacional foram: 0,00625; 0,0125; 0,02; 0,025; 0,03; 0,04; 0,05 e 0,1 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações.	70
Figura 11 – Faixa de linearidade no método de medida da atividade inibidora da peroxidação lipídica pelos extratos de própolis alcoólico e glicólico. (A) As concentrações finais do extrato de própolis alcoólico no meio reacional foram: 0,0125; 0,02; 0,025; 0,03; 0,04 e 0,05 $\mu\text{L mL}^{-1}$; (B) As concentrações finais do extrato de própolis glicólico no meio reacional foram: 0,0125; 0,02; 0,025; 0,03; 0,04 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações.	71
Figura 12 – Medida da atividade inibidora da degradação da deoxirribose pelo extrato de própolis alcoólico. As concentrações finais de extrato de própolis no meio reacional foram: 0,0125; 0,025; 0,04; 0,05; 0,06; 0,08; 0,1 e 0,2 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações.	74
Figura 13 – Medida da atividade inibidora da degradação da deoxirribose pelo extrato de própolis glicólico. As concentrações finais de extrato de própolis no meio reacional foram: 0,0125; 0,025; 0,04; 0,05; 0,06; 0,08; 0,1 e 0,2 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações.	75

- Figura 14 – Faixa de linearidade no método de medida da atividade inibidora da degradação da deoxirribose pelos extratos de própolis alcoólico e glicólico.** (A) As concentrações finais do extrato de própolis alcoólico no meio reacional foram: 0,04; 0,05; 0,06; 0,08 e 0,1 $\mu\text{L mL}^{-1}$. (B) As concentrações finais de extrato de própolis glicólico no meio reacional foram: 0,025; 0,4; 0,05; 0,06 e 0,08 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações. 75
- Figura 15 – Medida da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD pelo extrato de própolis alcoólico.** As concentrações finais de extrato de própolis no meio reacional foram: 0,15; 0,075; 0,045; 0,037; 0,029; 0,019; 0,009 e 0,005 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações. 78
- Figura 16 – Medida da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD pelos extratos de própolis glicólico.** As concentrações finais de extrato de própolis no meio reacional foram: 0,15; 0,075; 0,045; 0,037; 0,029; 0,019; 0,009 e 0,005 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações. 78
- Figura 17 – Faixa de linearidade no método de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD pelos extrato de própolis alcoólico e glicólico.** As concentrações finais dos extratos de própolis no meio reacional foram: 0,005; 0,009; 0,019 e 0,029 $\mu\text{L mL}^{-1}$. (A) Extrato de própolis alcoólico e (B) Extrato de própolis glicólico. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações. 79
- Figura 18 – Medida da inibição da quimioluminescência gerada no sistema H_2O_2 /luminol/HRP pelo extrato de própolis alcoólico.** As concentrações finais de extrato de própolis no meio reacional foram 0,4; 0,3; 0,2; 0,15 e 0,1 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações. 81
- Figura 19 – Medida da inibição da quimioluminescência gerada no sistema H_2O_2 /luminol/HRP pelo extrato de própolis glicólico.** As concentrações finais de extrato de própolis no meio reacional foram: 0,4; 0,3; 0,2; 0,15 e 0,1 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações. 82
- Figura 20– Faixa de linearidade no método de inibição da quimioluminescência gerada no sistema H_2O_2 /luminol/HRP pelos extratos de própolis alcoólico e glicólico.** As concentrações finais de extrato de própolis no meio reacional foram: 0,1; 0,15; 0,2 e 0,3 $\mu\text{L mL}^{-1}$. (A) Extrato de própolis alcoólico e (B) Extrato de própolis glicólico. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações. 82
- Figura 21 – Variação do pH das formulações armazenadas à temperatura ambiente: (A) Formulação 1; (B) Formulação 2.** As análises foram realizadas com as formulações estocadas em temperatura ambiente por 12 meses. Os resultados representam a média de duas determinações. F1/F2 B: formulação 1 ou 2 base; F1/F2 EPA: formulação 1 ou 2 com extrato de própolis alcoólico; F1/F2 EPG: formulação 1 ou 2 com extrato de própolis glicólico. 92
- Figura 22 – Variação do pH das formulações armazenadas a $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/70\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$.** (A) Formulação 1; (B) Formulação 2. As análises foram realizadas com as formulações estocadas a $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/70\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$ por 12 meses. Os resultados representam a média de duas determinações. F1/F2 B: formulação 1 ou 2 base; F1/F2 EPA: formulação 1 ou 2 com extrato de própolis alcoólico; F1/F2 EPG: formulação 1 ou 2 com extrato de própolis glicólico. 93
- Figura 23 - Área média das gotículas das formulações armazenadas à temperatura ambiente.** (A) Formulação 1; (B) Formulação 2. As análises foram realizadas com as formulações estocadas à temperatura ambiente por 12 meses. Os resultados representam a média de 15 determinações $\pm$ erro padrão da média. F1/F2 Base: formulação 1 ou 2 base (sem extrato); F1/F2 EPA: formulação 1 ou 2 com extrato de própolis alcoólico; F1/F2 EPG: formulação 1 ou 2 com extrato de própolis glicólico. 95
- Figura 24 - Área média das gotículas das formulações armazenadas a $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/70\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$.** (A) Formulação 1; (B) Formulação 2. As análises foram realizadas com as formulações estocadas a $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/70\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$ por 12 meses. Os resultados representam a média de 15 determinações $\pm$ erro padrão da média. F1/F2 Base: formulação 1 ou 2 base; F1/F2 EPA: formulação 1 ou 2 com extrato de própolis alcoólico; F1/F2 EPG: formulação 1 ou 2 com extrato de própolis glicólico. 96

- Figura 25 – Inibição da peroxidação lipídica induzida por Fe^{2+} na presença de extratos de própolis e formulações adicionadas destes extratos.** A metodologia foi realizada de acordo com o item 3.2.3.2.2.1.1. F1: Formulação 1, F2: Formulação 2. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações. * Significativo $p \leq 0,05$ (Student t-test). 99
- Figura 26 – Inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD na presença de extratos de própolis e formulações adicionadas destes extratos.** A metodologia foi realizada de acordo com o item 3.2.3.2.2.1.3. F1: Formulação 1, F2 : Formulação 2. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações. 101
- Figura 27 – Estabilidade da atividade antioxidante dos EPA e EPG utilizando o método de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD. (A) TA, (B) $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/70\% \text{UR} \pm 5\% \text{UR}$.** Os extratos de própolis foram armazenados por 1 ano e foram diluídos obtendo no meio reacional concentrações de 0,075 e 0,019 $\mu\text{L mL}^{-1}$. A linha simples se refere à curva de tendência. Os resultados representam a média de 3 determinações $\pm$ desvio padrão da média. 103
- Figura 28 – Estabilidade da atividade antioxidante da formulação 1, utilizando o método de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD. – A) TA, B) $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/70\% \text{UR} \pm 5\% \text{UR}$.** As formulações (F1) adicionadas dos extratos de própolis EPA e EPG foram armazenadas por 1 ano e foram diluídas rendendo no meio reacional concentrações de 0,075 e 0,019 $\mu\text{L mL}^{-1}$. A linha simples se refere à curva de tendência. Os resultados representam a média de 3 determinações $\pm$ desvio padrão da média. 104
- Figura 29 – Estabilidade da atividade antioxidante da formulação 2 utilizando o método de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD. – A) TA, B) $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/70\% \text{UR} \pm 5\% \text{UR}$** As formulações adicionadas dos extratos de própolis EPA e EPG foram armazenadas por 1 ano e foram diluídas rendendo no meio reacional concentrações de 0,075 e 0,019 $\mu\text{L mL}^{-1}$. A linha simples se refere à curva de tendência. Os resultados representam a média de 3 determinações $\pm$ desvio padrão da média. 105
- Figura 30 -Cromatogramas referentes a análise do ácido *p*-cumárico.** A) Padrão. B) Extrato de própolis diluído 1000 vezes em metanol. 1-Ácido *p*-cumárico. 108
- Figura 31 – Faixa de linearidade do método cromatográfico de separação do ácido *p*-cumárico.** Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos realizados em paralelo. 109
- Figura 32- Cromatogramas referentes a formulação 1.** A) Solução receptora após 6 horas de liberação da F1 Base; B) Solução receptora após 6 horas de liberação da F1 adicionada de EPA. 1-Ácido *p*-cumárico. 111
- Figura 33 –Cromatogramas referentes à formulação 2.** A) Solução receptora após 6 horas de liberação da F2 Base; B) Solução receptora após 6 horas de liberação da F2 adicionada de EPA. 1-Ácido *p*-cumárico. 111
- Figura 34 – Faixa de linearidade do método de inibição da quimioluminescência usando o método xantina/luminol/XOD pelo extrato de própolis alcoólico.** Resultados são a média $\pm$ erro padrão de três experimentos realizados em paralelo. 113
- Figura 35 - Inibição da quimioluminescência usando o método xantina/luminol/XOD pelo ácido *p*-cumárico.** As concentrações finais do ácido *p*-cumárico no meio reacional foram 0,375; 0,75; 1,5 e 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações. 116
- Figura 36 – Liberação do ácido *p*-cumárico (A) e EEP (B) das formulações 1 (■) e 2 (▲) adicionadas de extrato de própolis.** 118
- Figura 37 - Modelos da cinética de liberação do ácido *p*-cumárico das formulações 1 e 2.** J = Fluxo (obtido da inclinação da reta nos diferentes modelos matemáticos); r = Coeficiente de correlação linear observado nos diferentes modelos matemáticos. 121

- Figura 38 - Modelos da cinética de liberação da EEP das formulações 1 e 2.** J = Fluxo (obtido da inclinação da reta nos diferentes modelos matemáticos); r = Coeficiente de correlação linear observado nos diferentes modelos matemáticos. 122
- Figura 39 – Diferença no valor de a calculado após 24 e 48 horas da exposição à radiação UVB para os animais do protocolo de tratamento 1.** C: Controle; F2 B: Formulação 2 base (sem extrato); F2 EPA: Formulação 2 com extrato; (n = 3) 133
- Figura 40 – Diferença no valor de a calculado após 24 e 48 horas da exposição à radiação UVB para os animais do protocolo de tratamento 2.** C: Controle; F2 B: Formulação 2 base (sem extrato); F2 EPA: Formulação 2 com extrato. (*) Diferença significativa, para $p < 0,05$ – One Way Anova; (n = 3) 134
- Figura 41 – Concentração de GSH observado nos grupos controle e irradiado com uma dose de $2,538 \text{ J cm}^{-2}$.** (*) Diferença significativa, para $p < 0,05$ – t-test. (n = 3). 135
- Figura 42 – Curva Padrão do GSH utilizando como reagente de derivação o OPT.** A fluorescência foi determinada em 350 e 420 nm, para excitação/emissão. 137
- Figura 43 – Concentração dos níveis de GSH encontrado nos grupos de animais sem irradiar e irradiados tratados ou não com F2 adicionada de extrato de própolis 2,5%.** C: Controle (sem formulação); F2 B: Formulação 2 base (sem extrato); F2 EPA: Formulação 2 com extrato; (n = 3). 138

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 – Compostos responsáveis pela atividade biológica da própolis de origem Brasileira e Européia	9
Tabela 2 – Composição das formulações (p/p)	35
Tabela 3 – Concentração de polifenóis e flavonóides nos extratos de própolis	67
Tabela 4 - Valores de pH das formulações 1 e 2 armazenadas à temperatura ambiente	91
Tabela 5 - Valores de pH das formulações 1 e 2 armazenadas a 40°C ± 2°C/70 % UR ± 5% UR	92
Tabela 6 - Precisão e exatidão intra- e interensaio para análise do ácido <i>p</i> -cumárico	110
Tabela 7 – Avaliação da estabilidade do ácido <i>p</i> -cumárico pela avaliação da altura dos picos das amostras comparadas às amostras recém preparadas realizando análise estatística (Teste t-student) e considerando o valor do p	112
Tabela 8 – Precisão da atividade antioxidante do extrato de própolis avaliado na solução receptora	114
Tabela 9 –Liberação do ácido <i>p</i> -cumárico das formulações 1 e 2 adicionadas de extrato de própolis	118
Tabela 10 –Liberação da EEP das formulações 1 e 2 adicionadas de extrato de própolis	118
Tabela 11 – Comparação do conteúdo liberado (12 horas) e coeficiente de difusão do ácido <i>p</i> -cumárico e EEP nas formulações após 12 h	123
Tabela 12 – Porcentagem de inibição e correspondente EEP estimado para os estudos de permeação e retenção em pele de camundongo após 12 horas de experimento	126
Tabela 13 – Porcentagem de inibição e correspondente EEP estimado para os estudos de permeação e retenção em pele de porco após 12 horas de experimento	127
Tabela 14– Recuperação do método de extração da atividade antioxidante retida em pele de porco	129

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHT	Butil hidroxi tolueno
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
$C_2HCl_3O_2$	Ácido tricloroacético
CV	Coefficiente de variação
D	Coefficiente de difusão
DEM	Dose Eritematogênica Mínima
E	Exatidão
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
EEP	Equivalentes de Extrato de Própolis
EGTA	Etilenoglicol-bis β -aminoetil éter N, N, N', N'ácido tetraacético
EPA	Extrato de própolis alcoólico
EPG	Extrato de própolis glicólico
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
$FeCl_3.6H_2O$	Cloreto Férrico Hexahidratado
FDA	“Food and Drug Administration”
FPS	Fator de Proteção Solar
GSH	Glutathione reduzida
Hepes	Ácido Etanosulfônico 4-2 Hidroxietil Piperazina-1, Sal Sódico
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
H_3PO_4	Ácido orto-fosfórico
HRP	Horseradish peroxidase
IC_{50}	Concentração que inibe o processo oxidativo em 50%
<i>J</i>	Fluxo
KCl	Cloreto de potássio

KH_2PO_4	Fosfato monobásico de potássio
Ko/a	Coefficiente de partição óleo/água
KOH	Hidróxido de potássio
LQ	Limite de Quantificação
MDA	Malondialdeído
Na_2CO_3	Carbonato de sódio
$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$	Sulfato ferroso amoniacal
$\text{NO}^\bullet$	Óxido nítrico
O_2	Oxigênio molecular diatômico
$\text{O}_2^{\bullet -}$	Radical superóxido
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
$^\bullet\text{OH}$	Radical hidroxila
ONOO^-	Peroxinitrito
OPT	o-ftalaldeído
PA	Para Análise
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volume
PUFA	Ácidos graxos poliinsaturados
®	Marca registrada
$\text{RO}^\bullet$	Radical alcóxila
$\text{ROO}^\bullet$	Radical peróxila
ROOH	Radical hidroperóxido
RPM	Rotações por minuto
RUV	Radiação ultra-violeta
SOD	Superóxido dismutase
TA	Temperatura ambiente
TBA	Ácido tiobarbitúrico
Tris	Tri-hidroxiaminometano

UR	Umidade Relativa
UVA/B	Ultravioleta A/B
v/p	Volume/peso
v/v	Volume/volume
XOD	Xantina oxidase

SUMÁRIO

	Pág.
Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	vii
Lista de Abreviaturas e Símbolos	viii
1. Introdução e Revisão da Literatura.....	1
1.1 Os radicais livres e o efeito da radiação UV na pele	2
1.2 Os agentes fotoquimioprotetores e a própolis	5
1.3 Desenvolvimento de formulações tópicas e estudo da estabilidade.....	10
1.4 A pele e estudos de liberação, permeação e retenção cutânea.....	14
2. Objetivos.....	22
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3. Materiais e Métodos	25
3.1 Materiais	26
3.1.1 Matérias-primas e reagentes	26
3.1.2 Padrões de referência secundário	27
3.1.3 Equipamentos e acessórios	27
3.2 Métodos	28
3.2.1 Caracterização química dos extratos de própolis	28
3.2.1.1 Determinação do teor de polifenóis e flavonóides	28
3.2.2 Avaliação da atividade antioxidante do extrato de própolis.....	29
3.2.2.1 Preparação das amostras de extrato de própolis.....	29
3.2.2.2 Avaliação das amostras de extrato de própolis.....	30
3.2.2.3 Determinação da inibição da peroxidação lipídica induzida por Fe ⁺² pelos extratos de própolis	31
3.2.2.3.1 Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato.....	32
3.2.2.4 Determinação da inibição da degradação da deoxirribose pelos extratos de própolis.....	32
3.2.2.5 Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD pelos extratos de própolis	33
3.2.2.6 Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema H ₂ O ₂ /luminol/HRP pelos extratos de própolis	34
3.2.3 Desenvolvimento de diferentes formulações tópicas contendo extrato de própolis.....	34
3.2.3.1 Estudo da estabilidade física preliminar das formulações.....	36
3.2.3.1.1 Características organolépticas	37
3.2.3.1.2 Teste de centrifugação	37
3.2.3.1.3 Determinação do pH	37
3.2.3.1.4 Avaliação da homogeneidade por microscopia	38

3.2.3.2 Estudo da estabilidade acelerada e de longa duração	38
3.2.3.2.1 Estabilidade física	38
3.2.3.2.1.1 Avaliação da homogeneidade por microscopia	39
3.2.3.2.2 Estabilidade funcional	39
3.2.3.2.2.1 Escolha do método de atividade antioxidante para avaliar a estabilidade funcional das formulações desenvolvidas	39
3.2.3.2.2.1.1 Determinação da inibição da peroxidação lipídica induzida por Fe ⁺² pelas formulações adicionadas de extrato de própolis	39
3.2.3.2.2.1.2 Determinação da inibição da degradação da deoxirribose pelas formulações adicionadas de extrato de própolis	40
3.2.3.2.2.1.3 Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD pelas formulações adicionadas de extrato de própolis	40
3.2.3.2.2.2 Estabilidade funcional utilizando o método da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD	41
3.2.3.2.2.3 Análises estatísticas dos estudos de estabilidade	42
3.2.4 Estudos de liberação, permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i>	42
3.2.4.1 Determinação do conteúdo de ácido <i>p</i> -cumárico por CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência) no extrato de própolis alcoólico	42
3.2.4.1.1 Equipamentos	43
3.2.4.1.2 Soluções padrão	44
3.2.4.1.3 Validação	44
3.2.4.1.3.1 Linearidade do método cromatográfico	44
3.2.4.1.3.2 Precisão e exatidão	45
A) Precisão e exatidão intra-ensaio	46
B) Precisão e exatidão interensaio	46
3.2.4.1.3.3 Limite de quantificação (LQ)	46
3.2.4.1.3.4 Seletividade	47
3.2.4.1.3.5 Estabilidade	47
A) Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento	47
B) Estabilidade no tempo e condições de análise	48
3.2.4.1.4 Aplicação do método	48
3.2.4.2 Determinação da atividade antioxidante por quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD	49
3.2.4.2.1 Equipamento e metodologia	48
3.2.4.2.2 Soluções de extrato de própolis	48
3.2.4.2.3 Validação	49
3.2.4.2.3.1 Linearidade do método quimioluminescente	49
3.2.4.2.3.2 Precisão	50
A) Precisão intra-ensaio	50
B) Precisão interensaio	50
3.2.4.2.3.3 Limite de quantificação (LQ)	50
3.2.4.2.3.4 Estabilidade	51
A) Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento	51
B) Estudo da estabilidade da atividade antioxidante por 24 horas a 37°C	51
3.2.4.2.4 Aplicação do método	52
3.2.4.3 Estudo de “Sink Conditions” para a avaliação da atividade antioxidante nos estudos de liberação, permeação e retenção cutânea	52
3.2.4.4 Estudo de liberação <i>in vitro</i> de formulações tópicas adicionadas de extrato de própolis	54

3.2.4.5 Estudo de permeação e retenção <i>in vitro</i> das formulações tópicas adicionadas de extrato de própolis	56
3.2.4.5.1 Permeação.....	56
3.2.4.5.2 Retenção	57
A) Retenção total na pele de camundongo sem pêlo.....	57
B) “Tape stripping” e retenção na pele de porco.....	58
3.2.4.5.3 Estudo de interferentes no método de retenção cutânea.....	59
3.2.5 Estudos preliminares da eficácia <i>in vivo</i> (fotoquimioproteção) da formulação adicionada de extrato de própolis	60
3.2.5.1 Animais experimentais	60
3.2.5.2 Sistema e fonte de radiação UVB.....	60
3.2.5.3 Medida da irradiância da lâmpada UVB	61
3.2.5.4 Determinação da Dose Eritematogênica Mínima (DEM)	61
3.2.5.5 Avaliação da inibição da formação de eritema pela formulação adicionada de extrato de própolis	62
3.2.5.6 Avaliação da inibição da depleção dos níveis de GSH	63
3.2.5.6.1 Determinação da dose de irradiação para depleção dos níveis de GSH.....	63
3.2.5.6.2 Avaliação da inibição da depleção do GSH pela formulação adicionada de extrato de própolis	64
4. Resultados e Discussão	65
4.1 Caracterização química dos extratos de própolis	66
4.1.1 Determinação do teor de polifenóis e de flavonóides.....	66
4.2 Avaliação da atividade antioxidante do extrato de própolis.....	68
4.2.1 Determinação da inibição da peroxidação lipídica induzida por Fe ⁺² pelos extratos de própolis	68
4.2.2 Determinação da inibição da degradação da deoxirribose pelos extratos de própolis	73
4.2.3 Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD pelos extratos de própolis	76
4.2.4 Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema H ₂ O ₂ /luminol/HRP pelos extratos de própolis	80
4.3 Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato de própolis	83
4.3.1 Estudo da estabilidade física preliminar das formulações.....	85
4.3.1.1 Características organolépticas	86
4.3.1.2 Teste de centrifugação	86
4.3.1.3 Determinação do pH	87
4.3.1.4 Avaliação da homogeneidade das formulações por microscopia.....	88
4.3.2 Estudo da estabilidade acelerada e de longa duração	88
4.3.2.1 Estabilidade física.....	89
4.3.2.1.1 Características Organolépticas	89
4.3.2.1.2 Teste de centrifugação	90
4.3.2.1.3 Determinação do pH.....	90
4.3.2.1.4 Avaliação da homogeneidade das formulações por microscopia.....	93
4.3.2.2 Estabilidade funcional	97
4.3.2.2.1 Escolha do método de atividade antioxidante para avaliar a estabilidade funcional das formulações desenvolvidas	97
4.3.2.2.1.1 Determinação da inibição da peroxidação lipídica induzida por Fe ⁺² pelas formulações adicionadas de extrato de própolis.....	98
4.3.2.2.1.2 Determinação da inibição da degradação da deoxirribose pelas formulações adicionadas de extrato de própolis.....	99

4.3.2.2.1.3 Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD pelas formulações adicionadas de extrato de própolis	100
4.3.2.2.2 Estabilidade funcional utilizando o método da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD	101
4.4 Estudos de liberação e permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i>	107
4.4.1 Determinação do conteúdo de ácido <i>p</i> -cumárico por CLAE.....	107
4.4.1.1 Validação do método cromatográfico.....	108
4.4.1.1.1 Linearidade do método cromatográfico.....	108
4.4.1.1.2 Precisão e exatidão	109
4.4.1.1.3 Limite de quantificação (LQ)	110
4.4.1.1.4 Seletividade	110
4.4.1.1.5 Estabilidade	112
4.4.1.1.6 Aplicação do método	112
4.4.2 Determinação da atividade antioxidante por quimioluminescência	112
4.4.2.1 Validação do método quimioluminescente.....	113
4.4.2.1.1 Linearidade do método	113
4.4.2.1.2 Precisão.....	114
4.4.2.1.3 Limite de quantificação (LQ)	114
4.4.2.1.4 Estabilidade	115
4.4.2.1.5 Aplicação do método	115
4.4.3 Estudo de “Sink Conditions” para a avaliação da atividade antioxidante nos estudos de liberação e permeação.....	116
4.4.4 Estudo de liberação <i>in vitro</i> de formulações tópicas adicionadas de extrato de própolis	117
4.4.5 Estudo de permeação e retenção <i>in vitro</i> das formulações tópicas adicionadas de extrato de própolis	125
4.4.5.1 Permeação e retenção em pele de camundongo e de porco.....	125
4.4.5.2 Estudo de interferentes do método de retenção cutânea.....	129
4.5 Estudos preliminares da eficácia <i>in vivo</i> (fotoquimioproteção) da formulação adicionada de extrato de própolis	130
4.5.1 Medida da irradiância da lâmpada UVB	130
4.5.2 Determinação da Dose Eritematogênica Mínima (DEM)	130
4.5.3 Avaliação da inibição da formação de eritema pelas formulações adicionadas de extrato de própolis	131
4.5.4 Avaliação da inibição da depleção dos níveis de GSH pela formulação adicionada de extrato de própolis	134
4.5.4.1 Determinação da dose de irradiação para depleção dos níveis de GSH.....	134
4.5.4.2 Avaliação da inibição da depleção do GSH	135
5. Conclusões	140
6. Referências	143

Anexos

1. Introdução e Revisão da Literatura

1.1 Os radicais livres e o efeito da radiação UV na pele

A literatura biomédica evidencia o envolvimento de radicais livres em processos patofisiológicos como artrite reumatóide, fibrose cística, cardiomiopatia, AIDS, câncer e nas patologias desenvolvidas na pele causadas pela radiação ultravioleta (RUV). Esta grande variedade de doenças envolvidas com as espécies reativas de oxigênio (EROS) sugere que a produção excessiva de EROS acompanha um prejuízo ao tecido onde estas EROS estão sendo geradas, porém, também é sabido que é a injúria à um tecido que leva à um estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Desta forma, é possível observar uma extensa preocupação para elucidar a formação destes radicais, bem como para desenvolver mecanismos para tentar prevenir e/ou tratar os danos que estas espécies químicas causam à saúde humana.

Os radicais livres são, por definição, espécies capazes de existirem independentemente, que contem um ou mais pares de elétrons não emparelhados. Em sistemas biológicos, estas espécies são aquelas derivadas do oxigênio molecular diatômico (O_2) e são comumente denominadas EROS (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Como exemplo, o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila ($^{\bullet}OH$), peroxila ($RO_2^{\bullet}$), óxido nítrico ($NO^{\bullet}$). Outros oxidantes, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2) e o peroxinitrito ($OHOO^{\bullet}$), apesar de não serem radicais livres, podem facilmente sofrer reações e formar radicais livres e são, também, englobados como EROS.

Uma vez formado, o radical pode reagir com outro radical ou com outra molécula por várias interações. A velocidade e a seletividade destes tipos de reações dependem da concentração e localização do radical, da localização do elétron desemparelhado e da ausência de ligações fracas em qualquer molécula presente com a qual o radical poderia reagir (ARUOMA, 1998).

Os radicais livres são continuamente produzidos pelo metabolismo celular em pequenas quantidades e possuem diferentes ações *in vivo*, como produção de energia, fagocitose, controle do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de compostos biologicamente importantes. Entretanto, os radicais livres podem ser prejudiciais uma vez que podem atacar as principais classes de biomoléculas como açúcares, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios ocasionando a perda de função das células (KOHEN, 1999, PIETTA, 2000).

Existem pelo menos três mecanismos endógenos envolvidos na proteção dos tecidos contra estes danos provocados pelas EROS que são liberados durante o metabolismo celular normal. Os sistemas antioxidantes enzimático, como superóxido dismutase (SOD), catalase, os não enzimáticos, tais como, vitamina C, vitamina E, ubiquinonas, ácido úrico e compostos sulfidrílicos (glutathione, homocisteína) e os quelantes de metais, como os transportadores de ferro (transferrina, hemoglobina, mioglobina, ferritina e ferredoxinas) e transportador de cobre (ceruloplasmina). Estes mecanismos são chamados de antioxidantes, sendo que um antioxidante é definido como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas com aquelas de um substrato oxidável (proteínas, lipídios, carboidratos, DNA), retardam ou previnem a oxidação dessas substâncias, além disso os antioxidantes são relativamente estáveis tanto na forma de radical ou não radical e não iniciam reações sucessivas de radicais que possam originar outros radicais ou substratos oxidáveis (BERGENDI et al., 1999; HALLIWELL et al., 1995).

Em tensão de oxigênio normal estes mecanismos de defesa são suficientes para manter a homeostasia. Entretanto, quando a geração de radicais livres sobrepõe a habilidade de defesa antioxidante da célula, em contrabalanço instala-se uma condição de estresse oxidativo (FUCHS, 1998).

A pele é um órgão complexo e o maior do corpo, responsável por numerosas funções fisiológicas e imunológicas, e está exposta à um elevado estresse oxidativo, devido à fatores internos e externos a que poucos tecidos estão sujeitos (DARR; FRIDOVICH, 1994; KOHEN, 1999).

Dentre os fatores responsáveis pelo estresse oxidativo na pele, a exposição à luz UV (ultra-violeta) tem sido amplamente estudada, devido aos prejuízos que esta causa à integridade da pele que é crítica para a homeostasia celular (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005). A RUV (radiação ultra-violeta) resulta na geração excessiva de EROS, na grande diminuição dos antioxidantes endógenos, no aumento dos produtos de peroxidação lipídica, responsáveis pelo dano oxidativo na pele, na supressão do sistema imune, na inibição do reparo do DNA (INAL; KAHRAMAN, 2000), nas alterações nos processos de sinalização celular que controlam a diferenciação e o ciclo celular causando prejuízos ao DNA (GRUIJL, 1999), na ativação de fatores de transcrição celular e indução da síntese de metaloproteinases causando o mau funcionamento do processo de remodelação do tecido conectivo (MOON et al., 2005), além de também induzir a liberação de prostaglandinas e células inflamatórias (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005).

A causa destes eventos é condizente com a dose de RUV, tempo de exposição e o comprimento de onda e a resposta da pele a este estresse variam de inflamação moderada e eritema à hiperplasia, queimaduras, envelhecimento e malignidades cutâneas como câncer de pele melanoma e não-melanoma (carcinoma de células basais e de células escamosas). A susceptibilidade genética é um importante determinante das respostas à RUV (HECK et al., 2004)

No nível molecular as radiações UVA e UVB diferem em seus sítios de ação na geração de lesões pré-mutagênicas. A radiação UVB é absorvida diretamente pelo DNA celular, enquanto a UVA é absorvida por cromóforos intracelulares como a riboflavina e

enzimas presentes na membrana resultando numa alteração do potencial redox da célula que, entre outros danos, pode levar à fotosensibilização. Há evidências que a radiação UVB é responsável em maior extensão do que a radiação UVA pelos danos que a luz solar causa na pele. Acredita-se que a radiação UVB seja responsável por cerca de 90% da dose carcinogênica da luz solar (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005). Assim os danos causados principalmente pela radiação UVB podem levar ao fotoenvelhecimento, bem como ao crescimento celular descontrolado sendo responsável pelo desenvolvimento da maioria dos cânceres de pele. No entanto, para manter a integridade da célula, várias respostas celulares são ativadas como remoção do dano ao DNA, atraso no ciclo celular, reparo do DNA ou ainda apoptose pela ativação transcripcional dos genes relacionados ao p53 (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005).

O desenvolvimento do câncer de pele é um fenômeno complexo de múltiplos estágios compreendendo iniciação, que é um passo irreversível na qual ocorrem alterações genéticas; promoção, onde ocorre a expansão clonal das células alteradas dando início à lesões malignas; e propagação, onde as lesões malignas são convertidas em tumores potencialmente metastáticos. Assim, estratégias como a prevenção primária baseada no uso de filtros solares e educação em saúde têm sido propostas. Porém, nos anos recentes, a fotoquimioproteção com a utilização de antioxidantes tópicos tem sido aceita como uma modalidade muito eficiente para melhorar os efeitos biológicos da RUV na pele (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005).

1.2 Os agentes fotoquimioprotetores e a própolis

A fotoquimioproteção têm sido apreciada como uma maneira viável em reduzir a ocorrência de uma variedade de desordens de pele. A ação dos agentes fotoquimioprotetores

pode ser alcançada tanto pela prevenção, quanto pela correção dos danos que a RUV (principalmente UVB) causa na pele, devido à diversos fatores como resumidos na Figura 1.

Figura 1 – Ação dos agentes fotoquimioprotetores na pele. Adaptado de AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005.

Nos anos recentes, há um acúmulo de dados laboratoriais indicando que uma ampla variedade de compostos poderiam ser usados em produtos tópicos para o tratamento e/ou prevenção do fotoenvelhecimento e do câncer de pele mediados por EROS gerados pela RUV. Dentre os compostos fotoquimioprotetores estão a vitamina E, ácido ascórbico, β -caroteno, licopeno, superóxido dismutase (SOD) e compostos fenólicos como epigallocatequina galato presente no chá verde, genisteína, quercetina, resveratrol (CASAGRANDE et al., 2006b; DI MAMBRO ; FONSECA, 2007; GEORGETTI et al, 2003; HALLIWELL et al., 1995; WRIGHT; SPENCER; FLOWERS, 2006), etc.

No grupo dos compostos polifenólicos, os flavonóides têm sido amplamente estudados. Estes compostos são encontrados em plantas e alimentos (HOLLMAN et al.,

1995), e sua atividade bioquímica e de seus derivados depende da sua estrutura química e da relativa orientação dos vários ligantes da molécula (PIETTA, 2000).

Sendo assim, muitos compostos, dentre eles os botânicos (AFAQ; MUHTAR, 2006) que contém compostos fenólicos e flavonóides em sua composição e que têm grande uso na medicina popular, têm apresentado atividade antioxidante e são considerados fortes candidatos à serem veiculados em formulações tópicas fotoquimioprotetoras para prevenção e/ou tratamento dos danos causados pela RUV à pele.

Dentre a gama de extratos naturais (botânicos) com atividade biológica, o extrato de própolis tem destacado interesse devido à sua pronunciada atividade antioxidante demonstrada por inúmeros autores (BANKOVA, 2005; BURATTI; BENEDETTI; COSIO, 2007; CASTALDO; CAPASSO, 2002; MONTENEGRO et al., 1995; MYATAKA, 1997; NAGAI et al., 2003; PASCUAL; GONZALEZ; TORRICELLA, 1994; SHIMIZU et al., 2004; VOLPERT; ELSTNER, 1993).

A própolis é uma mistura de resinas de broto e exsudatos de plantas com β -glicosidase (secretada pela abelha), que é elaborada pelas abelhas para ser utilizada como seladora em suas colméias, além de prevenir a decomposição de organismos mortos após a invasão da colméia (MARCUCCI, 1995). A própolis tem sido um material muito utilizado em medicina popular desde pelo menos 300 AC. Porém, foi somente a partir da década de 80 que seu uso tem aumentado e tem ganhado popularidade principalmente na medicina alternativa (BANSKOTA; TEZUKA; KADOTA, 2001). O extrato de própolis é extensivamente utilizado na forma de spray ou diluído em água, além de também ser utilizado em alimentos (balas), em produtos de higiene pessoal (xampu, sabonete e creme dental), bem como em dermocosméticos (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

Inúmeras atividades biológicas envolvendo a própolis têm sido observada experimentalmente tanto *in vitro* quanto *in vivo* incluindo a anti-tumoral, antiinflamatória,

hepatoprotetora, imunomodulatória, neuroprotetora, cicatrizante e, principalmente, antibacteriana (BANKOVA, 2000; BANSKOTA; TEZUKA; KADOTA, 2001; CHOI et al., 2006; FISCHER et al., 2007; GREGORY et al., 2002; KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004; MARCUCCI, 1995; NAITO et al., 2007; NAKAJIMA et al., 2007; PAULINO et al., 2006; RUSSO et al., 2004), entre outras. Assim, devido à grande aplicabilidade da própolis, muitos estudos científicos têm sido realizados em todo mundo, chegando a totalizar mais de 800 trabalhos publicados nos últimos 20 anos (PUBMED, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>, 2007, palavra chave: própolis).

Com relação às propriedades biológicas descritas para a própolis, existem evidências que estas propriedades podem estar intimamente envolvidas com a capacidade dos extratos de própolis em seqüestrar diferentes radicais livres. A propriedade antioxidante da própolis foi atribuída principalmente à sua capacidade em seqüestrar radicais peroxila, atuando no estágio inicial da peroxidação lipídica (NAGAI et al., 2003), bem como seqüestrar radicais alcóxila, superóxido (PASCUAL; GONZALEZ; TORRICELLA, 1994) e hidroxila, além de também ser capaz de quelar metais (MONTENEGRO et al., 1995; VOLPERT; ELSTNER, 1993).

Devido à grande biodiversidade de espécies vegetais visitadas pelas abelhas para produção da própolis, esta possui uma elevada variação de seus princípios ativos e, desta forma, a sua composição química é bastante distinta em diferentes partes do mundo, podendo variar até em uma mesma região devido a variações como a época da colheita, a técnica empregada e o tipo de abelha. A própolis de origem brasileira em geral possui em sua composição química ácidos fenólicos prenilados, lignanas, terpenos e álcoois terpênicos e uma pequena quantidade de flavonóides e sua origem botânica principal é *Baccharis dracunculifolia* (região sudeste), *Hyptis divaricata* (região nordeste) e *Populus spp* (região sul). Enquanto que a própolis européia possui em geral ácido benzóico e seus ésteres, ácidos e

ésteres fenólicos substituídos e uma alta concentração de flavonóides cuja principal fonte botânica é *Populus nigra* (BANKOVA, 2005; PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

A distinta composição química da própolis de diferentes origens leva a expectativa de propriedades biológicas diferentes. No entanto, na maioria dos casos, a própolis de diferentes origens, apresentam atividades biológicas semelhantes (com intensidades distintas), principalmente com relação às atividades antibacteriana e antifúngica (BANKOVA, 2005). Na tabela 1 encontramos exemplos de alguns compostos responsáveis pelas atividades biológicas na própolis brasileira e européia (BANKOVA, 2005).

Tabela 1 – Exemplos de alguns compostos responsáveis pela atividade biológica da própolis de origem brasileira e européia

Tipo de própolis	Atividade antibacteriana	Atividade antiinflamatória	Atividade anti-tumoral	Atividade hepatoproteora	Atividade antioxidante	Alergenicidade
Européia (<i>Poplar</i>)	Flavanonas, flavonas, ácidos fenólicos e seus ésteres (1)	Flavanonas, flavonas, ácidos fenólicos e seus ésteres (2)	Éster fenetil do ácido cafeico (CAPE) (3)	Ácido cafeico, ácido ferrúlico, éster fenetil do ácido cafeico (2)	Flavonóides, ácidos fenólicos e seus ésteres (2)	Cafeato de 3,3-dimetilalil (1)
Brasileira (<i>Baccharis</i>)	Ácidos p-cumáricos prenilados, diterpenos labdanos (2)	Não identificados (2)	Ácidos p-cumáricos prenilado, elerodano, diterpenos, benzofenonas (2)	Ácidos p-cumáricos prenilados, lignanas, ácido cafeoil-quínico (2)	Ácidos p-cumáricos prenilados, flavonóides (2)	Não testado

(1) BURDOCK, 1998; (2) BANSKOTA et al., 2001; (3) GRUNBERGER et al., 1988.

Com relação à comercialização da própolis, em geral os países importadores, principalmente o Japão, preferem própolis de origem brasileira a própolis de outras origens, uma vez que seus constituintes têm sido relacionados a importantes propriedades biológicas e também pelo menor teor de metais pesados e demais poluentes ambientais (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

A partir do exposto, o extrato de própolis brasileiro torna-se um excelente candidato a ser utilizado como substância antioxidante em formulações tópicas fotoquimioprotetoras visando a prevenção e/ou tratamento dos prejuízos causados na pele pela radiação UV.

1.3 Desenvolvimento de formulações tópicas e estudo da estabilidade

Dentre as preparações semi-sólidas, os sistemas emulsionados são amplamente utilizados em formulações destinadas à aplicação tópica, pois são muitas as vantagens que as emulsões oferecem sob o ponto de vista farmacêutico (motivos técnicos, terapêuticos, etc). Sob o ponto de vista cosmético, as emulsões apresentam realçado destaque, constituindo-se o processo de emulsificação uma das ferramentas mais úteis de aplicação cosmética. Uma emulsão é definida como uma mistura termodinamicamente instável de dois líquidos (normalmente óleo e água) praticamente imiscíveis que apresentam uma estabilidade aceitável, devido à ação de um agente emulsificante, que é capaz de reduzir a tensão interfacial entre os dois líquidos (IDSON; LAZARUS, 2001). Desta forma, um dos líquidos está disperso no outro na forma de gotículas, originando a fase interna (dispersa ou descontínua) e a fase externa (dispersante ou contínua) da emulsão (SCHUELLER; ROMANOWSKI, 1998).

A fase oleosa de uma emulsão é composta por componentes apolares, tais como: gorduras, óleos e ceras e todos os seus derivados, incluindo álcoois e ácidos graxos, ésteres, hidrocarbonetos, glicerídeos e silicones. A fase aquosa é basicamente composta por água e por materiais hidrofílicos, como glicerina ou propilenoglicol. Os emulsificantes, que tornam possível a estabilização da dispersão, são normalmente moléculas que tem uma porção hidrofílica e uma porção lipofílica. Estes emulsificantes podem ser classificados como aniônicos, catiônicos, não-iônicos e anfotéricos, dependendo da natureza do grupo da porção hidrofílica da molécula do emulsificante (SCHUELLER; ROMANOWSKI, 1998).

Atualmente, por apresentarem muitas vantagens e praticidade na preparação de formulações, estão sendo empregadas bases ou ceras auto-emulsionantes, que possuem em sua constituição uma combinação de tensoativos emulsificantes e componentes graxos, freqüentemente álcoois graxos, que também podem ter ação como tensoativo auxiliar (Eccleston, 1997).

Apesar da presença de emulsificantes nas formulações, as emulsões em geral apresentam como característica a separação das duas fases originais que irá depender do tempo e da energia empregada no sistema. Portanto, no desenvolvimento de uma formulação para uso farmacêutico/cosmético existe o desafio de produzir um sistema que permanecerá estável durante a vida útil do produto (SCHUELLER, ROMANOWSKI, 1998). Logo que uma emulsão tenha sido preparada, ocorrem alterações que conduzem à instabilidade. Estas alterações são evidenciadas pela coalescência, floculação e/ou cremeação do sistema (Figura 2):

- Coalescência. É um processo de aumento do tamanho das gotículas durante o qual estas se juntam para formarem partículas maiores, sendo que este fenômeno pode continuar até que ocorra a separação das fases (RIEGER, 2001).
- Floculação: Este fenômeno pode ser definido como a agregação reversível das gotículas da fase interna na forma de agregados tridimensionais. A floculação é influenciada pelas alterações na superfície dos glóbulos emulsionados. Na ausência de uma barreira mecânica (protetora) na interface, e, se, uma quantidade insuficiente de emulsificante está presente, as gotículas da emulsão agregam-se e coalescem rapidamente. A floculação se difere da coalescência, sobretudo pelo fato do filme interfacial e as gotículas individuais permanecerem intactas (RIEGER, 2001).
- Cremeação: Sob a influência da gravidade, as gotículas dispersas tendem à sobrenadar dependendo das diferenças de densidade específica entre as fases dispersa e dispersante (RIEGER, 2001), levando à cremeação.

Figura 2 - Alterações que podem ocorrer nas emulsões: Coalescência, Flocculação; Cremeação.. Disponível em: <http://www.agsci.ubc.ca/courses/fnh/410/emulsify/4_14.htm>. Acesso em 20 Fev. 2006. Palavra chave: creaming.

A instabilidade das emulsões também pode ser resultado da instabilidade química (principalmente hidrólise dos tensoativos), destruição microbiana de um componente crítico na emulsão, ou processos fotoquímicos.

Antes do desenvolvimento de qualquer formulação farmacêutica ou cosmética é necessário considerar as características químicas e físicas de qualquer substância ativa que venha a ser incorporada à formulação. Dentre estas características, estão a solubilidade da substância ativa, o coeficiente de partição, a rota de dissolução, forma física, fatores que promovem sua degradação, forma de armazenamento e a sua estabilidade. Assim, a estabilidade química e física de uma substância ativa sozinha ou quando combinada a componentes da formulação são críticas para a preparação de qualquer produto farmacêutico ou cosmético seguro e eficaz (CHARRO, 1997). Desta forma, o teste de estabilidade é um meio necessário e vital para ajudar a assegurar que um produto manterá sua integridade durante o seu prazo de validade.

Para a avaliação da estabilidade das emulsões, utilizam-se normalmente condições de tensão como o aumento da temperatura e centrifugação. No aumento da temperatura, ocorre um aumento na velocidade dos processos envolvidos na instabilidade sob condições de armazenamento normal, porém deve-se tomar cuidado para não expor as formulações à temperaturas muito elevadas que acarretam o aparecimento de novas reações. A alteração da

temperatura tem efeitos sobre as propriedades das emulsões como: viscosidade, partição dos emulsionantes entre as fases, inversão da emulsão, e cristalização de certos lipídios. A centrifugação também é uma condição utilizada, onde o aumento da gravidade acelera a coalescência ou cremação e enfim a separação de fases. Outra forma de avaliar a estabilidade física de uma emulsão é a determinação do tamanho e da distribuição das gotículas na fase externa que pode ser realizada sobre o produto acabado e após o seu armazenamento. O aumento do tamanho das gotículas indica a existência de processo de coalescência, e, portanto, instabilidade da emulsão em relação ao tempo (RIEGER, 2001).

Com relação ao estudo de estabilidade química, é avaliado a capacidade do produto apresentar, dentro de certos limites pré-determinados (por exemplo 10%), a concentração de uma substância ativa considerada essencial para sua segurança e eficácia. Na estabilidade física é avaliada a capacidade do produto reter, de forma inalterada, as características físicas que apresentava, após sua fabricação. Aspectos como cor, odor, textura, consistência, sensação ao tato e comportamento reológico são consideradas propriedades físicas (D'LEÓN, 2001).

A medida do pH das formulações é necessária para detectar alterações de pH com o tempo, assegurando que o valor de pH esteja compatível com os componentes da formulação e com o local de aplicação, evitando irritações (CHARRO, 1997).

Desta forma, o desenvolvimento de formulações tópicas adicionadas de extrato de própolis pode ser uma tarefa árdua, pois além das dificuldades inerentes do desenvolvimento de uma formulação estável, há o agravante da composição complexa dos extratos de própolis, que pode acarretar inúmeras reações extrato-formulação e levar à instabilidade da formulação.

Na literatura, existem poucos estudos sobre o desenvolvimento de formulações tópicas adicionadas de extrato de própolis, bem como estudos de estabilidade das mesmas. Dentre os poucos estudos encontrados, normalmente é estudado apenas a atividade do extrato de

própolis aplicado topicamente, tais como Naito e colaboradores (2007) que avaliaram a atividade antiinflamatória da própolis veiculada em pomada e Gregory e colaboradores (2002) que compararam o efeito cicatrizante de cremes contendo própolis com a sulfadiazina de prata. No entanto, estudos recentes de Berreta (2003) propõem o desenvolvimento de géis estáveis contendo extrato de própolis para serem aplicados na cicatrização de queimaduras.

Face ao exposto e baseado nos promissores resultados que o extrato de própolis pode promover na prevenção e/ou no tratamento das doenças de pele causadas pela radiação UV, é de grande valia a realização de estudos que tenham como objetivo o desenvolvimento de formulações estáveis contendo extrato de própolis.

1.4 A pele e estudos de liberação e permeação/retenção cutânea

Quando uma formulação tópica é aplicada na superfície da pele, algum resultado específico é desejado e, dependendo do objetivo e do mecanismo de ação, será necessário que as substâncias ativas presentes nesta formulação alcancem locais específicos dentro da pele. Porém, a previsão quantitativa da taxa e da extensão da penetração cutânea de substâncias ativas aplicadas topicamente é complicada devido à variabilidade inerente da pele de mamíferos e das características inerentes de cada substância ativa.

Além de ser considerado o maior órgão do corpo humano, a pele também é um órgão complexo, tendo no mínimo cinco tipos diferentes de células, contribuindo para a sua estrutura, e outros tipos de células temporariamente presentes a partir dos sistemas circulatório e imunológico (MENON, 2002). Sua função natural é proteger as estruturas internas do organismo contra o ambiente externo, hostil, incluindo as várias formas de poluição, temperatura, umidade e radiação, limitando a passagem de substâncias para o interior do corpo, estabilizando a pressão e temperatura e mediando as sensações de calor, frio, toque e dor (AULTON, 2005). A pele humana, representada na Figura 3, é composta de

três camadas distintas: a epiderme celular estratificada e avascular formada por células em diferentes estágios de diferenciação, além de também possuir melanócitos (responsáveis pela pigmentação cutânea), células de Merkel (associadas à receptores sensitivos) e células de Langerhans (responsáveis pela apresentação do antígeno na pele); a derme subjacente, formada por tecido conectivo contendo fibroblastos, colágeno, elastina e leucócitos, mastócitos e macrófagos teciduais envolvidos na função de defesa da pele; e a hipoderme, camada de gordura subcutânea (BURKITT; YOUNG; HEATH, 1994).

A principal resistência à permeação da maioria das substâncias, porém não de todas, reside na fina camada superior da pele chamada estrato córneo (Figura 3). O estrato córneo é formado por uma camada compacta de células (corneócitos) alongadas, mortas e desidratadas, que são o produto final da diferenciação das células produzidas na epiderme viável. Dentro dos corneócitos são encontradas substâncias hidrofílicas de baixa massa molecular como aminoácidos e açúcares e, a queratina, que fornece resistência a estas células e, entre estes corneócitos está presente a maioria do material lipídico na forma de lipídios neutros.

Figura 3 – Estrutura da pele. Adaptado de imagem disponível em: <http://www.nurse-prescriber.co.uk/education/visual_lib/vl_skincondprep.htm>. Acesso em 10 Jan. 2006. Palavra chave: skin layers.

A resistência ao transporte através do estrato córneo depende das propriedades e arranjos das suas camadas hidrofílicas e lipídicas, como também de sua espessura, a qual varia de espécie para espécie e de local para local no mesmo indivíduo. Abaixo do estrato córneo está a epiderme viável, que é enzimaticamente ativa e formada por células em vários estágios de diferenciação bioquímica. Na epiderme há um constante movimento das células recém formadas partindo da camada basal em direção ao estrato córneo, sendo que a taxa deste processo de renovação celular é igual à taxa de desprendimento das células mais externas do estrato córneo (ZATZ, 1993).

Os folículos pilosos e as glândulas sebáceas são estruturalmente parte da epiderme, porém neste tecido não existem vasos sanguíneos, e os nutrientes precisam se difundir partindo da derme (Figura 3). A derme é uma camada mais espessa e é responsável pela maioria da força mecânica e das sensações da pele (ZATZ, 1993). Portanto, como exposto, a função barreira da pele é difícil de ser superada por muitas substâncias ativas presentes nas formulações fotoquimioprotetoras.

Uma vez que a substância ativa está em contato com a pele intacta, esta tem duas vias potenciais de entrada no tecido viável: pelos anexos da pele como folículo piloso e ductos de glândulas sudoríparas ou pelo estrato córneo. Com relação à penetração pelo estrato córneo, dois caminhos foram propostos: o caminho intercelular, que envolve a passagem somente pelos domínios lipídicos intercelulares e o caminho transcelular, que atravessa as células e os espaços intercelulares (Figura 4) (ZATZ, 2003). A rota pelos anexos da pele parece ser desprezível, pois estes anexos ocupam cerca de 1 % da pele (Figura 3). A rota de penetração tem sido muito debatida nas últimas décadas e evidências experimentais sugerem que a rota predominante é através de espaços intercelulares, no entanto, a penetração dependerá da lipossolubilidade da substância ativa. O espaço intercelular contém lipídios estruturados e a

molécula em difusão tem que passar por uma variedade de domínios lipofílicos e hidrofílicos antes de atingir a junção entre o estrato córneo e a epiderme viável (HADGRAFT, 2004).

Figura 4 – Mecanismos de penetração na pele. Adaptado de imagem disponível em: <<http://www.ijpr-online.com/Docs/20041/IJPR226.htm>>. Acesso em 20 Fev. 2006. Palavra chave: skin.

Com a aplicação tópica de uma formulação fotoquimioproteora (antioxidante), vários estágios devem ser transpostos para que ocorra a ação tópica ou ainda a absorção percutânea. Inicialmente a substância ativa precisa difundir através da formulação em direção à pele. Em seguida precisa particionar entre a formulação e o estrato córneo, para difundir através deste último, onde a substância pode ligar-se a um sítio depósito e/ou continuar difundindo até a epiderme viável. Na epiderme, a substância ativa pode ser metabolizada, ou interagir com o seu receptor (ação tópica). Após atravessar a derme, regiões de depósito adicionais e sítios metabólicos podem intervir à medida que a substância ativa se move para um capilar, para a remoção sistêmica. Uma parte da substância ativa pode ainda chegar à gordura subcutânea, dando origem a outro depósito. Uma porção da substância pode também alcançar camadas musculares mais profundas (AULTON, 2005). Vários fatores biológicos e físico-químicos podem interferir neste processo.

Assim, antes do desenvolvimento de uma formulação, deve-se ter conhecimento das características da substância ativa que se pretende trabalhar como coeficiente de partição, coeficiente de difusão, solubilidade, massa molecular, etc. Dentre as propriedades físico-químicas da substância ativa, a sua solubilidade na emulsão é de importância primária na determinação da taxa na qual esta substância atravessa uma membrana como a pele. Primeiramente a solubilidade da substância ativa influencia na sua concentração na emulsão, pois como a difusão é um processo cinético passivo que ocorre a favor do gradiente de concentração da região de maior para de menor concentração, quanto maior a concentração da substância ativa em solução na emulsão, maior será o gradiente de difusão (FLORENCE; ATTWOOD, 2003; SMITH; SURBE; MAIBACH, 1999). Em adição, a substância ativa deve ter uma maior solubilidade (afinidade) no estrato córneo do que no veículo, desta forma, facilitando a partição da interface para a pele, maximizando o potencial termodinâmico de saída da substância ativa (SMITH; SURBE; MAIBACH, 1999).

Além disso, o desenvolvimento de uma formulação também requer uma grande avaliação de seus constituintes, pois um fator a ser considerado é as profundas mudanças que ocorrem no veículo após a sua aplicação na pele, pois compostos voláteis como a água e o propilenoglicol tendem a evaporar com o espalhamento do veículo na pele. Esta perda por evaporação irá mudar o ambiente de partição que foi criado e pode resultar tanto em uma rápida precipitação da substância ativa como em uma alteração do potencial de partição entre o filme aplicado da emulsão e o estrato córneo. Similarmente, componentes da formulação podem entrar nas camadas do estrato córneo ou ocluí-las, afetando a dissolução e a difusão neste tecido. A água ao entrar no estrato córneo levará à hidratação e o intumescimento deste tecido, o propilenoglicol e outros promotores de absorção, que podem estar presentes na formulação, podem desestruturar a bicamada lipídica dos espaços intercelulares e facilitar a difusão da substância ativa (SMITH; SURBE; MAIBACH, 1999).

Em geral o objetivo do tratamento tópico é produzir concentrações adequadas da substância no tecido alvo, enquanto produz baixas concentrações sanguíneas, não só devido a efeitos sistêmicos não desejados, mas também devido à rápida remoção pelo sangue, o que pode limitar a baixa concentração da substância no tecido. Desta forma, para uma substância que deve exercer sua atividade nos tecidos da pele, como corticóides, anestésicos, vitamina A, antioxidantes e substâncias fotoquimioprotetoras, a situação ideal seria que ela tivesse uma boa penetração e retenção na pele com uma mínima permeação para os vasos sanguíneos (ZATZ, 1993). Entretanto, os produtos que têm objetivo de ação na superfície da pele, como agentes de limpeza e protetores (repelentes e protetores solares), devem ter absorção mínima.

Portanto, para avaliar se o objetivo proposto pela formulação desenvolvida foi alcançado, testes clínicos devem ser realizados. No entanto, a realização de testes clínicos é um processo caro, demorado e, muitas vezes inviável. Uma alternativa a alguns testes clínicos é a realização de testes laboratoriais durante o desenvolvimento de produtos que se relacionam com o resultado clínico. Assim, estudos *in vitro* em que são utilizadas células de difusão, como células de Franz, que permitem criar condições na qual pode ser medida a difusão de uma substância ativa por uma membrana, (membrana sintética ou pele) são atualmente muito usados. Uma alíquota de formulação contendo a substância ativa é adicionada no compartimento doador sobre a membrana, e esta substância é avaliada na solução receptora que está em contato com a porção inferior desta membrana (BONINA et al., 1996; BRONAUGH; COLLIER, 1993).

Nos estudos de liberação, avalia-se a capacidade da substância ativa em ser liberada do carreador (veículo) antes que ela entre em contato com a superfície epidermal e esteja disponível para penetração no estrato córneo e nas camadas inferiores da pele. Estes estudos de liberação *in vitro* podem servir como uma importante ferramenta para uma avaliação inicial de formulações experimentais na área de desenvolvimento de produtos e podem servir

para avaliar a biodisponibilidade (GETIE et al., 2002). Os estudos de liberação são normalmente realizados com membranas sintéticas, que são barreiras porosas funcionando como barreiras de difusão passiva onde a taxa de difusão é determinada pela concentração do soluto (PAGLIARA et al., 1999).

Para avaliar a penetração de substâncias ativas na pele ou através dela, são normalmente realizados estudos utilizando pele de camundongo, pele humana proveniente de cirurgia ou pele de orelha de porco, que é considerado o melhor modelo de pele, pois além de sua maior disponibilidade, possui propriedades histológicas e fisiológicas similares à da pele humana (PAGLIARA et al., 1999). Estes estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro* são úteis para avaliar substâncias ativas e comparar formulações e, em muitos casos, somente resultados comparativos são necessários (WESTER; MALBACH, 1990).

Para a realização dos estudos de liberação, permeação e retenção cutânea de uma formulação, a substância ativa é quantificada por metodologia analítica adequada tanto na solução receptora quanto na pele que sofreu permeação para a quantificação da retenção. Normalmente a quantidade de substância ativa detectada é muito pequena e desta forma somente métodos analíticos muito sensíveis como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) são utilizados.

No caso da avaliação de formulações contendo extratos naturais, há muitos constituintes que estão disponíveis para serem liberados da formulação e desta forma, um ou mais compostos que estão em grande quantidade no extrato é normalmente utilizado como marcador. Porém, ao avaliarmos formulações contendo extrato de própolis é mais difícil estabelecer um marcador ou marcadores para avaliar estudos de liberação, permeação e retenção cutânea, pois além de apresentar muitos constituintes [como, por exemplo, mais de 150 compostos foram identificados como constituintes da própolis (RUSSO et al., 2004)], também apresentam uma grande variação destes constituintes dependendo da época e da área

de coleta e mesmo dependendo do tipo de abelha. Além disto, quando são desenvolvidas formulações tópicas fotoquimioprotetoras adicionadas de extrato de própolis a atividade esperada é o resultado da ação sinérgica de vários compostos que estão presentes no extrato, assim uma alternativa para podermos avaliar a real atividade que está disponível para ser liberada da formulação e capaz de penetrar na pele seria determinar a atividade antioxidante presente na solução receptora e/ou na pele após estudos de liberação, permeação e retenção cutânea.

Desta forma, a determinação da atividade antioxidante é uma alternativa que poderia representar de forma adequada a liberação, permeação e retenção cutânea do extrato de própolis de formulações tópicas fotoquimioprotetoras.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve por finalidade desenvolver formulações de uso tópico contendo como princípio ativo extrato de própolis. Foram realizados testes de estabilidade da atividade antioxidante do extrato de própolis como matéria-prima e dele incorporado à formulações, foram também realizados estudos de liberação *in vitro*, permeação e retenção cutânea *in vitro*, bem como estudos preliminares da ação antioxidante *in vivo* do extrato de própolis aplicado em camundongos sem pêlo expostos à radiação UVB.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterização química dos extratos de própolis;
- Avaliação da atividade antioxidante do extrato de própolis frente a diversos radicais livres;
- Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato de própolis:
 - Preparação de diferentes formulações tópicas do tipo gel, gel-creme e creme adicionadas de extrato de própolis;
 - Escolha das formulações mais adequadas por avaliação da estabilidade física preliminar das formulações desenvolvidas;
- Estudo da estabilidade física e funcional acelerada e de longa duração de formulações adicionadas de extrato de própolis;
- Estudos de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro* de formulações adicionadas de extrato de própolis:
 - Desenvolvimento e validação de metodologia de separação do ácido *p*-cumárico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
 - Adequação e validação da metodologia de inibição da quimioluminescência no sistema xantina/luminol/XOD;

➤ Estudos preliminares da eficácia *in vivo* (fotoquimioproteção) da formulação adicionada de extrato de própolis:

- Avaliação da inibição da formação de eritema;
- Avaliação da inibição da depleção dos níveis de GSH.

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Matérias-primas e reagentes

• Álcool etílico absoluto PA, Synth; • Água destilada; • Água deionizada e ultrapurificada (Milli-Q); • Ácido ortofosfórico 85%, Merck; • Ácido tiobarbitúrico 98%, Acros; • Carbonato de sódio PA, Merck; • Carbopol[®] 940 (Ácido Poliacrílico), Goodrich; • Citrato de sódio dihidratado PA, Merck; • Cloreto de alumínio PA, Quimis; • Cloreto Férrico hexahidratado PA, Merck; • Cloreto de potássio PA, Vetec; • Cloreto de sódio PA, Merck; • Crodabase (óleo mineral, álcool de lanolina, álcool graxo e álcool graxo etoxilado), Croda; • Deoxirribose 99% de pureza, Sigma; • Dimetilsulfóxido PA, Nuclear; • EDTA dissódico PA, Art Lab; • EGTA 97%, Sigma; • Extrato de própolis alcoólico e glicólico (11% de sólidos totais), Apis Flora; • Folin-Ciocalteu PA (reativo de fenol), Merck; • Fosfato de Sódio PA, Merck; • Fosfato de potássio PA, Merck; • Glicina 99%, Sigma; • Glicerina bidestilada, Galena; • Hidróxido de sódio PA, Merck; • Hidróxido de potássio PA, Merck; • Horseradish peroxidase 1000 unidades de HRP mg sólido⁻¹, Sigma; • Hostacerin[®] SAF (Acriloildimetil-taurato de amônio, Copolímero VP, ésteres de sorbitol, fosfato de trilaureto-4, óleo mineral e palmitato de isopropila), Pharmaspecial; • Luminol (aminophthalhydrazide) 98%, Acros; • Metanol PA, Vetec; • Metanol grau cromatografia Mallinckrodt, J.T Baker; • *n*-Butanol PA, Vetec; • Oleato de Isodecila (Cetiol V), Pharmaspecial; • Óleo de macadâmia incolor, Vital Âtman; • o-fitalaldeido (OPT) PA, Acros; • Palmitato de isopropila, Pharmaspecial; • Peróxido de hidrogênio 30% PA, Calbiochem; • Phenova[®] (Fenoxietanol e parabenos -metil, etil, propil, butil parabenos), Croda; • Polawax[®] (Álcool cetoestearílico/monoestearato sorbitano etoxilado 20 OE), Croda; • Polissorbato 20 (Tween 20), Vetec; • Propilenoglicol PA, Galena; • Sacarose PA, AnalytiCals; • Sulfato ferroso amoniaco PA, Merck; • Trietanolamina PA, J.T. Baker, Lio

Serum; •Tris (tri-hidroxiaminometano) PA, Fundação Sardi; •Xantina, pureza de 100%, Sigma; •Xantina oxidase 0,44 unidades mg proteína⁻¹, Sigma.

3.1.2 Padrões de referência secundários

•Ácido *p*-cumárico 99,9% de pureza, Sigma; •Ácido gálico, 99% de pureza, Sigma; •Glutathione reduzida (GSH) 99% de pureza, Sigma; •Quercetina 99% de pureza, Acros.

3.1.3 Equipamentos e acessórios

•Agitador Fisatom, modelo 713 D; •Agitador magnético Ika Workds, modelo Ika Color Squid; •Agitador magnético multipontos Marte, modelo Variomag multipoint HP; •Agitador de tubos, Phoenix AP56; •Balança analítica, Mettler Toledo, modelo AG204, precisão de 4 casas; •Balança eletrônica, Marte, modelo AS 2000, precisão de 2 casas; •Banho de água com temperatura controlada, Banho-maria 100, Fanem; •Bomba a vácuo Fabbe Primar, modelo 141; •Célula de difusão de Franz modificada; •Centrífuga clínica Excelsa Baby I, modelo 206-R, Fanem; •Centrífuga de tubos *ependorf* – Himac CF 15D₂; •Centrífuga refrigerada Beckman, Modelo J₂-21; •Compartimento de madeira projetado para instalação da lâmpada UVB. Lâmpada ultravioleta fluorescente modelo PHILIPS-TL12/RS-40W-UVB MEDICAL-HOLAND; •Chromameter– CR200, Minolta; •Cromatógrafo a líquido Shimadzu, composto de uma bomba LC-10AT-VP de duplo pistão, injetor Rheodyne, modelo 7125 com amostrador de 50 µL, coluna Lichrospher 100 RP-8, Merck, coluna de guarda CN 4 x 4 mm com partículas de 5 µm, Merck, detector por absorção no UV-Vis, modelo SPD-10A VP, e integrador modelo CR6-A, Shimadzu; •Deionizador de água Millipore[®], modelo Millipore, modelo Milli-Q acadêmic, Millipak 40; •Destilador de água Quimis[®] Q, modelo 341-210; •Espectrofotômetro Hitachi U2001, com cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico; •Espectrofotômetro de Fluorescência F-4500 – Hitachi; •Homogeneizador de tecidos Turrax,

Tecnal, modelo Turrattec TE 102; •Incubadora BOD MA 415 UR, Marconi; •Luminômetro Autolumat LB953, EG & G Berthold; •Membrana de éster de celulose HA (75-80% Nitrato e acetato) com tamanho de poros de 0.45 μm , Millipore®; •Membrana filtrante Millex LCR com membrana PTFE modificada com poro de 0,45 μm Millipore®; •Microscópio óptico LEICA DMLB acoplado à máquina fotográfica LEICA DC 300 e ao software LEICA Q WIN DD 300; •Microscópio óptico Olympus CH-2; •Pipetas automáticas de 20, 100, 200 e 1000 μL , Gilson; •Peagômetro Digimed, modelo DMPH-2; •Potes de polipropileno impermeáveis com capacidade de 50 gramas; •Radiômetro IL 1700 Research Radiometer. Detectores: SED240 – filtro UVB (290 nm); SED005 – filtro UV (350 nm)); SED033 – filtro TRED (633 nm), International Light-USA; •Ultra-som Thorton, modelo T14.

3.2 Métodos

3.2.1 Caracterização química dos extratos de própolis

Extratos de própolis padronizados, alcoólico (EPA) e glicólico (EPG), foram obtidos da empresa Apis Flora Ltda. Estes extratos estão patenteados - Patente número PI 0405483-0, publicado na Revista de Propriedade Industrial nº 1778 de 01/02/2005. Segundo a empresa fornecedora, os extratos apresentam composição química similar, pois o EPG é proveniente do EPA. Os extratos apresentam 11% de resíduo seco (segundo laudo analítico).

3.2.1.1 Determinação do teor de polifenóis e flavonóides

Para a determinação do conteúdo de polifenóis foi utilizado o método colorimétrico utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. Desta forma, foi adicionado a 500 μL das soluções hidroalcoólica 50% (v/v) dos extratos (1 mg mL^{-1}), 500 μL do reagente Folin-Ciocalteu e 500 μL de Na_2CO_3 10% (p/v). A reação foi incubada por 1 hora em temperatura ambiente

(~25°C) e foi feita a leitura da absorvância em 760 nm em espectrofotômetro. No branco, a alíquota da amostra foi substituída pela mesma quantidade de água deionizada. Foi construída uma curva padrão com o padrão de referência secundário ácido gálico ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$ - $20 \mu\text{g mL}^{-1}$) e o conteúdo de polifenóis totais foi expresso como mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (KUMAZAWA et al., 2004). As amostras foram analisadas em triplicata.

Para a determinação do conteúdo de flavonóides presentes nos extratos de própolis foi adicionando a 500 μL das soluções hidroalcoólicas 50% (v/v) dos extratos (5 mg mL^{-1}), 500 μL de uma solução hidroalcoólica 50% (v/v) de AlCl_3 2% (p/v). Depois de incubar a reação por 1 hora em temperatura ambiente (~25°C), foi feita a leitura da absorvância em 420 nm em espectrofotômetro. No branco a alíquota de AlCl_3 2% (p/v) foi substituída pela mesma quantidade de uma solução hidroalcoólica 50% (v/v). Foi construída uma curva analítica com o padrão de referência secundário quercetina ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$ - $25 \mu\text{g mL}^{-1}$). O conteúdo de flavonóides totais foi expresso como mg de equivalentes de quercetina por g de extrato (KUMAZAWA et al., 2004). As amostras foram analisadas em triplicata.

3.2.2 Avaliação da atividade antioxidante do extrato de própolis

3.2.2.1 Preparação das amostras de extrato de própolis

Para a avaliação da atividade antioxidante, 500 μL de cada extrato foi primeiramente solubilizado com propilenoglicol em balão volumétrico de 5 mL, e então diluído no meio reacional de cada metodologia (descrito posteriormente), obtendo as seguintes concentrações finais no meio reacional:

- Inibição da peroxidação lipídica: 0,1, 0,05, 0,04, 0,03, 0,025, 0,02, 0,0125, 0,00625 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

- Inibição da degradação da deoxirribose: 0,2, 0,1, 0,08, 0,06, 0,05, 0,04, 0,025 e 0,0125 $\mu\text{L mL}^{-1}$.
- Inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD: 0,15, 0,075, 0,045, 0,037, 0,029, 0,019, 0,009, 0,005 $\mu\text{L mL}^{-1}$.
- Inibição da quimioluminescência gerada no sistema H_2O_2 /luminol/HRP: 0,4, 0,3, 0,2, 0,15 e 0,1 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

3.2.2.2 Avaliação das amostras de extrato de própolis

A atividade antioxidante foi calculada pela porcentagem de inibição causada pelos extratos em cada sistema gerador de radicais livres. Foi estabelecido um controle positivo em cada metodologia onde houve 100% da formação de radicais livres, no qual foram adicionados todos componentes da reação, menos as amostras de extrato de própolis, cuja alíquota foi substituída por meio reacional de cada método. Todas medidas foram realizadas em triplicata. As porcentagens de inibição encontradas para as diversas concentrações de extrato, seguiram a seguinte fórmula (GEORGETTI et al., 2003):

$$\% \text{ Inibição do sistema pela amostra} = 100 - \left[\frac{100 \times \text{Amostra}}{\text{Controle Positivo}} \right] \quad \text{Equação 1}$$

Amostra = Absorvância da amostra nos métodos espectrofotométricos, ou a área sob a curva (ASC) da amostra nos métodos quimioluminescentes.

Controle positivo (C+) = absorvância do C+ nos métodos espectrofotométricos, ou a área sob a curva (ASC) do C+ nos métodos quimioluminescentes.

Desta forma, foi possível obter curvas dose-resposta para cada método. Também foi estimado o IC₅₀ das amostras, que é a concentração de extrato de própolis que inibe o processo oxidativo em 50%, pelo software GraphPad Prism[®] versão 3.02 de abril de 2000, utilizando uma curva hiperbólica “one site binding hyperbola”. A determinação do IC₅₀ é um parâmetro muito usado para medir a atividade antioxidante (PAREJO et al., 2000), sendo que quanto menor o IC₅₀, maior será a atividade antioxidante.

3.2.2.3 Determinação da inibição da peroxidação lipídica induzida por Fe⁺² pelos extratos de própolis

A medida da inibição da peroxidação lipídica pelas amostras de extrato de própolis foi determinada pela diminuição da formação de malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica.

Foram adicionados em 1 mL de meio de reação contendo 130 mmol L⁻¹ de KCl e 10 mmol L⁻¹ de Tris pH 7,4 (meio I), 10 µL de C₆H₅Na₃O₇·2H₂O (citrato de sódio dihidratado) 200 mmol L⁻¹, 10 µL das amostras teste, suspensão de mitocôndria (1 mg de proteína) e 50 µmol L⁻¹ de (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ (sulfato ferroso amoniacal). A reação foi incubada a 37°C por 30 minutos (RODRIGUES et al., 2002). Para a determinação do MDA formado, 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1% (p/v) preparado em 50 mmol L⁻¹ de NaOH, 0,1 mL de NaOH 10 mol L⁻¹ e 0,5 mL de H₃PO₄ 20% (v/v) foram adicionados, em seguida incubou-se a reação por 20 minutos a 85°C. O complexo MDA-TBA foi extraído com n-butanol, centrifugado a 3000 rpm e então leitura da absorvância foi realizada em 535 nm (BUEGE; AUST, 1978). No branco não foi adicionado suspensão de mitocôndria.

3.2.2.3.1 Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato

As suspensões de mitocôndrias utilizadas nos experimentos foram fornecidas pelo laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

Ratos Wistar machos pesando aproximadamente 200 g, provenientes do Biotério Central da USP de Ribeirão Preto, foram sacrificados por deslocamento cervical, o fígado foi removido e colocado no meio de homogeneização contendo 250 mmol L⁻¹ de sacarose, 1 mmol L⁻¹ de EGTA e 10 mmol L⁻¹ de Hepes-KOH pH 7,4. O fígado foi homogeneizado em Potter-Elvehjem-Reostato com aproximadamente 40 mL do meio descrito acima e a suspensão obtida foi centrifugada a 2500 rpm por 5 minutos em centrífuga refrigerada. O sobrenadante resultante foi novamente centrifugado a 10500 rpm por 10 minutos e o precipitado obtido foi ressuspensionado em 10 mL do meio contendo 250 mmol L⁻¹ de sacarose, 0,3 mM de EGTA e Hepes-KOH pH 7,4. Após a centrifugação a 6000 rpm por 15 minutos, o sedimento final contendo as mitocôndrias isoladas foi suspenso em 1 mL do meio contendo 25 mmol L⁻¹ de sacarose e Hepes-KOH pH 7,4 e submetido à dosagem de proteínas pelo método de Biureto (CAIN; SKILLETER, 1987; GORNAL; BARDAWILL; DAVID, 1949).

3.2.2.4 Determinação da inibição da degradação da deoxirribose pelos extratos de própolis

O açúcar deoxirribose (2-deoxi-D-ribose) é degradado quando exposto ao radical hidroxila gerado pelo sistema de Fenton. Se a mistura de produtos de degradação for aquecida em condições ácidas, malondialdeído (MDA) é formado e este pode ser detectado por sua habilidade de reagir com ácido tiobarbitúrico (TBA) formando um cromóforo rosa (HALLIWELL; GUTTERIDGE; ARUOMA, 1987).

Para a realização da metodologia foi adicionado a 1 mL de meio reacional que consiste de tampão KH₂PO₄ – KOH 20 mmol L⁻¹ pH 7,4 (meio II), 10 µL de uma solução de ascorbato

100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 10 μL da amostra teste, 10 μL de deoxirribose 2,8 mmol L^{-1} , 10 μL de uma solução de H_2O_2 100 mmol L^{-1} e 10 μL de uma solução de Fe-EDTA preparada solubilizando primeiramente 104 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de EDTA em 10 mL de água deionizada e posteriormente acrescentando 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. A reação foi incubada a 37°C por 30 minutos. Para determinar o MDA formado, 1 mL de TBA 1% (p/v) preparado em 50 mmol L^{-1} de NaOH, 0,1 mL de NaOH 10 mol L^{-1} e 0,5 mL de H_3PO_4 20% (v/v) foram adicionados, em seguida incubou-se a reação por 20 minutos a 85°C. No meio reacional desenvolveu-se coloração rósea e então leitura da absorvância foi realizada em 535 nm em espectrofotômetro (HALLIWELL; GUTTERIDGE; ARUOMA, 1987). No branco não foi adicionado deoxirribose.

3.2.2.5 Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD pelos extratos de própolis

Este método de quimioluminescência será usado para avaliar a atividade sequestradora do radical superóxido pelo extrato de própolis. Neste sistema a reação xantina/xantina-oxidase produz o radical superóxido que por sua vez oxida o luminol. A oxidação do luminol emite luz que é detectada por luminômetro, sendo que o sequestro do radical superóxido leva a diminuição desta quimioluminescência (GIROTTI et al., 2000).

Para a determinação da atividade sequestradora do extrato de própolis, foram pipetados em um tubo de ensaio 400 μL de uma solução preparada acrescentando 1 mmol L^{-1} de EDTA ao tampão glicina 100 mmol L^{-1} pH 9,4 (meio III). Foi então adicionado 150 μL de xantina 6 mmol L^{-1} , 10 μL da amostra teste e 10 μL de uma solução de luminol 0,6 mmol L^{-1} . A reação teve início com a adição de 100 μL de uma solução recém preparada de xantina oxidase (XOD) 20 mU mL^{-1} (mantida resfriada no gelo) (GIROTTI et al., 2000).

A reação da medida da atividade sequestradora foi realizada em luminômetro durante 5 minutos a 25°C. Durante o período de análise, o luminômetro realiza a contagem de fótons de luz que são emitidos pela amostra contida no tubo de ensaio e desta forma é obtido um gráfico onde a contagem de fótons é plotado no eixo das ordenadas (y) e o tempo (minutos) no eixo das abscissas (x). A porcentagem de inibição da quimioluminescência é calculada na medida da área sob a curva (ASC) obtida neste gráfico, como descrito no item 3.2.2.2.

3.2.2.6 Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema H₂O₂/luminol/HRP pelos extratos de própolis

Para a determinação da atividade inibidora da quimioluminescência pelos extratos de própolis foram pipetados em um tubo de ensaio 380 µL de tampão KH₂PO₄ pH 7,4 100 mmol L⁻¹ (meio IV). Foi então adicionado 10 µL da amostra teste, 100 µL de H₂O₂ (concentração final: 5 x 10⁻⁵ mol L⁻¹) e 10 µL de uma solução de luminol 2 mg mL⁻¹, obtendo uma concentração final de 1.13 x 10⁻⁴ mol L⁻¹. A reação teve início com a adição de 500 µL de uma solução recém preparada de horseradish peroxidase (HRP) 0,2 UI mL⁻¹ (mantida resfriada no gelo) (KROL et al., 1994).

A reação da medida da atividade sequestradora foi realizada em luminômetro durante 10 minutos a 25°C. Para a avaliação da % de inibição deste sistema também é utilizado a área sob a curva (ASC), obtida neste gráfico, como descrito no item 3.2.2.2.

3.2.3 Desenvolvimento de diferentes formulações tópicas contendo extrato de própolis

As formulações foram desenvolvidas no laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Foram desenvolvidas 7 formulações de uso tópico com distintos conteúdos graxos, obtendo formulações na forma de creme, de

gel-creme e de gel (Tabela 2) (CASAGRANDE, 2005; DI MAMBRO, 2005a ; DI MAMBRO; FONSECA, 2007; FONSECA, 2007; PHARMASPECIAL, 2004).

Tabela 2 – Composição das formulações

<i>Matérias-primas</i>		<i>Formulações (% p/p)</i>						
		A	B	C	D	E	F	G
Fase Oleosa	Hostacerin [®] SAF	6,0	-	-	6,0	-	-	-
	Crodabase [®]	-	10,0	-	-	-	-	-
	Polawax [®]	-	-	-	-	8,0	4,0	-
	Óleo macadâmia	1,5	2,0	-	-	-	-	-
	Palmitato de isopropila	0,5	1,0	-	-	1,0	1,0	-
	Oleato de isodecila	0,5	1,0	-	-	2,0	0,5	-
	Glicerina	-	2,0	2,0	-	2,0	2,0	2,0
Fase Aquosa	Água destilada	86,0	78,5	52,3	88,5	81,5	66,8	62,3
	Dispersão de Carbopol [®] 2% (p/v)	-	-	40,0	-	-	20,0	30,0
	Propilenoglicol	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
	Phenova [®]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	Trietanolamina (pH 6,5-7)	-	-	0,2	-	-	0,2	0,2

As formulações A e D foram preparadas por simples agitação manual a frio, pois a matéria-prima Hostacerin[®] SAF permite a obtenção de emulsões apenas com a adição da fase aquosa sob constante agitação. Após adquirir consistência, o restante da fase oleosa na formulação A foi adicionado (PHARMASPECIAL, 2004).

As Formulações B e E foram preparadas pelo método de inversão de fases, sendo as fases oleosas e aquosas de cada formulação aquecidas a 75°C e, então misturadas sob

constante agitação (400 rpm) em agitador Fisatom, modelo 713 D, até resfriamento à temperatura ambiente (~25°C) (FONSECA, 2007).

As formulações C e G foram preparadas utilizando dispersão de Carbopol® 940 2% (p/v) preparada no dia anterior. À porção de dispersão de Carbopol® 940 foi adicionado o restante das matérias-primas e o pH foi acertado (6,5-7,0) adicionando a alíquota de trietanolamina. As formulações foram agitadas manualmente e vigorosamente até adquirir consistência apropriada (CASAGRANDE, 2005; DI MAMBRO, 2005a).

A formulação F foi preparada pelo método de inversão de fases, como descrito anteriormente. Porém, antes do total resfriamento da formulação, o pH foi acertado (6,5 – 7) adicionando a alíquota de trietanolamina. A formulação foi agitada vigorosamente até adquirir consistência apropriada.

Os extratos de própolis alcoólico e glicólico foram utilizados na proporção de 2,5% (v/p), os quais foram primeiramente solubilizados na porção de propilenoglicol de cada respectiva formulação e acrescidos do conservante (Phenova®) para serem incorporados às formulações quando estas estivessem prontas e à temperatura ambiente (~25°C). Para as formulações base (formulações sem os extratos), foi acrescentado somente o conservante dissolvido na porção de propilenoglicol de cada respectiva formulação (CASAGRANDE, 2005). Após o preparo, as formulações permaneceram em repouso por 24 horas antes de iniciar os estudos de estabilidade.

3.2.3.1 Estudo da estabilidade física preliminar das formulações

O estudo da estabilidade preliminar também é conhecido como de triagem, acelerado ou de curto prazo e tem como objetivo auxiliar e orientar a escolha das formulações. Assim, as formulações base e as formulações adicionadas de 2,5% (v/p) de EPA ou EPG foram armazenadas em potes de polipropileno brancos opacos e mantidas à temperatura ambiente

(TA ~25°C) e a 40°C $\pm$ 2°C/70 % UR (umidade relativa) $\pm$ 5°C UR (BRASIL - ANVISA, 2004; BRASIL – ANVISA; 2005) durante 1 mês. Amostras destas formulações foram avaliadas em tempos pré-determinados quanto às características organolépticas, teste de centrifugação, determinação de pH e homogeneidade por microscopia para escolha da(s) formulação(ões) mais estável(veis), que será avaliada no estudo de estabilidade física e funcional acelerada e de longa duração. As formulações armazenadas à temperatura ambiente foram utilizadas como referência para comparação das alterações que ocorreram nas formulações armazenadas a 40°C $\pm$ 2°C/70% UR $\pm$ 5%.

3.2.3.1.1 Características organolépticas

As formulações em estudo foram observadas visualmente quanto ao aspecto, cor, odor, homogeneidade e separação de fases. As formulações também foram fotografadas para a avaliação da cor durante o período de estudo.

3.2.3.1.2 Teste de centrifugação

Para avaliar a estabilidade das formulações frente à centrifugação que poderia resultar em uma possível separação de fases, foram pesados 2 gramas de cada amostra (formulações com e sem extratos) e esta foi centrifugada a 3000 rpm por 30 minutos (MAIA CAMPOS; BRADA, 1992). O critério de aceitabilidade foi a não ocorrência de separação de fases.

3.2.3.1.3 Determinação do pH

Para determinar o pH das amostras em estudo, 1 grama de cada formulação foi diluído até 10 mL com água deionizada e o pH foi determinado utilizando peagômetro (MAIA CAMPOS; BRADA, 1992). As amostras foram realizadas em duplicata.

3.2.3.1.4 Avaliação da homogeneidade por microscopia

Para avaliação da homogeneidade, as formulações foram avaliadas por estudos microscópicos utilizando uma pequena alíquota das amostras entre lâmina e lamínula e observadas em aumento de 1000 vezes (imersão) utilizando microscópio óptico Olympus CH-2.

3.2.3.2 Estudo da estabilidade acelerada e de longa duração

As formulações que se demonstraram mais estáveis no estudo estabilidade física preliminar foram selecionadas, sendo escolhidas as formulações D e E que foram então avaliadas no estudo de estabilidade acelerado e de longa duração. Estas formulações, agora chamadas 1 e 2, acrescidas ou não de extrato de própolis e os extratos de própolis sozinhos, foram estocados à TA e a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/70\% \text{ UR} \pm 5^{\circ}\text{C UR}$ por 1 ano. Alíquotas das formulações foram retiradas nos intervalos de tempo de: 1, 7, 14, 30, 60, 90, 180, 270 e 360 dias e submetidas às análises quanto à estabilidade física e funcional (BRASIL - ANVISA, 2004; BRASIL - ANVISA, 2005). Os extratos sozinhos foram avaliados nos mesmos intervalos de tempo quanto à estabilidade funcional.

O estudo de estabilidade acelerado é projetado para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto em condições forçadas de armazenamento. Os dados assim obtidos, juntamente com aqueles derivados dos estudos de longa duração são usados para confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento (BRASIL - ANVISA, 2005).

3.2.3.2.1 Estabilidade física

A estabilidade física das formulações foi realizada pela avaliação das características organolépticas, pelo teste de centrifugação e determinação do pH como descrito nos itens

3.2.3.1.1, 3.2.3.1.2, 3.2.3.1.3. A homogeneidade por microscopia também foi avaliada como descrito à seguir:

3.2.3.2.1.1 Avaliação da homogeneidade por microscopia

Para a avaliação de homogeneidade por microscopia das formulações, foi utilizada uma pequena alíquota das amostras entre lâmina e lamínula e estas foram observadas em aumento de 1000 vezes (imersão) utilizando microscópio Leica DMLB acoplado ao software LEICA Q WIN DD 300, que calcula a área das gotículas em μm^2 . Foi determinada a área de 15 gotículas de cada formulação nos tempos pré-determinados. Os resultados foram expressos em $\mu\text{m}^2 \pm$ erro padrão da média.

3.2.3.2.2 Estabilidade funcional

3.2.3.2.2.1 Escolha do método de atividade antioxidante para avaliar a estabilidade funcional das formulações desenvolvidas

As formulações 1 e 2 adicionadas ou não de EPA ou EPG foram avaliadas quanto a medida da atividade antioxidante (funcional) pelas metodologias de inibição de peroxidação lipídica, inibição da degradação da deoxirribose e inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD.

3.2.3.2.2.1.1 Determinação da inibição da peroxidação lipídica induzida por Fe^{+2} pelas formulações adicionadas de extrato de própolis

O método de dosagem utilizado para determinar a atividade inibidora da peroxidação lipídica pelos extratos de própolis e pelas formulações adicionadas de extrato de própolis está descrito no item 3.2.2.3. Os extratos de própolis foram solubilizados primeiramente em

propilenoglicol e posteriormente diluídos com o meio I, obtendo no meio reacional $0,05 \mu\text{L mL}^{-1}$. As formulações foram diluídas 1:5 no mesmo meio, até completa homogeneização, para obtenção da mesma concentração final encontrada para os extratos. Foi realizado um controle positivo para os extratos no qual adicionou-se $10 \mu\text{L}$ do meio I no lugar da amostra e um controle positivo para as formulações adicionando-se $10 \mu\text{L}$ da formulação base diluída na mesma proporção da formulação teste. As amostras foram avaliadas em triplicata.

3.2.3.2.1.2 Determinação da inibição da degradação da deoxirribose pelas formulações adicionadas de extrato de própolis

O método de dosagem utilizado para determinar a atividade sequestradora do radical hidroxila pelos extratos de própolis e pelas formulações adicionada dos extratos está descrito no item 3.2.2.4. Os extratos de própolis foram solubilizados primeiramente em propilenoglicol e posteriormente diluídos com o meio II, obtendo no meio reacional $0,05 \mu\text{L mL}^{-1}$. As formulações foram diluídas 1:5 no mesmo meio, até completa homogeneização, para obtenção da mesma concentração final encontrada para os extratos. Foi realizado um controle positivo para os extratos no qual adicionou-se $10 \mu\text{L}$ do meio II no lugar da amostra e um controle positivo para as formulações adicionando-se $10 \mu\text{L}$ da formulação base diluída na mesma proporção da formulação teste. As amostras foram avaliadas em triplicata.

3.2.3.2.1.3 Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD pelas formulações adicionadas de extrato de própolis

O método de doseamento utilizado para determinar a atividade inibidora da quimioluminescência gerado no sistema xantina/luminol/XOD pelos extratos de própolis e

pelas formulações adicionadas de extrato de própolis está descrito no item 3.2.2.5. Os extratos de própolis foram solubilizados primeiramente em propilenoglicol e posteriormente diluídos com o meio III, obtendo no meio reacional $0,075 \mu\text{L mL}^{-1}$. As formulações foram diluídas 1:5 no mesmo meio, até completa homogeneização, para obtenção da mesma concentração final encontrada para os extratos. Foi realizado um controle positivo para os extratos no qual adicionou-se $10 \mu\text{L}$ do meio III no lugar da amostra e um controle positivo para as formulações adicionando-se $10 \mu\text{L}$ da formulação base diluída na mesma proporção da formulação teste. As amostras foram avaliadas em triplicata.

3.2.3.2.2 Estabilidade funcional utilizando o método da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD

A estabilidade da atividade antioxidante (funcional) dos extratos de própolis e das formulações adicionadas destes extratos, foram estudadas utilizando a metodologia de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD. Esta metodologia foi descrita no item 3.2.3.2.2.1.3. Os extratos de própolis foram solubilizados primeiramente em propilenoglicol e posteriormente diluído com o meio III, obtendo no meio reacional concentrações finais de $0,075 \mu\text{L mL}^{-1}$ e $0,019 \mu\text{L mL}^{-1}$. As formulações foram diluídas 1:5 e 1:20 no mesmo meio, até completa homogeneização, para obtenção das mesmas concentrações finais encontradas para os extratos. Foi realizado um controle positivo para os extratos no qual adicionou-se $10 \mu\text{L}$ do meio III no lugar da amostra e um controle positivo para as formulações adicionando-se $10 \mu\text{L}$ da formulação base diluída nas mesmas proporções das formulações teste. As amostras foram avaliadas em triplicata em cada ponto de análise.

3.2.3.2.3 Análises estatísticas dos estudos de estabilidade

Os dados da estabilidade foram analisados estatisticamente por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas na avaliação do valor do pH e da área das gotículas das formulações adicionadas destes extratos avaliando a influencia do tempo durante o armazenamento à TA ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) e a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/70\% \text{ UR} \pm 5\%$. Os testes foram realizados pelo software GraphPad Prism[®], versão 3.02 de abril de 2000. Os resultados foram considerados significativamente diferentes para $p \leq 0,05$. Com relação à estabilidade funcional dos extratos de própolis e das formulações adicionadas destes, foram considerados estáveis enquanto mantiveram 90% da atividade antioxidante original na concentração final de $0,019 \mu\text{L mL}^{-1}$, a qual causou 70% de inibição do sistema (CASAGRANDE et al., 2006a).

3.2.4 Estudos de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro*

Os estudos de liberação, permeação e retenção foram realizados com as formulações tópicas 1 e 2 adicionadas de extrato de própolis alcoólico 2,5 % (v/p). As metodologias analíticas utilizadas para avaliar estes estudos foram desenvolvidas e validadas como descrito a seguir.

3.2.4.1 Determinação do conteúdo de ácido *p*-cumárico por CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência) no extrato de própolis alcoólico

O método para quantificação do ácido *p*-cumárico (padrão de referência secundário) foi desenvolvido e validado no laboratório de Cromatografia e Eletroforese capilar (CROEC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. O ácido *p*-cumárico (Figura 5) é um dos componentes majoritários na própolis da região sudeste do Brasil (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002). Desta forma, esta substância foi escolhida como marcador para avaliar o extrato de própolis alcoólico.

Figura 5 – Estrutura do ácido *p*-cumárico. Adaptado de imagem disponível em: <<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/jsp/common/PhysicalProperties.jsp>> U.S. National Library of Medicine – Chemical information, Acesso em 10 Jan 2006. Palavra chave: coumaric-acid.

3.2.4.1.1 Equipamentos

Foi empregado o equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência como descrito em materiais e acessórios (item 3.1.3). O comprimento de onda utilizado foi de 280 nm (BUDIC-LETO; LOVRIC, 2002).

A separação do ácido *p*-cumárico foi realizada a $22 (\pm 2)^\circ\text{C}$ utilizando coluna RP-8 e como fase móvel foi utilizada uma solução de ácido acético 1% : metanol (75:25 v/v) com um fluxo de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. Uma coluna CN 4 x 4 mm com partículas de $5 \mu\text{m}$, foi utilizada como coluna de guarda.

Para degaseificação das fases móveis aquosas foi empregado um aparelho de ultrassom, juntamente com um sistema de vácuo. Um sistema de purificação de água, Milli-Q forneceu água livre de resíduos orgânicos e inorgânicos para preparação das soluções.

3.2.4.1.2 Soluções padrão

As soluções estoque de ácido *p*-cumárico foram preparadas em metanol nas concentrações de 1-200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e foram estocadas a -20°C , e assim, permaneceram estáveis por pelo menos 3 meses. Soluções padrão contendo o ácido *p*-cumárico foram preparadas diariamente em solução receptora na concentração de 25, 50, 100, 500, 1000 e 5000 ng mL^{-1} a partir das soluções estoque. A solução receptora é o tampão que foi utilizado nos estudos de liberação e é composta por tampão KH_2PO_4 isotônico 20 mmol L^{-1} (pH 7,4) adicionado de 0,5% (v/v) de polissorbato 20 (Tween 20). Tanto as soluções estoque quanto as soluções padrões foram protegidas da luz direta, pois foi observado que o ácido *p*-cumárico é fotossensível (TAKESHITA et al., 2000).

3.2.4.1.3 Validação

A validação do método foi realizada avaliando-se os principais parâmetros propostos para métodos bioanalíticos por algumas agências regulamentadoras (BRASIL - ANVISA, 2003; EUA – FDA, 2001).

3.2.4.1.3.1 Linearidade do método cromatográfico

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI et al., 2004). No método desenvolvido, as curvas analíticas foram construídas pela análise de amostras da solução padrão preparadas em 1 mL solução receptora (triplicata para cada concentração) previamente adicionadas com as soluções estoque de ácido *p*-cumárico. Obteve-se, assim, as concentrações de 25, 50, 100, 500, 1000 e 5000 ng mL^{-1} de ácido *p*-cumárico.

As alturas ou áreas dos picos registrados são, então, plotadas no eixo das ordenadas e as respectivas concentrações no eixo das abscissas. A melhor relação encontrada entre os pontos foi obtida através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Dessa forma, obteve-se uma relação linear (primeira ordem) entre a resposta do detector (y) e a concentração (x) da substância na amostra, que pode ser expressa pela equação $y = ax + b$, onde "a" é a inclinação da reta e "b" o ponto de interseção da reta com eixo das ordenadas. A partir desta curva padrão é possível determinar o coeficiente de correlação.

3.2.4.1.3.2 Precisão e exatidão

A precisão reflete a concordância entre resultados de análises simultâneas realizadas em um mesmo dia (precisão intra-ensaio) e também a concordância entre resultados de análises intercaladas realizadas sob diferentes condições (mudanças de equipamento, reagentes ou análises em dias diferentes - precisão interensaio), ambas obtidas de frações provenientes de uma mesma amostra homogênea (BRASIL - ANVISA, 2003). Esse parâmetro é normalmente expresso em porcentagem do coeficiente de variação (CV) de acordo (BRASIL - ANVISA, 2003) com expressão seguinte:

$$CV = \frac{S \times 100}{\bar{X}} \quad \text{Equação 2}$$

Onde S é a estimativa do desvio padrão e $\bar{X}$ é a média dos valores obtidos.

Exatidão, por sua vez, revela a concordância entre valores de concentração encontrados após os procedimentos analíticos (valor obtido) e aqueles teoricamente esperados (valor real). A exatidão (E) é expressa em porcentagem do erro sistemático ou relativo (BRASIL - ANVISA, 2003), através da expressão:

$$E = \frac{\text{Valor obtido} - \text{Valor real}}{\text{Valor Real}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

O método foi considerado preciso e/ou exato quando o CV (%) e o E (%) apresentaram-se menor que 15% como descrito pela ANVISA (BRASIL - ANVISA, 2003).

A) Precisão e exatidão intra-ensaio

A avaliação da precisão e exatidão intra-ensaio foi realizada analisando-se 10 amostras ($n = 10$) das soluções padrões preparadas em solução receptora, nas concentrações de 75 e 4000 ng mL⁻¹ do ácido *p*-cumárico. Simultaneamente, foi construída uma curva padrão com frações (1 mL) de solução receptora nas concentrações 0,025, 0,05, 0,1, 0,5, 1 e 5 µg mL⁻¹, em duplicata ($n = 2$) do ácido *p*-cumárico.

B) Precisão e exatidão interensaio

Para avaliação desse parâmetro, amostras de 1 mL de solução receptora nas concentrações de 75 e 4000 ng mL⁻¹ de ácido *p*-cumárico, foram analisadas em quintuplicata ($n = 5$), simultaneamente, durante 5 dias consecutivos. Novamente, para cada dia de análise, foi realizada uma curva padrão de modo idêntico ao descrito no estudo intra-ensaio.

3.2.4.1.3.3 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação é a concentração mais baixa da curva padrão, o qual deve apresentar uma precisão inferior a 20% (EUA – FDA, 2001). Para o método proposto, o limite de quantificação foi determinado avaliando amostras de solução receptora ($n = 5$) nas concentrações de 25 ng mL⁻¹ do ácido *p*-cumárico. Simultaneamente, foi construída uma curva padrão conforme descrito no estudo de precisão e exatidão.

3.2.4.1.3.4 Seletividade

Seletividade é a capacidade do método em diferenciar o analito de todas as outras substâncias presentes na amostra (CAUSON, 1997). A seletividade é avaliada comparando-se o tempo de retenção do analito com o tempo de retenção apresentados por possíveis interferentes da solução receptora, analisadas sob as mesmas condições.

Interferentes com tempos de retenção iguais ao analito e que produzam sinais de detecção inferiores a 20% daquele estabelecido para o LQ podem ser tolerados (EUA - FDA, 2001). Para esta determinação a solução receptora foi avaliada antes e depois dos estudos de liberação avaliando amostras do branco (formulação base – formulação sem extrato) e amostras da formulação adicionada do extrato.

3.2.4.1.3.5 Estabilidade

O método analítico empregado deve ser indicador de estabilidade, demonstrando especificidade e sensibilidade para os produtos de degradação eventualmente formados. A estabilidade de fármacos em solução depende de suas propriedades químicas, do solvente e do material de acondicionamento utilizado (BRASIL - ANVISA, 2003).

A) Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento

A estabilidade do ácido *p*-cumárico foi testada durante três ciclos de congelamento e descongelamento, utilizando três amostras ($n = 3$) das concentrações determinadas na validação do método (25 ng mL^{-1} e 4000 ng mL^{-1}). O estudo foi realizado nas seguintes condições: as amostras foram congeladas a -20°C por 24 horas e então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$). Quando completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas a -20°C , por 12 horas, e assim, sucessivamente, até completar os três ciclos. Após este período, as amostras foram analisadas por CLAE e os

valores (altura dos picos) obtidos foram comparados com valores obtidos de amostras frescas e a análise estatística foi realizada utilizando o programa Origin 5.0 pelo método do Teste t-student considerando $p \leq 0,05$ sendo estatisticamente significativa.

B) Estabilidade no tempo e condições de análise

Para a realização deste teste foram utilizadas três amostras ($n = 3$) das concentrações determinadas na validação do método analítico, como descrito anteriormente. Cada uma delas (protegidas da luz) foi submetida ao descongelamento natural, à temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$) e mantida durante 12 horas sobre a bancada de trabalho a 25°C e em banho-maria a 37°C , pois os estudos de liberação e permeação, descritos posteriormente, foram conduzidos nesta temperatura. Foi também realizado um experimento onde as amostras foram mantidas durante 12 horas sobre a bancada de trabalho a 25°C , porém, sem serem protegidas da luz. Após este período, as amostras foram analisadas por CLAE e novamente os valores obtidos (altura dos picos) foram comparados com valores obtidos de amostras frescas e a análise estatística foi realizada utilizando o programa Origin 5.0 pelo método do Teste t-student considerando $p \leq 0,05$ sendo estatisticamente significativa.

3.2.4.1.4 Aplicação do método

Após o desenvolvimento e validação, o método foi aplicado para a quantificação do ácido *p*-cumárico em extrato de própolis alcoólico, bem como nos estudos de liberação. O extrato de própolis alcoólico foi diluído 1.000 vezes em metanol e analisado no equipamento de CLAE. As amostras provenientes dos estudos de liberação foram injetadas diretamente no cromatógrafo sem sofrer nenhum processo de extração.

3.2.4.2 Determinação da atividade antioxidante por quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD

3.2.4.2.1 Equipamento e metodologia

A metodologia de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD e empregada para estas avaliações está descrita no item 3.2.2.5. Porém, para esta análise algumas mudanças foram necessárias, tais como o meio para diluição do extrato de própolis, passou a ser solução receptora, o volume de amostra passou a ser de 50 μL e o volume do meio reacional III passou a ser 360 μL , perfazendo o mesmo volume final descrito inicialmente.

3.2.4.2.2 Soluções de extrato de própolis

A solução estoque de extrato de própolis foi preparada diariamente em propilenoglicol na concentração de 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$. As soluções de extrato de própolis foram preparadas diariamente diluindo a solução estoque na solução receptora nas concentrações finais de 0,005, 0,007, 0,009 e 0,014 $\mu\text{L mL}^{-1}$. As soluções foram armazenadas em frasco âmbar, protegidas da luz direta durante o período de ensaio. Cada amostra foi avaliada em triplicata.

3.2.4.2.3 Validação

A validação do método foi realizada avaliando-se os principais parâmetros propostos por algumas agências regulamentadoras (BRASIL - ANVISA, 2003; EUA – FDA, 2001).

3.2.4.2.3.1 Linearidade do método quimioluminescente

No método desenvolvido, as curvas padrões foram construídas pela análise das soluções de extrato de própolis preparadas em solução receptora (triplicata para cada

concentração), obtendo concentrações finais de 0,005, 0,007, 0,009 e 0,014 $\mu\text{L mL}^{-1}$ no meio de reação.

As percentagens de inibição do sistema foram então plotadas no eixo das ordenadas e as respectivas concentrações no eixo das abscissas. A melhor relação entre os pontos encontrados foi obtida pela regressão linear pelo método dos mínimos quadrados como descrito no item 3.2.4.1.3.1.

3.2.4.2.3.2 Precisão

A definição e a fórmula para a determinação da precisão foram expostas no item 3.2.4.1.3.2.

A) Precisão intra-ensaio

A avaliação da precisão intra-ensaio foi realizada analisando-se em decuplicata ($n = 10$) as soluções de extrato de própolis preparadas em solução receptora e obtendo concentrações finais de 0,005, 0,007 e 0,014 $\mu\text{L mL}^{-1}$ no meio reacional.

B) Precisão interensaio

A avaliação da precisão interensaio foi realizada analisando-se em quintuplicata simultaneamente durante 5 dias ($n = 5$) consecutivos as soluções de extrato de própolis preparadas em solução receptora solução e obtendo concentrações finais de 0,005, 0,007 e 0,014 $\mu\text{L mL}^{-1}$ no meio reacional.

3.2.4.2.3.3 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação neste método, foi estabelecido como a concentração mais baixa da curva padrão, a qual deve apresentar uma precisão inferior a 20% (EUA – FDA,

2001). Para o método proposto, o limite de quantificação foi determinado analisando-se em quintuplicata ($n = 5$) a solução receptora adicionadas de extrato de própolis na concentração final de $0,005 \mu\text{L mL}^{-1}$ no meio reacional.

3.2.4.2.3.4 Estabilidade

O método analítico empregado deve ser indicador de estabilidade, demonstrando especificidade e sensibilidade para os produtos de degradação eventualmente formados. A estabilidade de fármacos depende de suas propriedades químicas do solvente e do material de acondicionamento utilizado (BRASIL - ANVISA, 2003).

A) Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento

A estabilidade das amostras de solução receptora adicionada de extrato de própolis foi testada durante três ciclos de congelamento e descongelamento, utilizando três amostras ($n = 3$) das concentrações $0,005$, $0,007$ e $0,014 \mu\text{L mL}^{-1}$ determinadas na validação do método, sendo que cada amostra foi avaliada em triplicata. O procedimento do estudo foi descrito no item 3.2.4.1.3.5. Após os ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras foram avaliadas quanto à atividade antioxidante por quimioluminescência. As porcentagens de inibição do sistema causado pelas amostras foram comparados com as porcentagens de inibição obtidas de amostras frescas e a análise estatística foi realizada utilizando o programa Origin 5.0 pelo método do Teste t-student considerando $p \leq 0,05$ sendo estatisticamente significativa.

B) Estudo da estabilidade da atividade antioxidante por 24 horas a 37°C

Um volume de $2.500 \mu\text{L}$ de extrato de própolis foi primeiramente solubilizado em propilenoglicol (5 mL) – sendo esta a mesma proporção extrato/propilenoglicol adicionadas

no preparo de 100 g de formulação. Uma alíquota desta solução (75 µL), que corresponde à quantidade de extrato presente em 1 grama de formulação, foi adicionada a 11,92 mL da solução receptora no compartimento receptor da célula de Franz (Figura 6), perfazendo um volume total de 12 mL. Esta solução foi mantida sob agitação por 24 horas a 37°C por um banho circulante que envolvia as células de Franz. Uma alíquota foi retirada das células nos tempos 0, 4, 8, 12 e 24 horas. Estas amostras foram congeladas a -20°C até o momento da análise da atividade antioxidante por quimioluminescência ser realizada. As porcentagens de inibição do sistema causado pelas amostras foram comparados com a porcentagem de inibição obtida no tempo = 0 e a análise estatística foi realizada utilizando o programa Origin 5.0 pelo método do Teste t-student considerando $p \leq 0,05$ sendo estatisticamente significativa. Os experimentos foram conduzidos em duplicata, sendo cada amostra avaliada em triplicata.

3.2.4.2.4 Aplicação do método

Após o desenvolvimento e validação, o método foi aplicado novamente para a determinação da atividade antioxidante do EPA (curva dose-resposta). Além disso, este método também foi utilizado para determinar a atividade antioxidante do ácido *p*-cumárico. O ácido *p*-cumárico foi diluído em metanol, obtendo concentrações finais de 0,375, 0,75, 1,5 e 3 µg mL⁻¹ no meio reacional e o branco utilizado foi metanol. As amostras foram avaliadas em triplicata.

3.2.4.3 Estudo de “Sink Conditions” para a avaliação da atividade antioxidante nos estudos de liberação, permeação e retenção cutânea

É muito importante determinar a solubilidade do ativo previamente a um estudo de liberação e/ou permeação, pois a solução receptora utilizada nestes experimentos deve ser capaz de solubilizar todo ativo que sofrer difusão por uma membrana de forma que ela não

sature e seja um fator limitante nestes experimentos. Como uma regra geral, a expressão “sink conditions” significa que a concentração do permeante não deve exceder 10% da solubilidade de saturação da solução receptora (BRONAUGH; COLLIER, 1993). Porém, é uma tarefa difícil determinar a solubilidade do extrato de própolis, tendo a atividade antioxidante como objetivo de estudo. Desta forma, foi realizado um experimento com o objetivo de avaliar se a solução receptora seria capaz de solubilizar 10 vezes mais a quantidade de ativo que está presente na formulação. Assim, 10 vezes mais do conteúdo de EPA contido em 1 grama de formulação (250 μ L, amostra A) e a quantidade contida em 1 grama de formulação (25 μ L, amostra B) foram solubilizados na solução receptora dos experimentos de liberação, permeação e retenção descrita posteriormente.

Para a realização destes experimentos, 2.500 μ L de EPA foi primeiramente solubilizado em propilenoglicol (5 mL) – sendo esta a mesma proporção extrato/propilenoglicol adicionadas no preparo de 100 g de formulação. Aliquotas de 750 μ L e 75 μ L foram adicionadas a 11,25 mL e 11,92 mL (Amostras A e B, respectivamente) da solução receptora no compartimento receptor da célula de Franz, perfazendo um volume total de 12 mL. Estas soluções foram então agitadas por uma barra magnética por 1 hora e mantidas a 37°C por um banho circulante que envolvia as células de Franz (Figura 6). Aliquotas destas soluções foram retiradas e diluídas com o tampão do meio reacional (meio III), 100 e 10 vezes para a avaliação da atividade antioxidante por quimioluminescência (3.2.4.2), das amostras A e B, respectivamente. As porcentagens de inibição do sistema (aproximadamente 50%) causado pelas amostras A e B foram comparadas entre si. A análise estatística foi realizada utilizando o programa Origin 5.0 pelo método do Teste t-student considerando resultados estatisticamente significantes quando $p \leq 0,05$. Os experimentos foram conduzidos em duplicata, sendo cada amostra avaliada em triplicata.

Figura 6 – Célula de difusão tipo Franz modificada.

3.2.4.4 Estudo de liberação *in vitro* de formulações tópicas adicionadas de extrato de própolis

Os experimentos de liberação foram realizados utilizando células de difusão modificadas (células de Franz) com $1,77 \text{ cm}^2$ de área de difusão. Uma membrana de éster de celulose HA com tamanho de poro de $0,45 \mu\text{m}$ foi colocada entre o compartimento doador e receptor da célula de Franz. Amostras de 1 g das formulações foram colocadas sobre a membrana e o compartimento receptor foi preenchido com 12 ml da solução receptora composta por tampão KH_2PO_4 isotônico 20 mmol L^{-1} (pH 7.4) adicionado de 0,5% (v/v) polissorbato 20 (Tween 20) com o objetivo de assegurar “sink conditions”. A solução receptora foi agitada por uma barra magnética e mantida a 37°C por um banho circulante que envolvia as células. Seis células de difusão foram utilizadas nos experimentos, sendo que uma delas foi utilizada como branco, onde foi adicionado formulação base sem extrato. Desta

forma, a solução receptora das formulações base foram utilizados como referências nos ensaios analíticos.

Amostras da solução receptora (600 µL) foram coletadas das células de Franz nos seguintes intervalos: 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas para avaliar a cinética de liberação e o mesmo volume da solução receptora fresca foi recolocada. As amostras foram armazenadas a -20°C até serem avaliadas.

Nestes estudos de liberação, foi avaliado tanto a liberação do marcador proposto (ácido *p*-cumárico), como da atividade antioxidante. A quantificação do ácido *p*-cumárico na solução receptora foi realizada utilizando a curva padrão obtida na validação do método por CLAE (3.2.4.1). A quantificação da atividade antioxidante determinada por quimioluminescência na solução receptora foi realizada utilizando a curva padrão, que relaciona a % de inibição da quimioluminescência *versus* a concentração de extrato de própolis no meio reacional (3.2.4.2). A atividade antioxidante das amostras foi expressa como equivalentes ao extrato de própolis (EEP), pois não são todos os componentes do extrato que são disponíveis para serem liberados da formulação.

O perfil de liberação das formulações desenvolvidas foi avaliado matematicamente seguindo os modelos de ordem zero (concentração *versus* tempo), pseudoprimeira ordem (concentração *versus* raiz quadrada do tempo) e primeira ordem (Log da concentração *versus* tempo). Os coeficientes de correlação (*r*) da fração linear das curvas de liberação foram estabelecidos através da inclinação da reta obtida pela regressão linear da curva de liberação construída seguindo os diferentes modelos de liberação.

Os coeficientes de difusão foram calculados usando a equação de Higuchi (LARRUCEA et al., 2001, HIGUCHI, 1962) que está apresentada a seguir:

$$Q = 2C_0 \left[\frac{Dt}{\pi} \right]^{1/2} \quad \text{Equação 4}$$

onde, Q = quantidade liberada em $\mu\text{g cm}^{-2}$ no tempo t ; C_0 = quantidade inicial do fármaco adicionado em μg ; D = coeficiente de difusão; t = tempo de experimentação em segundos.

3.2.4.5 Estudo de permeação e retenção *in vitro* das formulações tópicas adicionadas de extrato de própolis

3.2.4.5.1 Permeação

Os experimentos de permeação com pele de camundongo sem pêlo (linhagem HRS/J) foram realizados após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética da Universidade de São Paulo (em anexo). Camundongos sem pêlo macho foram sacrificados em câmara de CO_2 e a pele da região dorsal dos animais foi cuidadosamente removida com a ajuda de tesoura e bisturi. Vasos sanguíneos, gordura e tecidos não desejados foram retirados, sendo que somente a derme e a epiderme foram isoladas. Para a realização dos experimentos de permeação com pele de orelha de porco (obtidas em abatedouro logo após o abate do animal), as orelhas foram limpas com água corrente e então a pele da porção externa da orelha foi retirada como o procedimento descrito anteriormente. As peles de camundongo e de porco foram armazenadas a -20°C até o ensaio por um período de no máximo 30 dias.

Os experimentos de permeação foram realizados conforme protocolo descrito para estudo de liberação (item 3.2.4.4) sendo a membrana de ester de celulose substituída por pele de camundongo ou de orelha de porco. Desta forma, uma porção de pele foi acondicionada entre o compartimento doador e receptor da célula de Franz de forma que o extrato córneo foi

mantido em contato com a formulação e a derme em contato com a solução receptora. O experimento foi conduzido por 12 horas, sendo que após este período amostras da solução receptora foram retiradas e armazenadas a - 20°C até a atividade antioxidante ser quantificada por quimioluminescência como descrito no item 3.2.4.2. As peles que sofreram permeação foram limpas com algodão embebido em água destilada e então avaliadas quanto à retenção. Foi realizada análise estatística utilizando o programa Origin 5.0 pelo método do Teste t-student considerando $p \leq 0,05$ sendo estatisticamente significativa.

3.2.4.5.2 Retenção

A) Retenção total na pele de camundongo sem pêlo

A área da pele de camundongo exposta à permeação, após ser limpa, foi pesada antes do processo de extração. Esta região foi picotada e adicionada em tubo de Beckman contendo 3 mL de metanol e foi então triturada com a ajuda de Turrax por 1 minuto a 18000 rpm. Este homogenato foi levado ao ultra-som por 15 minutos, foi agitado em agitador de tubos por 1 minuto a 2200 rpm e centrifugado a 9000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado utilizando membrana Millex LCR com membrana PTFE modificada com poros de 0,45 µm e submetido à secagem sob ar comprimido. As amostras foram ressuspensas em 300 µL de metanol para serem ensaiadas pelo método de atividade antioxidante por quimioluminescência como descrito anteriormente. A utilização de metanol para ressuspender as amostras provenientes de extração das peles, não influenciaram significativamente no método quimioluminescente, sendo que a curva padrão de extrato de própolis e o branco da reação também foram realizados com metanol.

B) “Tape stripping” e retenção na pele de porco

A área da pele de porco exposta à permeação (formulação) é evidente e após ser limpa e isolada por um “template”, sofreu processo de retirada do extrato córneo por “tape stripping”, sendo que a epiderme viável e a derme foram avaliadas na retenção.

- “Tape stripping”: Esta técnica consiste na retirada do extrato córneo da pele pela utilização de fitas adesivas (SURBER; SCHWART; SMITH, 1999). Desta forma, 15 pedaços de fitas adesivas transparente foram cortadas e pressionados de forma uniforme sobre a área de pele isolada pelo “template”. O 1º. pedaço de fita foi descartado e os outros pedaços foram colocados em tubo de ensaio, onde foi adicionado 2 mL de metanol. O tubo foi agitado por 1 minuto em agitador de tubos a 2200 rpm e permaneceu por 15 minutos no ultra-som. O solvente foi retirado com a ajuda de uma pipeta de Pasteur, filtrado com membrana Millex LCR com membrana PTFE modificada com poro de 0,45 µm, seco sob ar comprimido e ressuspensionado em 500 µL de metanol para ser ensaiado no método de atividade antioxidante por quimioluminescência como descrito anteriormente.

- Retenção: A epiderme viável e a derme sofreram então processo de extração como descrito no item 3.2.4.5.2 - A. Após as amostras serem secas sob ar comprimido, estas foram ressuspensionadas em 500 µL de metanol para serem ensaiadas no método de atividade antioxidante por quimioluminescência como descrito anteriormente.

Estes volumes, onde as amostras foram ressuspensionadas, foram determinados previamente com o objetivo de otimizar a performance da amostra na quimioluminescência e de diminuir a presença de interferentes antioxidantes provenientes da pele. Foi realizada análise estatística utilizando o programa Origin 5.0 pelo método do Teste t student considerando $p \leq 0,05$ sendo estatisticamente significativa.

3.2.4.5.3 Estudo de interferentes no método de retenção cutânea

Este experimento foi realizado utilizando somente pele da orelha de porco. A recuperação de um método bioanalítico é realizada comparando-se a resposta de uma matriz contaminada e processada com uma amostra padrão pura que não sofreu um pré-tratamento. A recuperação é expressa em porcentagem de recuperação e indica se o método fornece uma resposta para a quantidade de analito que está presente na amostra (CAUSON, 1997).

Como descrito por Röpke e colaboradores (2002) para realizar o estudo de interferentes e a recuperação em um estudo de retenção cutânea, a pele deve ser enriquecida com concentrações conhecidas do composto a ser analisado e sofrer processo de extração. Porém, para avaliarmos corretamente mimetizando as condições em que a pele de porco sofreu extração, esta foi primeiramente submetida ao procedimento de “tape stripping” para retirada do estrato córneo. Desta forma, somente a epiderme viável e a derme foram picotadas e transferidas para um tubo de Beckman contendo 2,5 mL de metanol. Os tubos foram enriquecidos com 500 µL de soluções de extrato de própolis alcoólico, de forma que após o processo de extração renderiam concentrações finais no meio reacional da quimioluminescência de 0,007 e 0,014 µL mL⁻¹. As amostras de pele contaminadas de extrato de própolis sofreram processo de extração como descrito no item 3.2.4.5.2 - A e foram ressuspensas em 500 µL de metanol para a avaliação da atividade antioxidante por quimioluminescência como descrito anteriormente. A porcentagem de inibição encontrada para as amostras foram comparadas com a porcentagem de inibição de amostras de extrato de própolis recém-preparadas na mesma concentração final no meio reacional, sendo que desta forma foi possível calcular a porcentagem da atividade recuperada. Os experimentos foram conduzidos em triplicata para cada concentração, sendo cada amostra avaliada em quintuplicata.

3.2.5 Estudos preliminares da eficácia *in vivo* (fotoquimioproteção) da formulação adicionada de extrato de própolis

3.2.5.1 Animais experimentais

Como modelo animal foram usados camundongos sem pêlo (total de 48 animais), de ambos os sexos, adultos (peso médio de 30 g) linhagem HRS/J após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética da Universidade de São Paulo (em anexo). Os animais foram criados no biotério da FCFRP-USP com suprimento de água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Comitê de Ética da FCFRP-USP.

3.2.5.2 Sistema e fonte de radiação UVB

A fonte de luz utilizada nos experimentos de indução da formação de radicais livres foi uma lâmpada UVB fluorescente modelo Philips TL/12 40W RS Medical-Holand (CARINI et al., 2000; ROSA, 2002). A lâmpada emite radiação na faixa de λ de 270 a 400 nm, com pico máximo de emissão em torno de 313 nm.

A fonte de luz UVB foi instalada em um compartimento de madeira desenvolvido para os experimentos de indução de estresse oxidativo (Figura 7). As caixas plásticas contendo os camundongos sem pêlo foram colocadas a uma distância de 20 cm abaixo da lâmpada (ROSA, 2002). A parte superior das caixas plásticas foi coberta com uma tela plástica (1 mm de espessura, aberturas de 2 mm x 2 mm) para manter os animais dentro das caixas com as suas regiões dorsais diretamente expostas à radiação UV. Os animais movimentaram livremente na caixa durante a radiação.

Figura 7 – Compartimento de madeira contendo a fonte de luz UVB utilizado nos experimentos de indução de estresse oxidativo na pele de camundongos sem pêlo. 1: tampa superior; 2: lâmpada UVB; 3: tampa frontal; 4: local para ventilação; 5: acionamento da lâmpada UVB.

3.2.5.3 Medida da irradiância da lâmpada UVB

A medida da irradiância, taxa do fluxo de energia em Watts cm^{-2} , foi feita utilizando radiômetro modelo IL 1700 com detectores para radiação UV (SED 005) e UVB (SED 240), cedido pelo laboratório de Tecnologia Farmacêutica da FCFRP-USP. A irradiância foi medida na presença da tela plástica, na mesma altura que os animais permaneciam em todas as divisões do compartimento (ROSA, 2002). A dose de exposição (J cm^{-2}) foi calculada multiplicando a irradiância pelo tempo de exposição em segundos.

3.2.5.4 Determinação da Dose Eritematogênica Mínima (DEM)

Para determinar a DEM foram empregados 3 grupos de animais ($n = 3$, total de 9 animais). A parte dorsal superior de cada animal foi coberta com uma fita plástica adesiva preta (Kolex-Poli[®]) como mostra a Figura 8. Os animais foram colocados no compartimento de madeira contendo a lâmpada UVB e foram expostos por um período de 2, 4 e 6 minutos de irradiação. Após cada período, um grupo de animais foi retirado da exposição à radiação. Ao final do experimento, as fitas plásticas foram cuidadosamente retiradas e os animais

receberam água e ração normalmente. Após um período de tempo de 4, 18, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas, os animais foram observados macroscopicamente quanto ao aparecimento de eritema, edema e descamação (DI MAMBRO 2005a; FLINDT-HANSEN et al., 1990; ROSA, 2002).

Figura 8 – Representação da avaliação da formação do eritema nos animais expostos à radiação UVB por 2, 4 e 6 minutos. Animal com a fita plástica durante a exposição à radiação UVB.

3.2.5.5 Avaliação da inibição da formação de eritema pela formulação adicionada de extrato de própolis

Neste estudo foram empregados 18 animais e a formulação 2 (Polawax[®]) adicionada ou não de 2,5% (v/p) de extrato de própolis alcoólico foi utilizada para a avaliação da inibição da formação de eritema. Os animais foram avaliados em 2 protocolos de tratamento e foram divididos em 6 grupos (n = 3) (2 grupos Controle, 2 grupos tratados com F2 base e 2 grupos tratados com a F2 adicionada de EPA). No protocolo de tratamento 1, as formulações testes (500 mg) contendo ou não EPA foram aplicadas 3 vezes por dia, por 3 dias na região dorsal dos animais e no terceiro dia, 1 hora após o último tratamento, os animais foram irradiados. No protocolo de tratamento 2, os animais receberam o mesmo tratamento que o grupo 1 e, em adição, os animais foram tratados por mais dois dias após a irradiação (3 vezes por dia).

Durante a exposição à radiação UVB a parte dorsal superior de cada animal foi coberta (parcialmente) com uma fita plástica adesiva preta com o objetivo de proteger esta área da irradiação. Os animais foram expostos à uma dose de irradiação correspondente à 2 DEM dentro de suas caixas. Paralelamente, em cada série de experimentos, foi feito um grupo controle cujos animais foram tratados com água.

Os animais foram avaliados visualmente quanto à formação de eritema, edema e descamação, como também avaliados utilizando o aparelho Chromameter (Minolta – CR200). O Chromameter é um equipamento colorimétrico que tem sido utilizado para determinar o eritema por vários autores (MONTENEGRO et al., 1995; MUIZZUDIN et al., 1990). O Chromameter mede os níveis de cor, sendo que o valor “a” é a indicação da medida da cor vermelha (LIN et al., 2003). Desta forma, foram realizadas 3 medidas em cada área de avaliação (a área coberta com uma fita plástica adesiva preta durante a irradiação foi medida para comparação). A diferença do valor “a” entre a pele irradiada e a não irradiada determinou o eritema.

3.2.5.6 Avaliação da inibição da depleção dos níveis de GSH

3.2.5.6.1 Determinação da dose de irradiação para depleção dos níveis de GSH

Considerando que a exposição da pele à irradiação UVB induz o processo inflamatório, foi necessário determinar a dose de irradiação UVB capaz de induzir a depleção dos níveis endógenos do GSH. Para esta avaliação, foram utilizados 6 animais divididos em dois grupos (n = 3). Os animais do grupo 1 serviram como controle e não foram irradiados, os animais do grupo 2 foram irradiados por um período de 2 horas e 40 minutos, correspondendo à uma dose de $2,5038 \text{ J cm}^{-2}$, como proposto por Casagrande et al.(2006b).

3.2.5.6.2 Avaliação da inibição da depleção do GSH pela formulação adicionada de extrato de própolis

Os animais foram divididos em 5 grupos ($n = 3$, totalizando 15 animais), 2 grupos não-irradiados (grupos 1 e 2) e 3 grupos irradiados (grupos 3, 4 e 5). Os animais foram tratados com F2 contendo 2,5% (v/p) de extrato de própolis (grupos 2 e 5), somente com a formulação base (sem adição de EPA – grupo 3) ou ainda, não foram tratados (grupos 1 e 4). O protocolo de tratamento consistiu na aplicação de 500 mg das formulações testes na porção dorsal dos animais, 1 hora antes e imediatamente antes da exposição à irradiação UVB.

Os níveis de GSH na pele dos animais foram determinados usando um ensaio fluorescente como descrito previamente (HISSIN; HILF, 1976). Após 2 horas da exposição à irradiação UVB, os animais foram sacrificados em câmara de CO_2 , e a pele da região dorsal foi removida e armazenada a -80°C até o momento da análise.

A pele total dos camundongos foi homogeneizada (1:3) em tampão NaH_2PO_4 100 mM (pH 8,0) contendo EGTA 5 mM usando Turrax a 21500 rpm por 2 min. Este homogenato foi tratado com 200 μL de $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$ (ácido tricloroacético) 30% (v/v) mL^{-1} de tampão NaH_2PO_4 (100 mM, pH 8,0, contendo EGTA 5 mM) e, então, centrifugado a 4000 rpm por 6 min. O sobrenadante foi transferido para tubos *eppendorf* e novamente centrifugado a 3000 rpm por 10 min a 4°C . A fluorescência do sobrenadante resultante foi medida em um espectrofotômetro de fluorescência. Para esta reação, 100 μL do sobrenadante (300mg tecido mL^{-1}) foi misturado à 1 mL de NaH_2PO_4 100 mM (pH 8.0) contendo EGTA 5 mM e 100 μL de OPT (o-ftalaldeído – 1 mg mL^{-1} em metanol). A fluorescência foi determinada depois de 15 minutos ($\lambda_{\text{exc}}=350$ nm; $\lambda_{\text{em}}=420$ nm). A curva padrão foi preparada com GSH na concentração de 0-40 μM em triplicata.

4. Resultados e Discussão

4.1 Caracterização química dos extratos de própolis

4.1.1 Determinação do teor de polifenóis e de flavonóides

Os polifenóis são responsáveis pela maior parte da capacidade antioxidante na maioria dos produtos derivados de plantas e, desta forma, sua determinação é de suma importância na caracterização de extratos de própolis. O método utilizado foi de Folin-Ciocalteu, que é capaz de determinar simples derivados do benzeno, bem como hidroxicinamatos, tocoferols e flavonóides presentes em plantas e alimentos, além de também ser capaz de determinar derivados de tirosina e DOPA em produtos animais e aditivos como propil galato em alimentos (SINGLETON; ORTHOFER; LAMULA-RAVENTÓS, 1999).

O princípio do método é a propriedade do íon fenolato ser oxidado, ou seja, doar um elétron facilmente. Esta facilidade do íon fenolato em ser oxidado é completa em pH próximo a 10, o qual também é o pKa do fenol. O reagente Folin-Ciocalteu reage completamente e rapidamente com compostos fenólicos nas amostras, quando carbonato de sódio saturado é adicionado ao meio reacional. Este método é considerado muito útil devido à sua reprodutibilidade, entendimento de suas bases e sua aplicabilidade verificada (SINGLETON; ORTHOFER; LAMULA-RAVENTÓS, 1999).

A estimativa do conteúdo de flavonóides totais em amostras de plantas também é muito utilizada. Para a determinação de flavonóides totais das amostras de extrato de própolis foi utilizado o método colorimétrico com cloreto de alumínio, cujo princípio baseia-se na formação de um complexo estável entre o cloreto de alumínio com o C4 do grupo ceto e os grupos hidroxila dos carbonos C3 e C4 de flavonas e flavonols (CHANG et al., 2002). A formação do complexo é vantajosa na análise espectrofotométrica, pois, além de permitir um desvio para maiores comprimentos de onda, evitando a interferências de outras substâncias fenólicas, também causa uma intensificação da absorção (WOISKY, 1996). No entanto, a

estimativa do teor de flavonóides totais pode estar subestimada na amostra, pois outros flavonóides com estruturas diferentes que não são detectados por este método, como a flavanona isosakuranetina, têm sido detectados na análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (FUNARI; FERRO; MATHOR, 2007).

Para a determinação do teor de polifenóis e flavonóides nos EPA e EPG foram construídas curvas padrões utilizando ácido gálico e quercetina como padrões de referência secundário, respectivamente. O teor de polifenóis foi determinado através da equação $y = 0,030x - 0,0026$ ($r = 0,9995$) e o teor de flavonóides foi determinado através da equação $y = 0,039x - 0,014$ ($r = 0,9992$). Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 – Concentração de polifenóis e flavonóides nos extratos de própolis

	<i>Polifenóis totais</i>		<i>Flavonóides totais</i>	
	<i>(mg g⁻¹)</i>	<i>(%)</i>	<i>(mg g⁻¹)</i>	<i>(%)</i>
EPA	13,3 ± 0,52	1,3	4,7 ± 0,15	0,47 %
EPG	13,3 ± 0,40	1,3	4,6 ± 0,18	0,46 %

Os resultados representam a média ± o desvio padrão de 3 determinações.

Os teores de polifenóis e de flavonóides determinados nestes extratos de própolis comerciais estão dentro dos valores estipulados nas normas da legislação brasileira (BRASIL - Instrução Normativa nº3, 2001) que determina no mínimo 0,5 % de polifenóis e 0,25% de flavonóides. Também foi realizada a avaliação do espectro de absorção na região do UV destes extratos que, mais uma vez, está de acordo com as normas da legislação brasileira. No entanto, foi difícil comparar os EPA e EPG com os extratos avaliados por outros autores, pois os extratos são preparados de forma diferente em cada trabalho (com teor de sólidos totais diferentes), além de existir a influência da origem botânica de onde a própolis é coletada. Como por exemplo, Kumazawa e colaboradores (2004) encontraram em extratos de própolis

alcoólico de diferentes regiões do mundo a variação de 31,2 a 299,0 mg g⁻¹ de polifenóis e a variação de 2,5 a 176,0 mg g⁻¹ de flavonóides. Estes autores encontraram na amostra de origem brasileira 120 mg g⁻¹ de polifenóis e 51,9 mg g⁻¹ de flavonóides. Desta forma, seria mais adequado compararmos os teores de polifenóis e flavonóides obtidos neste presente trabalho apenas com outros extratos de própolis comercializados e de origem brasileira. Como por exemplo, Fonseca (2007) encontrou em extrato fluído de própolis verde 18,27 mg g⁻¹ e 2,29 mg g⁻¹ de polifenóis e flavonóides, respectivamente. Enquanto que Chang e colaboradores (2002) encontraram em extratos alcoólicos de própolis de 10 a 14 mg g⁻¹ de flavonóides.

A diferença nos teores de polifenóis e flavonóides observada mesmo para extratos comerciais de origem brasileira deve estar relacionada à composição química da própolis, que depende da especificidade da flora no local de coleta e, portanto das características geográficas e climáticas do local (BANKOVA, 2005), podendo assim, variar no mesmo país.

4.2 Avaliação da atividade antioxidante do extrato de própolis

4.2.1 Determinação da inibição da peroxidação lipídica induzida por Fe⁺² pelos extratos de própolis

Os extratos foram avaliados quanto à inibição da formação de MDA, que é um produto secundário gerado na peroxidação lipídica da mitocôndria. A detecção e medida da peroxidação lipídica é a evidência mais freqüente citada para suportar o envolvimento de reação de radicais livres em toxicologia e em doenças humanas.

Em um sistema completamente livre de peróxidos lipídicos, a presença de Fe⁺² inicia a reação de Fenton/Harber Weiss, gerando radical hidroxila ([•]OH). O radical [•]OH produzido pode iniciar um processo de peroxidação lipídica removendo átomos de hidrogênio dos

fosfolipídios (PUFA-ácidos graxos poliinsaturados) presentes nas mitocôndrias e formando radicais lipídicos peroxila ($\text{ROO}^\bullet$), e assim, induzindo uma sequência de reações de propagação (RODRIGUES et al., 2002), onde outros radicais como os hidroperóxidos (ROOH) são formados.

Porém, na preparação do homogenato de fígado de ratos para obtenção da mitocôndria, ocorre a formação de peróxidos lipídicos pela ação de enzimas liberadas na maceração do tecido. Na presença de sais de Fe^{+2} estes peróxidos lipídicos são decompostos e originam radicais peroxila e alcoxila ($\text{ROO}^\bullet$ e $\text{RO}^\bullet$), sendo que ambos radicais podem sequestrar hidrogênio e propagar a peroxidação lipídica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

Estes radicais formados são espécies lábeis que sofrem mudanças e deterioração levando a formação de produtos secundários tais como o pentanal, hexanal, 4-hidroxinonenal e principalmente malondialdeído (MDA). O MDA é um aldeído que se complexa com 2 moléculas de TBA (ácido tiobarbitúrico), gerando um cromóforo rosa que é detectado espectrofotometricamente em 535 nm (FERNÁNDEZ; PÉREZ-ÁLVAREZ; FERNÁNDEZ-LOPEZ, 1997).

Portanto, a capacidade de um composto antioxidante em inibir a peroxidação lipídica neste sistema se deve provavelmente ao sequestro de peróxidos lipídicos e/ou pela capacidade em quelar íons Fe^{+2} .

Foi observado que os extratos de própolis protegem a membrana microsomal contra peroxidação lipídica de forma dose-dependente (Figuras 09 e 10), apresentando na amostra EPA uma faixa de linearidade entre 0,0125 e 0,05 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e coeficiente de correlação linear de 0,992 (Figura 11A) e na amostra EPG entre as concentrações de 0,0125 e 0,04 $\mu\text{L mL}^{-1}$ foi observado uma quase linearidade com coeficiente de correlação linear de 0,971 (Figura 11B). O EPA apresentou IC_{50} de 0,030 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e o EPG apresentou IC_{50} de 0,023 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

Figura 9 – Medida da atividade inibidora da peroxidação lipídica pelo extrato de própolis alcoólico. As concentrações finais do extrato de própolis no meio reacional foram: 0,00625; 0,0125; 0,02; 0,025; 0,03; 0,04; 0,05 e 0,1 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações.

Figura 10 – Medida da atividade inibidora da peroxidação lipídica pelo extrato de própolis glicólico. As concentrações finais de extrato de própolis no meio reacional foram: 0,00625; 0,0125; 0,02; 0,025; 0,03; 0,04; 0,05 e 0,1 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações.

Figura 11 – Faixa de linearidade no método de medida da atividade inibidora da peroxidação lipídica pelos extratos de própolis alcoólico e glicólico. (A) As concentrações finais do extrato de própolis alcoólico no meio reacional foram: 0,0125; 0,02; 0,025; 0,03; 0,04 e 0,05 $\mu\text{L mL}^{-1}$; (B) As concentrações finais do extrato de própolis glicólico no meio reacional foram: 0,0125; 0,02; 0,025; 0,03 e 0,04 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações.

O efeito do extrato de própolis aquoso (brasileiro) na inibição da peroxidação lipídica em homogenato de cérebro de rato apresentou um IC_{50} de 0,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (NAKAJIMA et al., 2007). Enquanto que na avaliação de extratos e frações de extratos de própolis (brasileiro), Wang e colaboradores (2004) observaram, uma forte inibição da peroxidação lipídica utilizando homogenato de fígado de rato, na concentração de 2 mg mL^{-1} , e esta atividade foi relacionada a presença de flavonóides. Porém, sabe-se que outros compostos além destes, estariam envolvidos na atividade antioxidante de extratos de própolis. Compostos fenólicos, além dos flavonóides, foram avaliados contra a peroxidação de ácido linoleico em uma solução micelar, e estes apresentaram atividade até maior que o antioxidante bem conhecido BHT (butil hidroxitolueno) (BANSKOTA; TEZUKA; KADOTA, 2001). Em um estudo utilizando cultura de células, foi proposto, dentre os compostos fenólicos presentes na própolis brasileira, que a Artepeline C é uma forte candidata a ser responsável pela atividade antilipoperoxidativa (SHIMIZU et al., 2004).

Santos e colaboradores (1998), ao avaliar a atividade antioxidante de flavonóides, observou que a presença dos grupos estruturais *o-dihidroxil* no anel B, dupla ligação no C2 e C3 em conjugação com a função *4-oxo* e a presença adicional de grupos *hidroxila* nos C3 e C5 (com exceção da quercetina e a *3'-O-metil-quercetina*), foram os mais potentes inibidores da peroxidação lipídica utilizando mitocôndria como fonte de lipídio. Esta atividade antioxidante se deve também a quelação do Fe, o que pode explicar a atividade de flavonóides e de polifenóis que não possuem grupos estruturais descritos acima (OZGOVÁ; HERMÁNEK; GUT, 2003).

Como já mencionado, é difícil a avaliação de extratos de própolis provenientes de origens botânicas diferentes e obtidos por métodos diferentes. Porém, a atividade antioxidante dos extratos em estudo (IC_{50} de 0,030 e 0,023 $\mu\text{L mL}^{-1}$, correspondendo aproximadamente a 30 e 23 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para EPA e EPG, respectivamente) pode ser comparada com outros extratos e substâncias isoladas que foram avaliadas no laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Como por exemplo, o extrato fluído de própolis verde apresentou IC_{50} de 10,09 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (FONSECA, 2007), o Isoflavin Beta[®] e o red clover (extratos de soja contendo mistura de isoflavonóides) apresentaram IC_{50} de 21,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 10,34 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (GEORGETTI, 2004), extrato de *Glycyrrhiza glaba* apresentou IC_{50} de 0,07 $\mu\text{L mL}^{-1}$, extrato de *Ginkgo biloba* apresentou IC_{50} de 0,05 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (DI MAMBRO; FONSECA, 2005b), a quercetina apresentou IC_{50} de 0,34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (CASAGRANDE, 2005), enquanto que 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de vitamina E inibiu 78% deste sistema (DI MAMBRO; FONSECA, 2005b) e, a superóxido dismutase (SOD) a 0,04 $\mu\text{L mL}^{-1}$ não apresentou atividade neste sistema (DI MAMBRO, 2005a). Além disso, podemos levar em consideração que os extratos em questão apresentam 11% de sólidos totais, onde estão presentes os seus constituintes químicos e, portanto estes são responsáveis pela atividade biológica. Assim, os valores de IC_{50} destes extratos

poderiam ser expressos como 3,30 e 2,53 μg sólidos totais mL^{-1} , para EPA e EPG, respectivamente, tornando suas atividades antioxidantes mais relevantes, sugerindo que os mesmos apresentam uma potencial utilização tópica para prevenir o dano foto-oxidativo.

4.2.2 Determinação da inibição da degradação da deoxirribose pelos extratos de própolis

O radical hidroxila é gerado quando um quelato de $\text{Fe}^{+3}/\text{EDTA}$ é incubado com deoxirribose em tampão fosfato (pH 7,4). Os radicais que não são sequestrados pelo EDTA atacam a deoxirribose e iniciam uma série de reações que originam a formação de MDA. A taxa de degradação da deoxirribose é aumentada incluindo um agente redutor como o ácido ascórbico e a adição de uma quantidade extra de H_2O_2 , acelera ainda mais esta reação. Os produtos (MDA) da degradação da deoxirribose quando aquecidos com TBA, em pH baixo, formam um cromóforo rosa que pode ser detectado espectrofotometricamente em 535 nm (ARUOMA, 1994; HALLIWELL; GUTTERIDGE; ARUOMA, 1987).

Qualquer outra molécula adicionada na reação que seja capaz de reagir com o $\bullet\text{OH}$ poderá competir com a deoxirribose por este radical, diminuindo assim, a degradação deste açúcar e subsequente formação de MDA. O uso do EDTA, no meio de reação, é essencial quando se utiliza substâncias queladoras de íons ferros, pois a inibição da degradação da deoxirribose ferro dependente, na ausência do EDTA, dependerá não somente da capacidade do antioxidante em reagir com o radical $\bullet\text{OH}$, mas também da sua capacidade em formar complexos com íon ferro (ARUOMA, 1994; HALLIWELL; GUTTERIDGE; ARUOMA, 1987).

Os extratos de própolis apresentaram uma atividade sequestradora do radical hidroxila dose-dependente, como observado nas Figuras 12 e 13, com uma faixa de linearidade entre 0,04 e 0,1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ com coeficiente de correlação linear de 0,983 para o EPA (Figura 14A) e apresentando uma faixa de linearidade entre 0,025 e 0,08 $\mu\text{L mL}^{-1}$ com coeficiente de

correlação linear de 0,985 para o EPG (Figura 14B). O IC_{50} estimado foi de $0,027 \mu\text{L mL}^{-1}$ para EPA e $0,03 \mu\text{L mL}^{-1}$ para o EPG.

Figura 12 – Medida da atividade inibidora da degradação da deoxirribose pelo extrato de própolis alcoólico. As concentrações finais de extrato de própolis no meio reacional foram: 0,0125; 0,025; 0,04; 0,05; 0,06; 0,08; 0,1 e 0,2 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações.

Extratos e frações obtidas de extratos de própolis por Wang e colaboradores (2004) foram avaliados em um sistema formador de radicais hidroxila diferente do proposto neste estudo, porém por motivo de comparação foi observado que estas amostras sequestraram cerca de 65% do radical hidroxila na concentração de 1 mg mL^{-1} , sendo que um extrato de própolis aquoso, avaliado por Nagai e colaboradores (2003), demonstrou que concentrações de 50 a 100 mg mL^{-1} sequestraram completamente o radical hidroxila produzido pela degradação da deoxirribose. As concentrações apresentadas neste último trabalho são bem maiores quando relacionadas aos EPA e EPG, em estudo neste trabalho. Isto pode estar relacionado tanto ao fato dos compostos com maior atividade sequestradora de $\bullet\text{OH}$ não serem extraídos com água, quanto pelo fato de não estar descrito o conteúdo de resíduo seco nos extratos estudados por Nagai e colaboradores (2003).

Figura 13 – Medida da atividade inibidora da degradação da deoxirribose pelo extrato de própolis glicólico. As concentrações finais de extrato de própolis no meio reacional foram: 0,0125; 0,025; 0,04; 0,05; 0,06; 0,08; 0,1 e 0,2 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações.

Figura 14 – Faixa de linearidade no método de medida da atividade inibidora da degradação da deoxirribose pelos extratos de própolis alcoólico e glicólico. (A) As concentrações finais do extrato de própolis alcoólico no meio reacional foram: 0,04; 0,05; 0,06; 0,08 e 0,1 $\mu\text{L mL}^{-1}$. (B) As concentrações finais de extrato de própolis glicólico no meio reacional foram: 0,025; 0,04; 0,05; 0,06 e 0,08 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações.

Ao compararmos a atividade antioxidante dos extratos (IC_{50} de 0,027 e 0,030 $\mu\text{L mL}^{-1}$, correspondendo aproximadamente a 27 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para EPA e EPG, respectivamente) novamente com as substâncias em estudo no laboratório de Controle de Qualidade, como por exemplo, o extrato fluído de própolis verde que apresentou IC_{50} de 1,79 $\mu\text{g mL}^{-1}$

(FONSECA, 2007), o Isoflavin Beta[®] que apresentou IC₅₀ de 21,03 µg mL⁻¹ e o red clover IC₅₀ de 10,34 µg mL⁻¹ (GEORGETTI, 2004), e sabendo que os valores de IC₅₀ poderiam ser expressos como 2,97 e 3,30 µg sólidos totais mL⁻¹ para EPA e EPG, respectivamente, é possível sugerir mais uma vez a eficiência antioxidante dos extratos de própolis.

Nas Figuras 12 e 13, podemos observar nas curvas de atividade dos EPA e EPG, que apesar de apresentarem uma atividade dose-dependente, grandes variações na concentração não causam grande variação de atividade. Este comportamento é diferente do encontrado no método de peroxidação lipídica e nos métodos apresentados a seguir, onde a curva de atividade é mais acentuada. Assim, o perfil desta curva de atividade antioxidante não seria muito adequado para ser utilizado, por exemplo, em teste de estabilidade, pois não poderia avaliar corretamente a perda do ativo.

4.2.3 Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD pelos extratos de própolis

A quimioluminescência com luminol tem sido amplamente utilizada como um ensaio sensível para monitoramento de radicais livres, enzimas, células ou sistemas de órgãos e para “screening” da atividade antioxidante (GIROTTI et al., 2000). Neste método os radicais superóxido são formados e oxidam o luminol (estado de excitação) que tendem a voltar ao estado basal emitindo luz. Assim, na presença de extrato de própolis, os radicais superóxido são sequestrados, diminuindo a oxidação do luminol e conseqüentemente a luz emitida. O sistema é baseado na seguinte reação:

XOD – xantina oxidase

Há dados na literatura que sugerem que esta diminuição da emissão da luz poderia estar relacionada também com a inibição da enzima responsável pela produção dos radicais superóxido, a xantina oxidase (PIETTA, 2000, COS, et al, 1998). Desta forma, foi realizado um experimento de forma modificada, onde uma alíquota de enzima foi incubada com uma alíquota de solução de extrato de própolis antes de realizar a reação completamente, variando a temperatura e o tempo de contato. No entanto, não foi observada nenhuma alteração significativa de atividade, comprovando que a enzima tem sua atividade inalterada na presença de extrato de própolis e que este seqüestra os radicais superóxido formados neste sistema.

Os EPA (Figura 15) e EPG (Figura 16) inibiram a quimioluminescência catalisada pela XOD de forma dose-dependente, apresentando valores de IC_{50} de 0,006 e 0,007 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Esta atividade inibidora da quimioluminescência, aparentemente muito elevada, pode estar relacionada com a presença de compostos fenólicos, que é em grande parte representado pelos flavonóides. A atividade antioxidante dos flavonóides tem sido avaliada abundantemente, e uma forte relação estrutura-atividade tem sido proposta. Por exemplo, Cos e colaboradores (1998) apresentaram em seu trabalho que a presença do grupo hidroxila no C3 no anel B e no C3 dos flavonóides são essenciais para o seqüestro do radical superóxido.

Esta pronunciada atividade antioxidante dos extratos de própolis encontrada nesta metodologia pode também estar relacionada ao pH do meio reacional. O pH em que ocorre esta reação é aproximadamente de 9,4, sendo que nas outras metodologias é 7,4. Sabe-se que há uma relação entre estrutura/atividade de compostos fenólicos e que a presença e/ou a quantidade de hidroxilas presentes é fundamental, mas além disso, é de suma importância o grau de desprotonação destas hidroxilas que depende do pH do meio. Sendo assim, Lemánska e colaboradores (2001) estudaram a possível influência do grupo OH desprotonado (variando o pH do meio) no potencial antioxidante de flavonóides. Estes autores observaram

que há um aumento na atividade antioxidante com o aumento do pH, e esta relação é provavelmente devido ao aumento da capacidade de doação de elétrons ou $H^\bullet$ com a desprotonação do flavonóide.

Figura 15 – Medida da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD pelo extrato de própolis alcoólico. As concentrações finais de extrato de própolis no meio reacional foram: 0,15; 0,075; 0,045; 0,037; 0,029; 0,019; 0,009 e 0,005 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações.

Figura 16 – Medida da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD pelos extratos de própolis glicólico. As concentrações finais de extrato de própolis no meio reacional foram: 0,15; 0,075; 0,045; 0,037; 0,029; 0,019; 0,009 e 0,005 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações.

Pela análise dos resultados observa-se que o método apresentou uma quase linearidade para os EPA (Figura 17A) e EPG (Figura 17B) entre 0,005 e 0,029 $\mu\text{L mL}^{-1}$, com um coeficiente de correlação linear de 0,958 e 0,973 para EPA e EPG, respectivamente.

Figura 17 – Faixa de linearidade no método de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD pelos extrato de própolis alcoólico e glicólico. As concentrações finais dos extratos de própolis no meio reacional foram: 0,005; 0,009; 0,019 e 0,029 $\mu\text{L mL}^{-1}$. (A) Extrato de própolis alcoólico e (B) Extrato de própolis glicólico. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações.

Pascual e colaboradores (1994) estudaram a inibição da quimioluminescência por este sistema avaliando extratos de própolis cubano, e verificaram uma variação do IC_{50} de 5,2 e 9,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ comparando com 72 ng mL^{-1} de SOD e 0,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de catequina. Com relação às substâncias ensaiadas no laboratório de Controle de Qualidade, o extrato fluido de própolis verde apresentou IC_{50} de 4,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (FONSECA, 2007), a SOD na concentração de 0,04 $\mu\text{L mL}^{-1}$ inibiu 100 % deste sistema, enquanto que a vitamina E na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e os extratos de *Glycyrrhiza glabra* e *Ginkgo biloba* na concentração de 0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ não apresentaram atividade neste sistema (DI MAMBRO, 2005a). Assim, sabendo que os valores de IC_{50} dos EPA e EPG são aproximadamente 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ equivalendo a 0,66 μg de sólidos totais mL^{-1} , pode-se sugerir que os mesmos possuem uma alta atividade antioxidante com grandes perspectivas na aplicação tópica.

4.2.4 Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema H_2O_2 /luminol/HRP pelos extratos de própolis

A enzima horseradish peroxidase (HRP) catalisa a oxidação de diversas moléculas como o luminol na presença de peróxido de hidrogênio. Apesar desta reação não ser compreendida completamente, acredita-se que o esquema de reação envolve a oxidação do luminol por um complexo entre o oxidante e a peroxidase para produzir um radical luminol. Radicais luminol passam por posteriores reações que resultam na formação de um endoperóxido o qual se decompõe para render um diânion 3-aminofalato eletronicamente excitado que emite luz ao retornar ao estado basal (PASCUAL; DEL CASTILHO; ROMAY, 1992; THORPE; KRICKA, 1986).

Há dados na literatura que sugerem que o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) pode participar na reação que leva para a quimioluminescência do luminol. O $\text{O}_2^{\bullet-}$ na presença de H_2O_2 coopera na geração do radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Desta forma, compostos que sequestram estes radicais foram testados por Misra e Squatrito (1982) para avaliar suas atividades na quimioluminescência e observaram que no meio reacional desta metodologia são formados principalmente $\text{O}_2^{\bullet-}$ e $\bullet\text{OH}$.

Na presença de extratos de própolis os radicais formados neste sistema são sequestrados, diminuindo a oxidação do luminol e consequentemente a luz emitida. Porém, esta diminuição da luz poderia estar relacionada também com a inibição da enzima peroxidase HRP. Desta forma, foi realizado um experimento de forma modificada, onde uma alíquota de enzima foi incubada com uma alíquota de extrato de própolis antes da reação toda ocorrer, variando a temperatura e o tempo de contato. Não foi observada nenhuma alteração significativa de atividade comprovando que a enzima tem sua atividade inalterada na presença de extrato de própolis.

Os EPA e EPG inibiram a quimioluminescência catalisada pela HRP de forma dose dependente, apresentando valores de IC_{50} de 0,137 e 0,128 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente (Figuras 18 e 19). Estes altos valores de IC_{50} obtidos neste método indicam uma inferioridade deste método com relação às outras metodologias de atividade antioxidante testadas.

Os radicais $\cdot\text{OH}$ e $\text{O}_2\cdot^-$, que supostamente estão sendo formados nesta metodologia, foram sequestrados eficientemente pelos componentes antioxidantes presentes nos extratos de própolis, quando avaliados por outras metodologias (deoxirribose e quimioluminescência no sistema xantina/luminol/XOD). Assim, a performance antioxidante inferior apresentada pelos extratos nesta metodologia é difícil de ser explicada.

O EPA apresentou faixa de linearidade entre 0,1 e 0,3 $\mu\text{L mL}^{-1}$, apresentando um coeficiente de correlação linear de 0,991 e o EPG apresentou na mesma faixa de concentração uma quase linearidade com coeficiente de correlação linear de 0,962 (Figura 20 A e B).

Figura 18 – Medida da inibição da quimioluminescência gerada no sistema H_2O_2 /luminol/HRP pelo extrato de própolis alcoólico. As concentrações finais de extrato de própolis no meio reacional foram 0,4; 0,3; 0,2; 0,15 e 0,1 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações.

Figura 19 – Medida da inibição da quimioluminescência gerada no sistema H_2O_2 /luminol/HRP pelo extrato de própolis glicólico As concentrações finais de extrato de própolis no meio reacional foram: 0,4; 0,3; 0,2; 0,15 e 0,1 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações.

Figura 20– Faixa de linearidade no método de inibição da quimioluminescência gerada no sistema H_2O_2 /luminol/HRP pelos extratos de própolis alcoólico e glicólico. As concentrações finais da própolis no meio reacional foram: 0,1; 0,15; 0,2 e 0,3 $\mu\text{L mL}^{-1}$. (A) extrato de própolis alcoólico e (B) extrato de própolis glicólico. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações.

Com relação à atividade antioxidante das substâncias ensaiadas no laboratório de Controle de Qualidade, foi observado que o extrato fluído de própolis verde apresentou IC_{50} de 77,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (FONSECA, 2007), Isoflavin Beta[®] e red clover apresentam cerca de 50 % de inibição deste sistema na concentração de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente

(GEORGETTI, 2003), o extrato de *Glycyrrhiza glaba* apresentou IC_{50} de $0,09 \mu\text{L mL}^{-1}$, o extrato de *Ginkgo biloba* IC_{50} de $0,04 \mu\text{L mL}^{-1}$, enquanto que $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de vitamina E inibiu cerca de 50% deste sistema (DI MAMBRO, 2005a). Assim, pode se observar que os extratos de própolis em estudo apresentaram valores de IC_{50} ($0,137$ e $0,128 \mu\text{L mL}^{-1}$), correspondendo a 137 e $128 \mu\text{g mL}^{-1}$ ou $15,07$ e $14,08 \mu\text{g}$ sólidos totais mL^{-1} para EPA e EPG, respectivamente), maiores e conseqüentemente obtendo menor efetividade neste método.

4.3 Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato de própolis

Formulações tópicas com distintos conteúdos graxos foram desenvolvidas e adicionadas ou não de extrato de própolis alcoólico (EPA) ou glicólico (EPG). As formulações tópicas foram desenvolvidas com matérias-primas conhecidas no mercado, nas concentrações recomendadas pelos fabricantes/distribuidores e apresentam grande uso na preparação de produtos farmacêuticos e cosméticos, predizendo uma certa estabilidade para as formulações.

Foram preparadas formulações do tipo creme (B e E) utilizando bases auto-emulsionantes não iônicas, como Polawax[®] (álcool cetoestearílico etoxilado 20 OE) e Crodabase (óleo mineral, álcool de lanolina, álcool graxo e álcool graxo etoxilado). As bases auto-emulsionantes compostas por álcoois graxos e surfactantes não-iônicos são normalmente preferidas em formulações tópicas devido à sua comparativa baixa irritação na pele e sua compatibilidade com substâncias ativas iônicas ou agentes cosméticos (ECCLESTON, 1997).

O tipo de formulação contendo extrato de própolis mais encontrada no mercado é na forma de gel. Sendo assim, foram preparadas 2 formulações (C e G) na forma de gel utilizando o carbômero Carbopol[®] 940.

As formulações do tipo creme são adequadas para veiculação de princípios ativos lipossolúveis e as do tipo gel são adequadas para princípios ativos mais hidrossolúveis. No

entanto, formulação do tipo gel-creme, que por definição são emulsões que contém alta porcentagem de fase aquosa e baixo conteúdo oleoso, estabilizada por um colóide hidrofílico, também têm sido largamente utilizada como base dermatológica em cosmetologia, pois permite a veiculação de substâncias hidrossolúveis e, ainda de substância lipossolúveis, sem que a formulação final deixe uma sensação gordurosa na pele (CASAGRANDE, 2005; MAIA CAMPOS, 1994). Assim, uma formulação do tipo gel-creme (F) também foi preparada, utilizando Carbopol[®] 940 como colóide hidrofílico, e Polawax[®], como base auto-emulsionante.

A utilização do Hostacerin[®] SAF permitiu a preparação das formulações a frio e de forma muito rápida, o resultado obtido também foi uma formulação do tipo gel-creme (A e D), pois a matéria-prima Hostacerin[®] SAF é uma associação entre doadores de viscosidade e emulsionantes, contendo em sua composição todos os componentes fundamentais para a preparação de emulsão com baixo conteúdo graxo: Aristoflex AVC (Acriloildimetil-taurato de amônio, Copolímero VP) que é doador de viscosidade, Emulsogen SRO (ésteres de sorbitol) e Hostaphat KL 340D (fosfato de trilaurete-4) que são emulsificantes e óleo mineral e palmitato de isopropila como emolientes (PHARMASPECIAL, 2005).

O óleo de macadâmia, palmitato de isopropila e oleato de isodecila foram utilizados como emolientes que auxiliam no espalhamento, absorção, viscosidade e solubilização de ativos lipossolúveis. O propilenoglicol e a glicerina são umectantes e utilizou-se uma mistura de fenoxietanol e parabenos como conservante. O propilenoglicol também foi fundamental na solubilização do extrato de própolis e do conservante para serem perfeitamente incorporados à formulação (CASAGRANDE, 2005).

Na literatura, há evidências da utilização de própolis topicamente (CASTALDO; CAPASSO, 2002; GREGORY et al., 2002; NAITO et al., 2007), porém não foram

encontrados dados da concentração ideal de extrato de própolis a ser adicionado às formulações, assim, foi empregada a concentração de 2,5 % (v/p).

Com o intuito de obtermos formulações com estabilidade física preestabelecidas para os estudos de estabilidade física e funcional acelerada e de longo prazo, as formulações desenvolvidas foram avaliadas preliminarmente pelas metodologias descritas no item 3.2.3.1.

4.3.1 Estudo da estabilidade física preliminar das formulações

O estudo de estabilidade preliminar consiste na realização do teste na fase inicial do desenvolvimento do produto, utilizando-se diferentes formulações de laboratório e com duração reduzida. Neste estudo, são empregados condições extremas de temperatura com o objetivo de acelerar possíveis reações entre seus componentes e o surgimento de sinais que devem ser observados e analisados conforme as características específicas de cada tipo de produto. Devido às condições em que é conduzido, este estudo não tem a finalidade de estimar a vida útil do produto, mas sim de auxiliar na triagem das formulações (BRASIL - ANVISA, 2004).

O teste de estabilidade é necessário para assegurar que a formulação irá manter sua integridade, ou seja, sua qualidade. Uma formulação estável é aquela que mantém as devidas proporções entre seus constituintes e mantém a superfície interfásica, mesmo após estar exposta a tensões decorrentes de fatores como temperatura, agitação e aceleração da gravidade. Quando um produto é testado quanto à estabilidade física, diversos parâmetros devem ser levados em conta, como por exemplo, aparência, cor, odor, pH, viscosidade e separação de fases, bem como as características microscópicas da formulação (PRINDERRE et al., 1998).

Preparações contendo base auto-emulsionante não-iônica desenvolvem sua consistência lentamente por um período de 24 a 48 horas, uma vez que o intumescimento dos

componentes graxos anfífilicos pelo tensoativo aquoso para formar a malha gel cristalina é retardado. Deste modo, emulsões recém-preparadas não devem ser submetidas a testes de estabilidade, pois durante o desenvolvimento da formulação, esta pode não estar plenamente equilibrada, podendo ocorrer mudanças na área interfacial, na distribuição do emulsificante e no endurecimento dos constituintes sólidos, sendo necessário um período inicial de espera (RIEGER, 1996). Assim, o tempo inicial para cada teste foi considerado como sendo 24 horas após a preparação de cada formulação.

4.3.1.1 Características organolépticas

A formulação do tipo gel e gel-creme (C, F e G), quando adicionadas dos extratos de própolis, apresentaram escurecimento perceptível logo após a primeira semana de preparação. Este escurecimento se tornou cada vez mais presente e intenso principalmente para as formulações armazenadas a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/70\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$. Desta forma, estas formulações foram descartadas. Este escurecimento provavelmente está relacionado à oxidação dos compostos presentes nos extratos de própolis que podem ser sensíveis ao pH da formulação (formulações C, F e G com pH em torno de 6,5 - 7,0), bem como ao aumento da temperatura. As outras formulações, cujos valores de pH foram inferiores, não sofreram escurecimento durante o período de análise e não tiveram alterações no odor, homogeneidade e separação de fases.

4.3.1.2 Teste de centrifugação

O teste preliminar de centrifugação fornece informações rápidas sobre a estabilidade de diferentes emulsões. Quando a emulsão é submetida à centrifugação, a separação de fases pode ocorrer devido a cremação ou coalescência. A Lei de Stokes, que descreve a velocidade de sedimentação das gotículas, a qual é diretamente proporcional ao tamanho

destas na fase interna, mostra que a cremeação é uma função da gravidade e que um aumento na gravidade acelera a separação (IDSON; LAZARUS, 2001).

A formulação com a base auto-emulsionante Crodabase[®] apresentou separação de fases em todos períodos de análise e temperaturas avaliadas, sendo esta formulação (B) descartada.

Nas formulações preparadas com Hostacerin[®] SAF, a presença dos emolientes adicionados causa uma leve separação de uma fase oleosa sobrenadante. Este inconveniente é sobreposto quando os emolientes não são adicionados na formulação. A formulação A foi descartada e a formulação D foi aceita. As outras formulações foram estáveis ao teste de centrifugação.

4.3.1.3 Determinação do pH

Somente as formulações D e E, estáveis nos outros testes físicos, estão descritas neste item. No armazenamento a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/70\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$, a formulação base D, apresentou pH inicial de 6,23 e após 30 dias apresentou pH de 5,98, quando adicionada com o EPA, apresentou pH inicial de 5,11 e após 30 dias apresentou pH de 5,5. Com relação à formulação base E nesta mesma condição de armazenamento, o pH inicial foi de 5,64 e após 30 dias o pH foi de 4,49, quando adicionada de EPA, o pH inicial foi de 4,55 e após 30 dias o pH foi de 4,16. A variação dos valores de pH destas formulações foram inferiores a 20%, apresentando valores de pH compatíveis com o pH levemente ácido da pele (4,6 – 5,8) (LEONARDI; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2002). Estas formulações apresentaram variação do pH menor quando armazenadas à temperatura ambiente. As formulações adicionadas de EPG apresentaram valores e variações de pH similares às formulações com EPA.

Neste estudo foi observado uma diminuição do valor do pH nas formulações ao serem adicionadas dos extratos de própolis, corroborando com os resultados observados por Fonseca

(2007). Provavelmente, esta alteração no valor do pH poderia estar relacionada à presença de compostos fenólicos ácidos nos extratos.

4.3.1.4 Avaliação da homogeneidade das formulações por microscopia

A instabilidade frente à centrifugação apresentada pela formulação B, também foi percebida na microscopia, pois as gotículas de óleo eram de tamanhos variados e se mostravam maiores com o passar do tempo. A formulação D apresentou homogeneidade em gotículas pequenas, que se manteve com o passar do tempo. A formulação E apresentou gotículas de tamanhos maiores e não apresentou tanta homogeneidade, apesar disto, esta foi juntamente com a formulação D escolhida para o estudo de estabilidade física e funcional posterior, pois esta variação no tamanho da gotícula pode ser uma característica da base auto-emulsionante usada, e provavelmente não significa instabilidade da emulsão.

4.3.2 Estudo da estabilidade acelerada e de longa duração

A formulação D (preparada com Hostacerin[®] SAF e considerada gel-creme) e a formulação E (preparada com Polawax[®] e considerada creme), passaram a ser denominadas 1 e 2, respectivamente. Estas formulações adicionadas de extrato de própolis alcoólico ou glicólico à 2,5% (v/p) foram escolhidas no estudo de estabilidade física preliminar para serem avaliadas quanto à estabilidade física e quanto à estabilidade funcional por um período de 1 ano.

A estabilidade de um produto farmacêutico é um fator muito importante, e pode ser definida pela capacidade de formulações particulares em um recipiente específico de se manter dentro de suas especificações físicas, químicas, terapêuticas e toxicológicas. Vários são os fatores que podem interferir na estabilidade de um produto. Entre eles a qualidade química, física e microbiológica da matéria prima, o pH, a hidratação, a temperatura, a

oxidação, a hidrólise, a fotólise, o material de acondicionamento e embalagem e as condições de estocagem. Além disso, a própria forma farmacêutica escolhida para o produto pode ter seus problemas específicos.

As causas que proporcionam a instabilidade dos fármacos ou dos princípios ativos podem ser de duas naturezas, uma delas está diretamente ligada à estrutura química e as propriedades físico-químicas dos fármacos ou dos princípios ativos e dos adjuvantes e a outra causa de instabilidade está relacionada a fatores externos, como temperatura, umidade, ar, luz que induzem ou aceleram reações que desvalorizam a qualidade ou atividade do produto.

4.3.2.1 Estabilidade física

4.3.2.1.1 Características organolépticas

A inspeção visual é um método simples e rápido para detectar a separação de fases ou instabilidades (mudanças de cor, homogeneidade), porém as observações e o registro de dados obtidos durante a inspeção são altamente subjetivos, existindo diferenças entre observadores e devendo ser procedida com cautela, mas rotineiramente durante os estudos de estabilidade (RIEGER, 1996).

As formulações em estudo apresentaram estabilidade quanto à homogeneidade e odor em todos pontos de tempo de análise quando armazenadas à temperatura ambiente. Porém, a formulação 1 apresentou, a partir de 60 dias de armazenamento, uma sutil alteração de coloração, ocorrendo um leve escurecimento quando armazenadas à $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/70\% \text{ UR} \pm 5\%$, e esta alteração de cor se tornou mais evidente nos pontos de avaliação posteriores. Este escurecimento poderia estar relacionado tanto à oxidação dos componentes da formulação quanto dos componentes do extrato. Porém, provavelmente os componentes que devem estar

sofrendo oxidação devem ser provenientes do extrato de própolis, pois também foi observado perda da atividade antioxidante da formulação, que será discutido posteriormente.

4.3.2.1.2 Teste de centrifugação

Quando uma formulação é exposta à centrifugação, podem ocorrer fenômenos de cremação ou coalescência, porém se nenhum destes processos ocorrer, supõe-se que a emulsão será estável sob condição gravitacional normal, uma vez que a aceleração da gravidade aumenta o número de colisões entre os glóbulos e desta forma acelera o processo de cremação (LATREILLE; PAQUIN, 1990). As formulações, adicionadas ou não de extrato de própolis, em ambas temperaturas testadas durante o período de estudo não apresentaram separação de fases após serem submetidas à centrifugação, mostrando-se estáveis frente a este teste.

4.3.2.1.3 Determinação do pH

Além de caracterizar as formulações, a determinação do pH é importante por avaliar a compatibilidade com relação aos componentes da formulação, a compatibilidade da formulação com o local de aplicação evitando irritação, e a possibilidade de incorporação de substâncias ativas dependentes do valor do pH (CHARRO, 1997). A variação do pH das formulações base, com extrato de própolis alcoólico ou extrato de própolis glicólico em função do tempo, armazenadas à temperatura ambiente e a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/70\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$ encontram-se nas Tabelas 4 e 5 e nas Figuras 21 e 22, respectivamente.

Foi observado inicialmente que tanto a adição de extrato de própolis alcoólico como glicólico em ambas formulações causou uma significativa queda do pH destas formulações ($p < 0,05$, ANOVA seguido pelo teste Tukey), porém esta queda do pH não é significativa entre os dois extratos quando adicionados na mesma formulação. Após a avaliação do perfil dos

valores de pH das formulações, foi possível observar que a F1 base apresentou uma queda brusca do pH (principalmente a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/70\% \text{ UR} \pm 5\% \text{UR}$), no entanto, a presença dos extratos evitou esta queda acentuada nos valores do pH destas formulações. Uma possibilidade seria a formação de sistema tampão na F1 (gel-creme) com a adição dos extratos, mas que não foi possível ocorrer na F2 (creme), devido à grande quantidade de material graxo. Também foi observado que o pH da F1 tende à estabilização, porém apresenta diferença estatística para ambas temperaturas em todo período de armazenamento (Figuras 21A e 22A). Por outro lado, o pH da formulação 2, tanto da base quanto da base adicionada de ambos extratos tendem a diminuir durante os primeiros 60 dias de armazenamento à TA, mas logo percebemos que ocorre uma estabilização e, o pH se torna estável durante o restante do período de armazenamento, não apresentando diferença estatística significativa no período de 60 a 360 dias de armazenamento ($p > 0,05$, ANOVA seguido pelo teste Tukey). Porém, quando armazenada a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/70\% \text{ UR} \pm 5\% \text{UR}$ esta formulação somente manteve o valor de pH a partir de 180 dias ($p > 0,05$, ANOVA seguido pelo teste Tukey).

Tabela 4 - Valores de pH das formulações 1 e 2 armazenadas à temperatura ambiente

<i>Dia</i>	<i>F1 B</i>	<i>F1 EPA</i>	<i>F1 EPG</i>	<i>F2 B</i>	<i>F2 EPA</i>	<i>F2 EPG</i>
1	6,25	5,49	5,46	5,30	4,51	4,53
7	6,15	5,37	5,33	5,35	4,47	4,47
14	6,12	5,33	5,31	5,00	4,38	4,40
30	6,15	5,30	5,30	4,74	4,37	4,37
60	5,78	5,10	5,11	4,41	4,27	4,27
90	5,81	5,11	5,17	4,32	4,10	4,11
180	5,28	5,18	5,08	4,35	4,19	4,23
270	3,99	4,94	4,98	4,45	4,23	4,22
360	3,77	4,88	4,94	4,31	4,18	4,21

n = 2; F1 B: Formulação 1 base, F1 EPA : Formulação 1 adicionada de extrato de própolis alcoólico, F1 EPG : Formulação 1 adicionada de extrato de própolis glicólico; F2 B: Formulação 2 base, F2 EPA : Formulação 2 adicionada de extrato de própolis alcoólico, F2 EPG : Formulação 2 adicionada de extrato de própolis glicólico.

Tabela 5 - Valores de pH das formulações 1 e 2 armazenadas a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/70\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$

<i>Dia</i>	<i>F1 B</i>	<i>F1 EPA</i>	<i>F1 EPG</i>	<i>F2 B</i>	<i>F2 EPA</i>	<i>F2 EP</i>
<i>1</i>	6,17	5,43	5,44	5,32	4,48	4,53
<i>7</i>	6,09	5,34	5,32	4,81	4,35	4,36
<i>14</i>	6,08	5,24	5,24	4,54	4,33	4,31
<i>30</i>	5,74	5,20	5,22	4,40	4,23	4,26
<i>60</i>	4,35	5,04	5,06	4,27	4,18	4,17
<i>90</i>	3,86	4,93	4,92	4,10	4,00	3,98
<i>180</i>	3,71	4,77	4,86	4,19	4,08	4,10
<i>270</i>	3,69	4,65	4,64	4,19	4,08	4,11
<i>360</i>	3,58	4,52	4,54	4,14	4,10	4,12

n = 2; F1 B: Formulação 1 base, F1 EPA : Formulação 1 adicionada de extrato de própolis alcoólico, F1 EPG : Formulação 1 adicionada de extrato de própolis glicólico; F2 B: Formulação 2 base, F2 EPA : Formulação 2 adicionada de extrato de própolis alcoólico, F2 EPG : Formulação 2 adicionada de extrato de própolis glicólico.

Figura 21 – Variação do pH das formulações armazenadas à temperatura ambiente: (A) Formulação 1; (B) Formulação 2. As análises foram realizadas com as formulações estocadas à temperatura ambiente por 12 meses. Os resultados representam a média de duas determinações. F1/F2 B: formulação 1 ou 2 base; F1/F2 EPA: formulação 1 ou 2 com extrato de própolis alcoólico; F1/F2 EPG: formulação 1 ou 2 com extrato de própolis glicólico.

Figura 22 – Variação do pH das formulações armazenadas a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/70\% \text{ UR} \pm 5\% \text{UR}$. (A) Formulação 1; (B) Formulação 2. As análises foram realizadas com as formulações estocadas a 40°C com 70% UR por 12 meses. Os resultados representam a média de duas determinações. F1/F2 B: formulação 1 ou 2 base; F1/F2 EPA: formulação 1 ou 2 com extrato de própolis alcoólico; F1/F2 EPG: formulação 1 ou 2 com extrato de própolis glicólico

Embora os valores do pH das formulações sejam levemente ácidos e tenham apresentado diferenças significativas nas condições e período de estudo, estes valores estão próximos da faixa recomendada para formulações de uso tópico, uma vez que a pele apresenta pH entre 4,6 – 5,8 (LEONARDI; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2002). Com os resultados apresentados, podemos sugerir que a F2, por ter mantido o seu pH mais estável após adquirir um equilíbrio, seria a formulação com o pH mais estável.

No entanto, na tentativa de desenvolver formulações com um perfil dos valores de pH mais adequados, seria de grande valia a incorporação de soluções tampão na fase aquosa das formulações tópicas, mantendo o valor do pH das formulações em torno de 5,0.

4.3.2.1.4 Avaliação da homogeneidade das formulações por microscopia

A mudança no tamanho ou na contagem das partículas baseia-se em um dos princípios da instabilidade termodinâmica das emulsões. A grande área interfacial de gotículas pequenas

está associada ao estado de energia elevado, e o sistema tende ao estado de energia mais baixo, isto é, a separação completa. A avaliação da mudança no tamanho ou número de gotículas indica a potência das forças que resistem à separação, isto é, das forças que se opõem a coalescência (RIEGER, 1996).

O exame microscópico de uma emulsão sem diluir permite evidenciar processos de recristalização do princípio ativo e de aditivos, além de ser um método direto que permite determinar a distribuição e o tamanho das gotículas. Apesar desta técnica poder apresentar o inconveniente de subestimar o tamanho das gotículas ao achatá-las entre lâmina e lamínula, ela pode ser muito útil, pois quando padronizada permite a avaliação do tamanho das gotículas de uma formulação estocada por longos períodos e em temperaturas variadas.

Com a análise microscópica das formulações utilizando um microscópio óptico LEICA DMLB acoplado ao software LEICA Q WIN DD 300, foi possível observar o tamanho das gotículas das duas formulações e suas alterações com o passar do tempo (em anexo). Quinze gotículas foram avaliadas em cada campo visual e os resultados foram expressos em $\mu\text{m}^2 \pm$ erro padrão da média e estão apresentados nas Figuras 23 e 24.

Durante o armazenamento em TA o tamanho das gotículas da formulação 1 (com ou sem extrato) aparentemente apresentaram tamanho homogêneo, enquanto que quando armazenada à $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/70\% \text{ UR} \pm 5\% \text{UR}$ (Figura 24A) a área das gotículas, inicialmente tenderam à diminuir (queda de 66%), mas aumentaram (aumento de mais de 100%) após os primeiros 6 meses, indicando instabilidade da emulsão. Esta formulação em ambas condições de armazenamento apresentou diferença estatística ($p < 0,05$, ANOVA seguido pelo teste Tukey) na área da gotícula durante o armazenamento. Apesar da formulação 2 ter apresentado gotículas com o tamanho bem variado, o que acarretou um valor médio com um grande erro, esta formulação não apresentou diferença estatística significativa na área das gotículas com relação ao tempo e à temperatura de estocagem, (Figuras 23B e 24B). Desta

forma, a formulação 2 apresentou-se mais estável com relação à área das gotículas, apesar de apresentar pouca homogeneidade. A adição dos extratos em ambas formulações não alterou significativamente a área das gotículas destas formulações.

Figura 23 - Área média das gotículas das formulações armazenadas à temperatura ambiente. (A) Formulação 1; (B) Formulação 2. As análises foram realizadas com as formulações estocadas à temperatura ambiente por 12 meses. Os resultados representam a média de 15 determinações $\pm$ erro padrão da média. F1/F2 Base: formulação 1 ou 2 base (sem extrato); F1/F2 EPA: formulação 1 ou 2 com extrato de própolis alcoólico; F1/F2 EPG: formulação 1 ou 2 com extrato de própolis glicólico

Figura 24 - Área média das gotículas das formulações armazenadas a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/70\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$. (A) Formulação 1; (B) Formulação 2. As análises foram realizadas com as formulações estocadas a 40°C com 70% UR por 12 meses. Os resultados representam a média de 15 determinações $\pm$ erro padrão da média. F1/F2 Base: formulação 1 ou 2 base (sem extrato); F1/F2 EPA: formulação 1 ou 2 com extrato de própolis alcoólico; F1/F2 EPG: formulação 1 ou 2 com extrato de própolis glicólico

A estabilidade da formulação 2 pode estar relacionada aos componentes da base auto-emulsionante Polawax[®] que pode ter levado à formação de estruturas conhecidas como cristais líquidos (FONSECA, 2007). Os cristais líquidos são definidos como fases

intermediárias entre os estados sólido e líquido que exibem propriedades típicas tanto do estado líquido (ordenamento orientacional, anisotropia à luz, birrefringência) como propriedades mecânicas típicas do estado cristalino (fluidez e tensão superficial) (CIOCCA; CALVO, 1990). As multicamadas da fase cristalina estão na interface da gotícula óleo/água, e estas multicamadas estabilizam a emulsão pela sua habilidade de causar uma redução nas forças de atração de van der Waals, o que em combinação com a alta viscosidade das camadas líquido cristalinas, contribui para o retardamento do processo de coalescência da emulsão (ECCLESTON, 1997).

Estas estruturas são facilmente detectadas quando observadas através de microscopia de luz polarizada, devido às propriedades de birrefringência, e foram descritas por Fonseca (2007) na avaliação de formulações preparadas com Polawax[®] adicionadas de extrato fluído de própolis verde.

4.3.2.2 Estabilidade funcional

4.3.2.2.1 Escolha do método de atividade antioxidante para avaliar a estabilidade funcional das formulações desenvolvidas

Antes de iniciar os estudos de estabilidade funcional das formulações, foi inicialmente necessário avaliar qual seria a melhor metodologia de atividade antioxidante para realizar tal estudo. Inicialmente, todas as metodologias apresentadas anteriormente foram avaliadas quanto à precisão intra- e interensaio, segundo os parâmetros estabelecidos para métodos bioanalíticos (BRASIL - ANVISA, 2003). Foi observado, que todos os métodos apresentaram valores aceitáveis, mas os menores coeficientes de variação (CV) foram observados para a metodologia de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD. No entanto, com o intuito de avaliar se os componentes das formulações 1 e 2, poderiam interferir na atividade antioxidante (funcional), estas formulações adicionadas ou não de EPA

e EPG foram avaliadas pelas metodologias de inibição da peroxidação lipídica, inibição da degradação da deoxirribose e inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD. A precisão intra- e interensaio destes métodos também foi estudada. As formulações não foram avaliadas no método de inibição da quimioluminescência gerada no sistema H_2O_2 /luminol/HRP, devido à baixa sensibilidade do método.

4.3.2.2.1.1 Determinação da inibição da peroxidação lipídica induzida por Fe^{+2} pelas formulações adicionadas de extrato de própolis

Para verificar a eficiência do método de inibição da peroxidação lipídica, amostras contendo o extrato de própolis, as formulações base e as formulações contendo os extratos de própolis foram utilizados no teste. As amostras foram avaliadas na concentração final no meio reacional de $0,05 \mu\text{L mL}^{-1}$.

A inibição da peroxidação lipídica foi pronunciada tanto para os extratos de própolis quanto para as formulações adicionadas de extrato de própolis. Porém, houve diferença estatística significativa da porcentagem de inibição da peroxidação lipídica entre os extratos sozinhos e as formulações adicionadas dos extratos. Esta diferença na atividade observada pode estar relacionada à presença dos componentes da formulação, que podem ter causado interferência no método. Apesar disto, o método apresentou uma recuperação superior a 90% e, desta forma, este método pode ser considerado útil para avaliar formulações adicionadas de extrato de própolis (Figura 25). Além disso, foi realizado o estudo de precisão intra- e interensaio deste método, cujos coeficientes de variação (CV) foram inferiores a 5%.

Figura 25 – Inibição da peroxidação lipídica induzida por Fe^{2+} na presença de extratos de própolis e formulações adicionadas destes extratos. A metodologia foi realizada de acordo com o item 3.2.3.2.2.1.1. F1: Formulação 1, F2: Formulação 2. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações. * Significativo $p \leq 0,05$ (Student t-test).

4.3.2.2.1.2 Determinação da inibição da degradação da deoxirribose pelas formulações adicionadas de extrato de própolis

Para verificar a eficiência do método de medida da inibição da degradação da deoxirribose, amostras contendo os extratos de própolis, as formulações base e as formulações contendo os extratos foram utilizadas no teste. O extrato de própolis alcoólico apresentou 55% de inibição e o extrato glicólico apresentou 56%, quando avaliados na concentração final de $0,05 \mu\text{L mL}^{-1}$. Porém quando as formulações acrescidas dos extratos foram avaliadas, não foi possível observar esta atividade. As formulações contendo os extratos apresentaram no máximo 15% de inibição e até mesmo apresentaram atividade pró-oxidante, ou seja, maior formação de MDA do que o controle positivo (onde não há extrato). Possivelmente a falha nesta metodologia se deve à inespecificidade do radical hidroxila, pois acredita-se que este radical reaja rapidamente com os componentes da formulação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

4.3.2.2.1.3 Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD pelas formulações adicionadas de extrato de própolis

Para verificar a eficiência do método de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD pelos extratos de própolis adicionados nas formulações, amostras contendo os extratos de própolis, as formulações base e as formulações contendo os extratos foram utilizadas no teste. No branco das formulações foi adicionado formulações base para eliminar possíveis interferentes. As amostras foram avaliadas na concentração final de $0,075 \mu\text{L mL}^{-1}$.

A inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD foi pronunciada tanto para os extratos de própolis quanto para as formulações adicionadas de extrato de própolis. Não houve diferença estatística significativa da porcentagem de inibição quimioluminescência entre os extratos sozinhos e as formulações adicionadas dos extratos. Além destes resultados, a recuperação da atividade antioxidante dos extratos de própolis se mostraram superiores a 95%, desta forma, o método utilizado para homogeneização das formulações para a avaliação desta metodologia é considerado adequado. Também foi observado que os componentes da formulação não interferiram na análise (Figura 26). Além disso, foi realizado o estudo de precisão intra- e interensaio deste método, cujos coeficientes de variação (CV) foram inferiores à 3%, desta forma, este método foi escolhido para realizar o estudo de estabilidade funcional das formulações, bem como dos extratos de própolis.

Figura 26 – Inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD na presença de extratos de própolis e formulações adicionadas destes extratos. A metodologia foi realizada de acordo com o item 3.2.3.2.2.1.3. F1: Formulação 1, F2 : Formulação 2. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 determinações.

4.3.2.2.2 Estabilidade funcional utilizando o método da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD

A administração tópica de antioxidantes têm sido citada como uma estratégia de sucesso para diminuir os danos oxidativos causados pela radiação ultravioleta além de proteger antioxidantes endógenos (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005; MONTENEGRO et al., 1995). Apesar da aplicação tópica ser bastante útil, vários obstáculos devem ser vencidos no desenvolvimento de uma formulação tópica contendo extratos naturais, pois devido à sua composição complexa, estes extratos possuem compostos inerentemente instáveis, que podem levar à instabilidade da formulação. Assim, para assegurar a estabilidade de uma formulação, são realizados testes sob condições climáticas pré-determinadas com o objetivo de fornecer informações sob o prazo de validade e recomendações de estocagem desta formulação (PINNERLL, 2003; SINGH, 1999; WESSELS et al., 1997).

A estabilidade funcional dos extratos de própolis e das formulações adicionadas destes extratos em diferentes condições de armazenamento, foram estudadas avaliando a atividade antioxidante pela inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD. Como já discutido, esta metodologia foi escolhida, pois não apresentou interferência dos componentes da formulação, demonstrou alta sensibilidade, pois foi capaz de avaliar até mesmo concentrações muito baixas dos extratos de própolis, além de também apresentar baixo coeficiente de variação quando sua precisão foi avaliada utilizando as formulações contendo os extratos (dados não mostrados).

Os resultados obtidos no estudo de estabilidade da atividade antioxidante foram expressos em porcentagem de inibição da quimioluminescência $\pm$ erro padrão da média, na Figura 27 encontram-se a atividade antioxidante dos extratos alcoólico e glicólico sozinhos, e nas Figuras 28 e 29, a atividade antioxidante das formulações 1 e 2 (adicionadas dos extratos), respectivamente. Tanto as formulações quanto os extratos foram avaliados nas concentrações finais de $0,075 \mu\text{L mL}^{-1}$ e $0,019 \mu\text{L mL}^{-1}$, que causaram cerca de 90 e 70% de inibição do sistema, respectivamente. A concentração final no meio reacional de $0,019 \mu\text{L mL}^{-1}$ foi utilizada para avaliar a perda de no máximo 10% da atividade antioxidante das formulações, adotando como grupo controle a atividade no tempo inicial de armazenamento.

Os extratos de própolis não apresentaram perda da atividade antioxidante no período de estudo em ambas temperaturas de armazenamento, pois os valores de inibição do sistema foram mantidos em aproximadamente 70%, sendo as pequenas alterações observadas referentes à variabilidade do método. Ao avaliarmos a atividade antioxidante remanescente nas formulações durante o período de estabilidade foi possível perceber que ambas formulações também não tiveram diminuição da atividade antioxidante à temperatura ambiente.

Figura 27 – Estabilidade da atividade antioxidante dos EPA e EPG utilizando o método de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD. (A) TA, (B) $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/70\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$. Os extratos de própolis foram armazenados por 1 ano e foram diluídos obtendo no meio reacional concentrações de 0,075 e 0,019 $\mu\text{L mL}^{-1}$. A linha simples se refere à curva de tendência. Os resultados representam a média de 3 determinações $\pm$ desvio padrão da média.

Figura 28 – Estabilidade da atividade antioxidante da formulação 1 utilizando o método de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD. – A) TA, B) $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/70\%\text{ UR} \pm 5\%\text{UR}$. As formulações (F1) adicionadas dos extratos de própolis EPA e EPG foram armazenadas por 1 ano e foram diluídas rendendo no meio reacional concentrações de $0,075$ e $0,019\ \mu\text{L mL}^{-1}$. A linha simples se refere à curva de tendência. Os resultados representam a média de 3 determinações $\pm$ desvio padrão da média.

Figura 29 – Estabilidade da atividade antioxidante da formulação 2 utilizando o método de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD. – A) TA, B) 40°C ± 2°C/70% UR ± 5%UR
 As formulações adicionadas dos extratos de própolis EPA e EPG foram armazenadas por 1 ano e foram diluídas rendendo no meio reacional concentrações de 0,075 e 0,019 $\mu\text{L mL}^{-1}$. A linha simples se refere à curva de tendência. Os resultados representam a média de 3 determinações $\pm$ desvio padrão da média.

No entanto, quando as formulações foram armazenadas a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/70\% \text{ UR} \pm 5\%\text{UR}$, foi possível observar que a atividade antioxidante da F1, com ambos extratos (concentração de $0,019 \mu\text{L mL}^{-1}$), começou a diminuir significativamente a partir de 90 dias de armazenamento, ou seja, estas formulações já apresentavam perda de cerca de 10 % da atividade antioxidante inicial. Após 360 dias de armazenamento nesta temperatura, foi observado que a F1 adicionada de EPA perdeu cerca de 16% da sua atividade inicial e, quando adicionada de EPG perdeu cerca de 11 % da sua atividade inicial, sugerindo a instabilidade funcional destas formulações nestas condições.

Segundo Grimm (1998) o armazenamento a 40°C com 70% UR corresponde a um valor preditivo de 3,3 na estabilidade de um produto armazenado a 30°C e 35% UR (próximo à temperatura ambiente – TA), que é a temperatura recomendada para estudos de estabilidade de longo prazo. Assim, como a F1 apresentou estabilidade funcional por 90 dias nesta condição, podemos prever uma estabilidade à TA correspondente à aproximadamente de 300 dias. Porém, como já mencionado, a F1 permaneceu estável armazenada à TA no período de estudo de 360 dias.

Ao relacionarmos os resultados apresentados pela formulação 1 nos testes físicos (instabilidade no valor do pH, no tamanho da gotícula e na coloração) com os resultados da estabilidade funcional, podemos sugerir que esta formulação apresenta uma tendência à instabilidade.

Por outro lado, a F2 adicionada de ambos extratos de própolis apresentou estabilidade funcional adequada, permitindo que a atividade antioxidante fosse mantida em torno de 70% na concentração de $0,019 \mu\text{L mL}^{-1}$ em todo período de estudo, mesmo a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/70\% \text{ UR} \pm 5\%\text{UR}$. Esta formulação também apresentou estabilidade em todos testes físicos descritos anteriormente. Desta forma, como previsto por Grimm (1998), esta formulação teria uma

estabilidade de aproximadamente 40 meses, já que permaneceu estável a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/70\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$ por 1 ano.

Outros estudos que utilizaram Polawax[®] como base auto-emulsionante para a preparação de formulações tópicas antioxidantes contendo quercetina (CASAGRANDE et al., 2006a) ou extrato de própolis verde (FONSECA, 2007), também demonstraram estabilidade funcional, quando estas formulações foram mantidas à temperatura ambiente e em condições extremas de até 45°C , sugerindo que esta base auto-emulsionante é muito promissora para veiculação de antioxidantes tópicos.

4.4 Estudos de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro*

Os estudos de liberação, permeação e retenção foram realizados com as formulações tópicas 1 e 2 adicionadas de EPA 2,5 % (v/p). As metodologias analíticas utilizadas para avaliar estes estudos foram desenvolvidas e validadas como descrito à seguir.

4.4.1 Determinação do conteúdo de ácido *p*-cumárico por CLAE

O método cromatográfico desenvolvido foi capaz de resolver adequadamente o ácido *p*-cumárico, sendo que o pico cromatográfico mostrou-se bem simétrico com tempo de retenção inferior a 12 min. como pode ser observado na Figura 30.

Figura 30 -Cromatogramas referentes a análise do ácido *p*-cumárico. A) Padrão. B) Extrato de própolis diluído 1000 vezes em metanol. 1-Ácido *p*-cumárico.

4.4.1.1 Validação do método cromatográfico

4.4.1.1.1 Linearidade do método cromatográfico

A melhor relação de linearidade foi encontrada plotando as alturas dos picos registrados no eixo das ordenadas e as respectivas concentrações no eixo das abscissas. Desta forma através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados obteve-se uma relação linear entre as concentrações de 25, 50, 100, 500, 1000 e 5000 ng mL⁻¹ de ácido *p*-cumárico (Figura 31). O coeficiente de correlação linear foi de 0,9995 apresentando-se dentro das normas (BRASIL - ANVISA, 2003).

Figura 31 – Faixa de linearidade do método cromatográfico de separação do ácido *p*-cumárico. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos realizados em paralelo.

4.4.1.1.2 Precisão e exatidão

A precisão nos estudos inter e intra-ensaio foram determinados usando duas concentrações da faixa de concentração esperada para as amostras. Na avaliação da precisão interensaio, todas as concentrações avaliadas foram analisadas em quintuplicata ($n = 5$) durante 5 dias consecutivos enquanto que na precisão intra-ensaio, as amostras foram analisadas em decuplicata ($n = 10$). Esse parâmetro é avaliado pelo cálculo do CV. Com os métodos desenvolvidos foram obtidos valores de CV inferiores a 5% (BRASIL - ANVISA, 2003) (Tabela 6).

A exatidão foi avaliada pela análise dos mesmos dados utilizados nos cálculos da precisão intra- e interensaio. Os resultados foram expressos em porcentagem do erro relativo, que para esse tipo de estudo deve ser de até 15% do valor nominal (BRASIL - ANVISA, 2003). Para as duas concentrações investigadas, tanto no estudo intra- como no estudo interensaio, a média do E ficou abaixo de 4,77 %.

Tabela 6 - Precisão e exatidão intra- e interensaio para análise do ácido *p*-cumárico

Concentração nominal (ng mL ⁻¹)	Média das concentrações avaliadas (ng mL ⁻¹)	E (%) ^a	CV (%) ^b
Intra-ensaio (n = 10)^c			
25 ^e	26,1	4,73	4,90
75	75,1	0,14	3,38
4000	3900	-2,60	2,19
Interensaio (n = 5)^d			
75	73,8	4,25	-1,50
4000	3806	4,77	-4,83

^a expressa em % do erro sistemático; ^b expressa em % do coeficiente de variação; ^c número de amostras; ^d número de dias; ^e limite de quantificação, n = 5.

4.4.1.1.3 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação é usado para expressar a menor concentração que o método é capaz de quantificar com precisão inferior a 20%, e deve ser a menor concentração da curva padrão (EUA – FDA, 2001).

Para análise do ácido *p*-cumárico, na concentração avaliada (25 ng mL⁻¹) o valor foi de 4,9 % para o CV e de 4,73 % para o E (Tabela 6).

4.4.1.1.4 Seletividade

A seletividade é a capacidade do método em diferenciar o analito de todas as outras substâncias presentes na amostra (CAUSON, 1997). Assim, a presença de interferentes foi avaliada pela análise de amostras da solução receptora provenientes dos estudos de liberação das formulações branco ou adicionadas de EPA. O método desenvolvido para quantificar ácido *p*-cumárico na solução receptora foi considerado seletivo, pois nenhum interferente presente na solução receptora durante os estudos de liberação foi detectado como pode ser verificado nas Figuras 32A e 33A.

Figura 32- Cromatogramas referentes a formulação 1. A) Solução receptora após 6 horas de liberação da F1 Base; B) Solução receptora após 6 horas de liberação da F1 adicionada de EPA. 1-Ácido *p*-cumárico.

Figura 33 –Cromatogramas referentes à formulação 2. A) Solução receptora após 6 horas de liberação da F2 Base; B) Solução receptora após 6 horas de liberação da F2 adicionada de EPA. 1-Ácido *p*-cumárico.

4.4.1.1.5 Estabilidade

A estabilidade de amostras de ácido *p*-cumárico em solução receptora foi testada durante ciclos de congelamento e descongelamento, à temperatura ambiente por 12 horas (25°C) e em banho-maria a 37°C por 12 horas sobre a bancada de trabalho (todas amostras mantidas protegidas da luz), com o objetivo de reproduzir as condições reais de manuseio e análise das amostras (BRASIL - ANVISA, 2003). As amostras também foram avaliadas depois de expostas à luz por 12 horas. Para estas avaliações, a altura dos picos destas amostras foram comparadas à altura dos picos de amostras recém preparadas por análise estatística (Teste t-student) e considerando o valor do p, sendo estatisticamente significativo $p \leq 0,05$. O valor do p das amostras pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7 – Avaliação da estabilidade do ácido *p*-cumárico pela avaliação da altura dos picos das amostras comparadas às amostras recém preparadas realizando análise estatística (Teste t-student) e considerando o valor do p

Concentração (ng mL ⁻¹)	Ciclos de congelamento	Valor do p		
		37°C	25°C	Exposta a luz
75	0,137	0,982	0,110	0,601
4000	0,575	0,605	0,274	0,00002*

* $p \leq 0,05$

Foi observado que houve uma diferença estatística com relação à amostra de alta concentração exposta à luz, e este resultado indica instabilidade do ácido *p*-cumárico quando exposto à luz, o que está de acordo com Takeshita et al. (2000) que indicaram fotodegradação do ácido *p*-cumárico pela exposição à luz.

4.4.1.1.6 Aplicação do método

A quantificação do ácido *p*-cumárico foi realizada no extrato de própolis alcoólico. Foi determinado que cada mL de extrato de própolis apresenta 0,82 mg de ácido *p*-cumárico

(Figura 30B). A separação do ácido *p*-cumárico nas soluções receptoras das formulações 1 e 2 durante os estudos de liberação, também podem ser observado nas Figuras 32B e 33B.

4.4.2 Determinação da atividade antioxidante por quimioluminescência

4.4.2.1 Validação do método quimioluminescente

4.4.2.1.1 Linearidade do método

A faixa de linearidade foi encontrada plotando as porcentagens de inibição no eixo das ordenadas e as respectivas concentrações no eixo das abscissas. Desta forma, através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados obteve-se uma relação (quase) linear entre as concentrações de 0,005, 0,007, 0,009 e 0,014 $\mu\text{L mL}^{-1}$ no meio de reação.

Figura 34 – Faixa de linearidade do método de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD pelo extrato de própolis alcoólico. Resultados são a média $\pm$ erro padrão de três experimentos realizados em paralelo.

O coeficiente de correlação linear foi de $(r) \geq 0,9675$, apesar de estar abaixo das recomendações da ANVISA para métodos bioanalíticos, cujo r deve ser igual ou superior à 0,98 (BRASIL - ANVISA, 2003), este valor foi considerado aceitável pela complexidade do

método, pois envolve reações para a geração do radical superóxido por ação enzimática (GIROTTI et al., 2000) seguido pelo seqüestro deste radical, além da ação de muitos compostos presentes no extrato de própolis (PARK et al., 2002).

4.4.2.1.2 Precisão

Na avaliação da precisão interensaio, as concentrações avaliadas foram analisadas em quintuplicata ($n = 5$) durante 5 dias consecutivos enquanto que na precisão intra-ensaio, as amostras foram analisadas em decuplicata ($n = 10$).

Esse parâmetro foi avaliado pelo cálculo do CV. Com os métodos desenvolvidos foram obtidos valores de CV inferiores a 10% (Tabela 8), o que torna este método aceitável dentro das normas para métodos bioanalíticos (BRASIL, ANVISA, 2003).

Tabela 8 – Precisão da atividade antioxidante do extrato de própolis avaliado na solução receptora

Concentração final no meio reacional ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Inibição encontrada (%)	CV (%) ^a
Intra-ensaio ($n = 10$)^b		
0.005 ^c	41.0	8.32
0.007	55.5	2.95
0.014	69.0	2.01
Interensaio ($n = 5$)^d		
0.005	43.4	7.22
0.007	54.5	5.40
0.014	70.8	3.47

^a Expresso como desvio padrão relativo; ^b Número de amostras; ^c Limite de quantificação, $n = 5$; ^d Número de dias.

4.4.2.1.3 Limite de quantificação (LQ)

A concentração mais baixa da curva padrão ($0,005 \mu\text{L mL}^{-1}$) foi avaliada e apresentou CV de 8,32 % (Tabela 8), estando esta dentro das normas (EUA – FDA, 2001).

4.4.2.1.4 Estabilidade

A estabilidade da atividade antioxidante foi avaliada em ciclos de congelamento, onde a atividade antioxidante das amostras foram comparadas à atividade de amostras preparadas à fresco por análise estatística, considerando o valor do p , sendo estatisticamente significativo $p \leq 0,05$ (Teste t-student). As concentrações finais no meio reacional de 0,005, 0,007 e 0,014 $\mu\text{L mL}^{-1}$ quando comparadas à amostras à fresco, apresentaram valor do p igual a 0,671, 0,097 e 0,098, respectivamente. Foi também realizado um estudo de estabilidade da atividade antioxidante em diferentes tempos de coleta em célula de Franz, a 37°C, comparadas com a atividade da amostra inicial. As amostras retiradas nos tempos 4, 8, 12 e 24 horas apresentaram valor de p igual a 0,222, 0,778, 0,797 e 0,250 respectivamente. Desta forma, as amostras se apresentaram estáveis.

4.4.2.1.5 Aplicação do método

A curva de atividade antioxidante dose-resposta do extrato de própolis foi realizada novamente e apresentou-se semelhante à curva obtida anteriormente (dados não mostrados). Esta avaliação foi novamente feita, pois a diluição das amostras no tampão com pH e composição diferente poderia ter influenciado a atividade antioxidante. A avaliação da atividade antioxidante da solução receptora nos estudos de liberação/permeação serão descritos posteriormente. A atividade antioxidante do ácido *p*-cumárico também foi determinada e pode ser observada na Figura 35. Foi observado que o ácido *p*-cumárico apresentou IC_{50} de 1,78 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 35 - Inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD pelo ácido *p*-cumárico. As concentrações finais do ácido *p*-cumárico no meio reacional foram 0,375, 0,75, 1,5 e 3 µg mL⁻¹. Os resultados representam a média ± erro padrão de 3 determinações.

4.4.3 Estudo de “Sink Conditions” para a avaliação da atividade antioxidante nos estudos de liberação e permeação

Para a realização dos estudos de liberação e permeação/retenção cutânea, solução tampão fosfato isotônico foi empregada como solução receptora com o intuito de mimetizar as condições fisiológicas da pele e 0,5% de polissorbato 20 foi empregado para garantir que toda fração apolar do extrato possa ser solubilizada. Para demonstrar a capacidade desta solução em solubilizar todos os componentes do EPA disponíveis para serem liberados da formulação, foram realizados os estudos de “sink conditions”.

Após as devidas diluições, as amostras retiradas da célula que continha a concentração real (Amostra A) de extrato de própolis apresentou uma porcentagem de inibição de 49,54 % ± 10,07 e as amostras retiradas da célula que continha 10 vezes mais que a concentração real (Amostra B) apresentou 50,51 % ± 8,41. Após a análise estatística foi obtido um valor de $p = 0,612$, demonstrando que as amostras não são significativamente diferentes (Teste t-student), indicando a capacidade do tampão proposto em solubilizar adequadamente os componentes antioxidantes do EPA.

4.4.4 Estudo de liberação *in vitro* de formulações tópicas adicionadas de extrato de própolis

Os estudos de liberação são de grande importância, pois podem ser uma maneira de avaliar a habilidade de um veículo em liberar uma substância ativa nas condições do teste (ADDICKS et al., 1990).

O ácido *p*-cumárico foi escolhido como marcador para avaliar a liberação do extrato de própolis por CLAE ($0,82 \text{ mg mL}^{-1}$), pois é um dos constituintes majoritários na própolis brasileira (KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004) e principalmente da região sudeste do Brasil (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; SOUSA, 1999). Foi observado na literatura que o ácido *p*-cumárico apresenta um logP (octanol/água) de 1,46 (<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/jsp/common/PhysicalProperties.jsp>), que está dentre os valores (logP de 1-3) indicativos de um ótimo comportamento de partição (HADGRAFT, 2004). Além disso, apresenta solubilidade em água de $18,3 \text{ mg mL}^{-1}$ (<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/jsp/common/PhysicalProperties.jsp>) indicando que a “sink conditions” para o ácido *p*-cumárico é garantida na solução receptora aquosa do sistema de liberação, pois a concentração de ácido *p*-cumárico em 1 grama de formulação é $20,5 \text{ } \mu\text{g}$. Além disso, a escolha do ácido *p*-cumárico levou em conta a potencial atividade antioxidante deste composto fenólico, que foi revista detalhadamente por Soares (2002).

Os experimentos de liberação foram realizados por 24 horas. Os cálculos de liberação foram realizados utilizando as equações da reta obtidas nas avaliações de linearidade dos métodos de determinação do conteúdo de ácido *p*-cumárico por CLAE e de medida da atividade antioxidante por quimioluminescência. A atividade antioxidante determinada por quimioluminescência foi expressa como EEP (equivalentes ao extrato de própolis), pois não se tem certeza da extensão da liberação dos diferentes componentes do extrato. Os dados do

estudo de liberação do ácido *p*-cumárico e de EEP das formulações estão descritos nas Tabelas 9 e 10, respectivamente.

Tabela 9 –Liberação do ácido *p*-cumárico das formulações 1 e 2 adicionadas de extrato de própolis

Formulação 1			Formulação 2	
Tempos (horas)	$\mu\text{g mL}^{-1} \pm \text{DP}$ (n = 5)	C_{12} (μg) *	$\mu\text{g mL}^{-1} \pm \text{DP}$ (n = 5)	C_{12} (μg) *
2	$0,41 \pm 0,02$	4,92	$0,25 \pm 0,00$	3,88
4	$0,58 \pm 0,04$	6,96	$0,32 \pm 0,01$	3,88
6	$0,68 \pm 0,05$	8,14	$0,41 \pm 0,03$	4,86
8	$0,75 \pm 0,05$	9,00	$0,44 \pm 0,07$	5,22
10	$0,80 \pm 0,04$	9,64	$0,53 \pm 0,00$	6,32
12	$0,84 \pm 0,08$	10,06	$0,55 \pm 0,00$	6,59
24	$1,24 \pm 0,05$	14,91	$0,77 \pm 0,01$	9,20

* as concentrações de ácido *p*-cumárico na solução receptora foram corrigidas devido à retirada de 600 μL da solução receptora em cada tempo de análise.

C = Conteúdo total de ácido *p*-cumárico liberado na solução receptora ($v = 12\text{mL}$).

Tabela 10 –Liberação de EEP das formulações 1 e 2 adicionadas de extrato de própolis

Formulação 1			Formulação 2	
Tempos (horas)	% inibição $\pm \text{DP}^a$ (n = 5)	C_{12} (μL)*	% inibição $\pm \text{DP}^a$ (n = 5)	C_{12} (μL)*
2	$38,20 \pm 4,42$	0,74	$40,05 \pm 6,25$	0,80
4	$45,37 \pm 4,42$	1,06	$45,00 \pm 4,86$	1,04
6	$55,07 \pm 10,03$	1,49	$55,69 \pm 6,59$	1,52
8	$56,83 \pm 6,66$	1,63	$51,47 \pm 5,18$	1,42
10	$63,24 \pm 4,17$	1,98	$52,66 \pm 3,41$	1,53
12	$67,67 \pm 6,28$	2,23	$57,04 \pm 3,54$	1,77
24	$73,07 \pm 4,13$	2,54	$64,94 \pm 8,44$	2,16

* as concentrações de extrato na solução receptora foram corrigidas devido à retirada de 600 μL da solução receptora em cada tempo de análise.

^a % de inibição da quimioluminescência encontrada em 50 μL da solução receptora em cada tempo de retirada da amostra.

C = Conteúdo total de EEP liberada na solução receptora ($v = 12\text{mL}$).

O perfil de liberação do ácido *p*-cumárico de ambas formulações durante 24 horas de estudo estão presentes na Figura 36A. Foi encontrado que após 12 horas, $5,68 \mu\text{g cm}^{-2}$ (49,07%) de ácido *p*-cumárico foi liberado da F1 (menor conteúdo graxo), enquanto

3,72 $\mu\text{g cm}^{-2}$ (32,15%) foi liberado da F2 (maior conteúdo graxo) e esta diferença na liberação foi mantida nas horas seguintes (Tabela 11).

Figura 36 – Liberação do ácido *p*-cumárico (A) e EEP (B) das formulações 1 (■) e 2 (▲) adicionadas de extrato de própolis.

A Figura 36B mostra o perfil de liberação de EEP. Foi encontrado que após 12 horas, as F1 e F2 liberaram 1,26 $\mu\text{L cm}^{-2}$ (8,92%) e 1,0 $\mu\text{L cm}^{-2}$ (7,08%) de EEP, respectivamente (Tabela 11). No entanto, até 6 horas de experimento, ambas formulações liberaram cerca de 0,85 $\mu\text{L cm}^{-2}$ de EEP.

O perfil de liberação observado para estas formulações pode ser resultado da influência de diferentes fatores, tais como os parâmetros reológicos do veículo (CSÓKA et al., 2005), o pH da formulação (GOGOLEVA et al., 1999) e também a solubilidade (SMITH; SURBE; MAIBACH, 1999) dos diferentes componentes do EPA nas formulações. Já está bem esclarecido que a composição do veículo pode influenciar a liberação das substâncias ativas, pois estabelecem a solubilidade da substância no veículo e determinam se ela estará ionizada ou não, desta forma, definindo o gradiente de concentração para a difusão passiva (SMITH; SURBE; MAIBACH, 1999).

Nestes estudos, foi observado uma maior liberação do ácido *p*-cumárico bem como de EEP da F1, que possui um menor conteúdo graxo. Este resultado poderia ser atribuído à

reduzida atividade termodinâmica dos componentes do EPA na F2, cujo maior conteúdo graxo permitiu maior solubilidade dos componentes do extrato, desfavorecendo a partição (liberação) dos mesmos da fase oleosa. No entanto, também podemos observar que a liberação de EEP nas primeiras horas de experimento foi semelhante entre as formulações 1 e 2, sugerindo que neste período houve principalmente uma liberação dos compostos menos lipossolúveis presentes no EPA em ambas formulações. Nas horas seguintes, provavelmente os compostos mais lipossolúveis foram liberados e o conteúdo graxo das formulações então, modularam o perfil de liberação.

Os resultados de liberação obtidos corroboram com Getie et al. (2002). Estes autores mostraram que os flavonóides, que são compostos fenólicos, apresentaram maior facilidade de serem liberados de cremes com menor conteúdo oleoso do que de cremes com maior conteúdo oleoso. Além disso, Casagrande e colaboradores (2005) também demonstraram que o flavonóide quercetina apresentou uma maior liberação de formulações com menor conteúdo graxo.

Os dados de liberação da porção linear das curvas de liberação foram avaliados matematicamente seguindo os modelos de ordem zero (concentração *versus* tempo), pseudoprimeira ordem (concentração *versus* raiz quadrada do tempo) e primeira ordem (Log da concentração *versus* tempo) com o objetivo de determinar a cinética de liberação das formulações desenvolvidas (Figuras 37 e 38).

Após a avaliação dos modelos matemáticos e comparando os coeficientes de correlação linear (r), foi observado que as cinéticas de liberação (maior r), não só do ácido *p*-cumárico, como também de EEP, seguem o modelo de pseudoprimeira ordem, também conhecido como modelo de Higuchi. Desta forma, indicando que o passo determinante da velocidade de liberação dos componentes do extrato de própolis deve ser o processo de difusão pelo sistema (HIGUCHI, 1962; LARRUCEAE et al., 2001).

Figura 37 - Modelos da cinética de liberação do ácido *p*-cumárico das formulações 1 e 2. *J* = Fluxo (obtido da inclinação da reta nos diferentes modelos matemáticos); *r* = Coeficiente de correlação linear observado nos diferentes modelos matemáticos.

Figura 38 - Modelos da cinética de liberação de EEP das formulações 1 e 2. J = Fluxo (obtido da inclinação da reta nos diferentes modelos matemáticos); r = Coeficiente de correlação linear observado nos diferentes modelos matemáticos.

Após a determinação do modelo de liberação também foi possível determinar o coeficiente de difusão do ácido *p*-cumárico e de EEP das formulações (Tabela 11). O coeficiente de difusão reflete a facilidade pela qual as moléculas se movem através da

formulação (LARRUCEA et al., 2001). Assim, os coeficientes de difusão obtidos demonstram mais uma vez a capacidade da F1 em liberar mais facilmente os componentes em estudo.

Tabela 11 – Comparação do conteúdo liberado (12 horas) e coeficiente de difusão do ácido *p*-cumárico e EEP nas formulações após 12 h

	Ácido <i>p</i> -cumárico		EEP	
	Q ₁₂ (μg cm ⁻²)	D (cm ² s ⁻¹)	Q ₁₂ (μL cm ⁻²)	D (cm ² s ⁻¹)
F1	5.68	1,39x10 ⁻⁶	1.26	6,86x10 ⁻⁸
F2	3.72	5,99x10 ⁻⁷	1.00	4,32x10 ⁻⁸

Q₁₂ = Conteúdo de ácido *p*-cumárico ou EEP liberado em 12 h.

D = Coeficiente de difusão.

Comparando os perfis de liberação em ambas formulações, também pôde ser observado que o ácido *p*-cumárico foi liberado mais facilmente do que EEP. O ácido *p*-cumárico foi liberado cerca de 5 vezes mais do que EEP. Este resultado obtido poderia estar relacionado à diferença na solubilidade do ácido *p*-cumárico (hidrossolúvel) e dos compostos antioxidantes do EPA (solubilidades diferenciadas) nas formulações. Além disso, a atividade termodinâmica dos componentes antioxidantes do EPA poderia ter sido reduzida devido à prévia solubilização do extrato em propilenoglicol para ser incorporado às formulações. Sabe-se que a atividade termodinâmica da substância ativa é, evidentemente, o determinante da atividade biológica. Se a solubilidade da substância ativa na formulação for aumentada pela adição de propilenoglicol, seu coeficiente de partição (K_{o/a}), será reduzido. Por outro lado, aumentar a quantidade desta substância ativa que pode ser incorporada na formulação é uma vantagem, já que o gradiente de concentração aumentará. Desta forma, seria ideal encontrar uma quantidade ótima do solubilizador, sem adicionar excessos e causar dessaturação do sistema e, portanto, um decréscimo da atividade termodinâmica (FLORENCE; ATTWOOD, 2003; SMITH; SURBE; MAIBACH, 1999).

Com o objetivo de avaliar mais detalhadamente os resultados obtidos, também estimamos o conteúdo de ácido *p*-cumárico que seria correspondente à porcentagem de inibição da quimioluminescência encontrada na solução receptora durante os estudos de liberação. Para esta estimativa, foi utilizada a equação da reta obtida na construção de uma curva padrão ao plotar-se as concentrações de ácido *p*-cumárico versus a porcentagem de inibição de cada concentração ($y = 12,11x + 25,15$, $r = 0,9673$). Assim, após 24 horas do início dos estudos de liberação, a solução receptora apresentou 73,1 % e 64,9 % de inibição da quimioluminescência, o que então corresponderiam a 52,9 e 44,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido *p*-cumárico para as F1 e F2, respectivamente. Estes valores são bem maiores do que aqueles determinados por CLAE (1,24 e 0,77 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a F1 e F2, respectivamente). Além disso, sabe-se que em 1 grama de formulação, presente no compartimento doador da célula de Franz, continha 25 μL de extrato, cujo conteúdo de ácido *p*-cumárico era de 20,5 μg . Com esta comparação se tornou fácil perceber que muitos outros compostos devem estar sendo liberados e que o método antioxidante é capaz de determinar a completa atividade biológica que é liberada da formulação. Em adição, após a avaliação dos valores de IC_{50} do EPA (0,006 $\mu\text{L mL}^{-1}$, aproximadamente 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e do ácido *p*-cumárico (1,78 $\mu\text{g mL}^{-1}$) observamos que o ácido *p*-cumárico é 3 vezes mais ativo que o EPA. No entanto, sabe-se que o extrato de própolis alcoólico possui somente 11% de sólidos totais (com IC_{50} equivalendo a 0,66 μg de sólidos totais mL^{-1}) e comparando-se com uma substância pura, pode ser sugerido que outros compostos, além do ácido *p*-cumárico, presentes no EPA agem sinergicamente para apresentar a alta atividade antioxidante do extrato.

É também importante ressaltar que a avaliação da atividade antioxidante em estudos de liberação poderia ser uma forma de padronização da liberação de formulações que contém extratos de própolis de origens diferentes, pois sabe-se que a composição química da própolis é diversificada de região para região até no mesmo país. Como observado por Park et al.

(2002), a própolis da região sudeste do Brasil apresenta como maiores constituintes o ácido *p*-cumárico, pinobanksina e kampferida, enquanto que na região sul apresenta pinobanksina 3-acetato, chrisina etc, e, no entanto, na região nordeste, nenhum destes componentes está presente.

Os resultados obtidos com o método antioxidante mostram a real capacidade de atividade antioxidante liberada. Porém, podemos sugerir que a quantificação de um marcador como o ácido *p*-cumárico, também é muito importante e poderia ser um parâmetro para comparar a liberação entre diferentes formulações adicionadas de extrato de própolis durante o desenvolvimento de novos produtos.

4.4.5 Estudo de permeação e retenção *in vitro* das formulações tópicas adicionadas de extrato de própolis

A metodologia analítica para avaliar os estudo de permeação e retenção foi de atividade antioxidante, por melhor representar o conteúdo de extrato de própolis que pode alcançar a epiderme viável e exercer seu efeito antioxidante.

4.4.5.1 Permeação e retenção em pele de camundongo e de porco

O desenvolvimento de uma formulação tópica adicionada de uma substância ativa exige o conhecimento de sua penetração, retenção (na pele) e de sua possível absorção (pela circulação sanguínea). A eficácia de produtos para tratamento de pele é medida por testes clínicos, que é um processo caro e que leva muito tempo, sendo assim, é usualmente possível trocar alguns testes clínicos durante o desenvolvimento de produtos por testes laboratoriais que se relacionam com o resultado clínico. Desta forma, estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro* são úteis para avaliar substâncias ativas e comparar formulações, assim pele de camundongo, pele humana proveniente de cirurgia plástica e pele de orelha de porco têm

sido empregada nestas avaliações. A permeabilidade da pele de porco tem sido amplamente estudada e foi demonstrado ser um bom modelo animal por apresentar propriedades histológicas e fisiológicas similares à da pele humana (PAGLIARA et al., 1999).

Para que formulações tópicas adicionadas de extrato de própolis apresentem efeito fotoquimioprotetor é de extrema necessidade que os compostos antioxidantes ultrapassem o estrato córneo e fiquem retidos nas camadas mais inferiores da pele. Para obtenção deste tipo de informação no estudo de permeação e retenção cutânea, a pele que sofreu o processo de permeação foi avaliada quanto à retenção da atividade antioxidante. Porém, está estabelecido que quando conduzidos experimentos de permeação *in vitro*, o estrato córneo é a camada limitante da permeação (ZATZ, 1993). Assim, se avaliássemos a pele como um todo, os resultados não seriam conclusivos, pois os compostos antioxidantes poderiam estar retidos somente no estrato córneo. Desta forma, foi realizado o procedimento de retirada do estrato córneo somente da pele de porco por “tape stripping”, e a atividade antioxidante tanto do estrato córneo, quanto do restante da pele foi avaliado após o experimento de permeação.

Os experimentos com as peles de porco e de camundongo sem pêlo foram realizados por 12 horas. A porcentagem de inibição encontrada na solução receptora após a permeação e na amostra ressuspensa após a extração realizada em cada pele ou na amostra de estrato córneo foi estimada como EEP (Tabelas 12 e 13).

Tabela 12- Porcentagem de inibição e correspondente EEP estimado para os estudos de permeação e retenção em pele de camundongo após 12 horas de experimento

	Permeação			Retenção		
	% inibição* ± DP	C ₁₂ (μL)	Q ₁₂ (μL cm ⁻²)	% inibição* ± DP	C ₁₂ (μL g ⁻¹)	Q ₁₂ (μL cm ⁻²)
F1	42,05 ± 7,50	0,86	0,49	38,51 ± 15,04	0,14	0,014
F2	38,99 ± 14,99	0,76	0,43	33,58 ± 23,08	0,13	0,013

* % inibição encontrada para 50 μL de amostra no meio reacional, n = 5.

C₁₂ = Conteúdo total de EEP permeado na solução receptora (v = 12mL) ou retido na pele em 12 horas de experimento.

Q₁₂ = Conteúdo de EEP permeado na solução receptora (v = 12mL) ou retido na pele em 12 horas de experimento avaliado pela área de contato.

Tabela 13- Porcentagem de inibição e correspondente EEP estimado para os estudos de permeação e retenção em pele de porco após 12 horas de experimento

	Permeação			Retenção		
	% inibição** ±DP	C ₁₂ (μL)	Q ₁₂ (μL cm ⁻²)	% inibição** ± DP	C ₁₂ (μL g ⁻¹)	Q ₁₂ (μL cm ⁻²)
F1	37,51 ± 17,40	0,70	0,40	14,7 ± 13,03	-*	-*
F2	22,80 ± 23,49	-*	-*	51,28 ± 9,41 [†]	0,121	0,03

* A média da % de inibição está abaixo do limite de quantificação do método, desta forma a concentração correspondente de EEP não foi determinada.

** % inibição encontrada para 50 μL de amostra no meio reacional, n = 5.

C₁₂ = Conteúdo total de EEP permeado na solução receptora (v = 12mL) ou retido na pele (sem estrato córneo) em 12 horas de experimento.

Q₁₂ = Conteúdo de EEP permeado na solução receptora (v = 12mL) ou retido na pele em 12 horas de experimento avaliado pela área de contato.

[†] Significativamente diferente (p < 0,05), avaliado pelo teste t-student.

A atividade antioxidante das amostras de estrato córneo após ressuspensas em metanol foram todas inferiores ao limite de quantificação do método por quimioluminescência, apresentando inibições inferiores a 10%. Uma alternativa seria ressuspender as amostras após secas em ar comprimido em um volume menor de metanol, porém houve muita interferência dos componentes extraídos da fita adesiva mesmo avaliando várias marcas de fita. No entanto, foi observado que a epiderme viável e a derme da pele de porco reteve compostos antioxidantes, como observado na Tabela 13.

No estudo de permeação/retenção cutânea utilizando pele de camundongo, pode ser observado que a quantidade de EEP é ligeiramente maior para a F1 tanto no permeado quanto no retido, porém sem diferença estatística (p > 0,05). Enquanto que no estudo de permeação/retenção cutânea na pele de porco, foi observado que a F1 permitiu uma maior permeação, porém foi a F2 que permitiu uma maior retenção cutânea (p < 0,05). Assim, além de ter apresentado uma maior retenção cutânea, a F2 apresentou menor permeação. Desta forma, esta formulação apresentou características desejadas como descrito por Zatz (1993), onde uma substância que deve exercer sua atividade nos tecidos da pele, deve ter uma boa penetração/retenção na pele com uma mínima permeação para os vasos sanguíneos.

Como já discutido, o veículo pode influenciar na liberação da substância ativa, principalmente por determinar sua solubilidade e o gradiente de concentração para a difusão passiva, porém o veículo pode exercer mais efeitos quando aplicados na pele. O veículo pode interagir com o estrato córneo desestabilizando a função barreira e provocando mudanças na solubilidade e na difusão da substância ativa pelo estrato córneo. Está estabelecido que componentes adicionados ao veículo, como também outros fatores, como a forma da droga, afetam não só a liberação e permeação, mas também a sua ação. Esta relação pode estar fundamentada no fato dos veículos aplicados terem o potencial de aumentar ou diminuir a quantidade de água no estrato córneo e, portanto aumentar ou diminuir a penetração (ROUGIER et al., 1999). Como por exemplo, em um estudo de permeação foi observado que a absorção de ácido benzóico variou num fator de 50, onde a maior penetração foi observada quando a solubilidade no veículo foi de moderada à baixa, enquanto que no veículo mais solúvel, quase não houve permeação. Em geral, admite-se que a permeação de um composto pode ser favorecida pela seleção de veículos que tenham baixa afinidade pelo composto ou naquele em que seja pouco solúvel (SMITH; SURBE; MAIBACH, 1999).

Estas interações veículo/substância ativa/pele podem explicar o fato da diferença na liberação e na permeação/retenção entre as duas formulações em estudo, devido ao conteúdo graxo entre elas. Desta forma, foi observado que a F2 apesar de liberar um pouco menos EEP que a F1, foi capaz de promover uma maior retenção na pele de porco, provavelmente devido à interação de seus componentes graxos com o estrato córneo mais espesso, desestruturando-o e permitindo a maior passagem dos componentes ativos do extrato de própolis. Provavelmente esta desestruturação foi menor na pele de camundongo, devido à variabilidade entre as espécies quanto à espessura do estrato córneo, onde os componentes da formulação poderiam interagir, assim, os componentes da formulação tiveram pouca influencia neste tecido.

4.4.5.2 Estudo de interferentes do método de retenção cutânea

Os estudos para avaliação de interferentes no método de retenção cutânea de compostos antioxidantes provenientes do extrato de própolis foram realizados contaminando a pele de porco sem estrato córneo com concentrações conhecidas de extrato de própolis, realizando o processo de extração e determinando a atividade antioxidante destas amostras. Neste experimento foi utilizado pele de porco sem estrato córneo, pois nos experimentos de permeação e retenção cutânea a pele sofreu “tape stripping”. Os resultados obtidos estão na Tabela 14.

Este método foi proposto tanto com o objetivo de avaliar a recuperação dos compostos antioxidantes do extrato de própolis, quanto avaliar a interferência dos antioxidantes próprios da pele que poderiam estar sendo extraídos mesmo apesar de estarmos usando uma amostra de pele como branco. Foi observado que a amostra extraída da pele como branco apresentou uma significativa inibição da quimioluminescência comparada à amostra contendo somente metanol (controle positivo). No entanto, como esta amostra de pele (branco) passou a ser considerada o controle positivo para análise das amostras de pele experimentais, esta interferência foi superada como pode ser observado pela recuperação obtida.

Tabela 14– Recuperação do método de extração da atividade antioxidante retida em pele de porco

Concentração final no meio ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Amostras da Recuperação		Amostras do Extrato		Recuperação
	Amostra (n = 5)	% Inibição $\pm$ DP	Amostra (n = 5)	% Inibição $\pm$ DP	%
0,014	I	51,06 $\pm$ 3,37	I	51,00 $\pm$ 5,85	-
	II	54,90 $\pm$ 4,42	II	52,38 $\pm$ 4,21	-
	III	49,12 $\pm$ 2,41	III	-	-
	Média	51,69 $\pm$ 2,94	Média	51,69 $\pm$ 0,97	100 %
0,007	I	38,22 $\pm$ 10,2	I	42,80 $\pm$ 4,68	-
	II	41,22 $\pm$ 5,86	II	41,37 $\pm$ 5,88	-
	III	38,02 $\pm$ 7,9	III	-	-
	Média	39,15 $\pm$ 1,79	Média	42,08 $\pm$ 1,011	93,04 %

Como observado, o método apresentou 100 e 93% de recuperação, para as concentrações 0,014 e 0,007 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente. Estes resultados estão de acordo Bronaugh e colaboradores (1999) que indicam que a recuperação normalmente deve ser acima de 80%, assumindo que o método tem credibilidade.

4.5 Estudos preliminares da eficácia *in vivo* (fotoquimioproteção) da formulação adicionada de extrato de própolis

4.5.1 Medida da irradiância da lâmpada UVB

A média da irradiação encontrada utilizando radiômetro IL 1700 foi de $2,6075 \times 10^{-4} \text{ W cm}^{-2}$ para a exposição UVB e $3,305 \times 10^{-4} \text{ W cm}^{-2}$ para a exposição UV.

4.5.2 Determinação da Dose Eritematogênica Mínima (DEM)

Os animais expostos a 2 minutos de irradiação não apresentaram visualmente nenhum tipo de alteração por um período de 144 horas. Somente 2 animais expostos a 4 minutos de irradiação apresentaram eritema muito leve após 4 horas da irradiação, que logo desapareceu e não apresentaram outras alterações visuais. No entanto, os animais ($n = 3$) expostos a 6 minutos de irradiação apresentaram eritema evidente após 4 horas da irradiação que se manteve por 72 horas. Estes animais também apresentaram leve edema e descamação após 48 horas de irradiação.

Assim, o tempo de 6 minutos de exposição à irradiação UVB, ou seja, a dose de $93,87 \text{ mJ cm}^{-2}$, foi estabelecida como a Dose Eritematogênica Mínima (DEM).

4.5.3 Avaliação da inibição da formação de eritema pelas formulações adicionadas de extrato de própolis

A exposição aguda da pele à radiação UV determina uma resposta inflamatória imediata cujo efeito visível é o eritema, enquanto que a exposição crônica pode levar ao fotoenvelhecimento e mesmo ao desenvolvimento de câncer de pele. O processo inflamatório inclui a liberação de citocinas proinflamatórias, infiltração de células proinflamatórias e produção de EROS que desempenham um importante papel no desenvolvimento dos prejuízos que a radiação UV causam na pele (AFAQ, ADHAMI; MUKHTAR, 2005).

O eritema induzido por UVB pode ser visto como um método adequado para avaliar o dano agudo na pele por UV (MONTENEGRO et al., 1995), além de também ser uma ferramenta útil para medir a atividade sequestradora de radicais livres em compostos aplicados topicamente (BONINA, et al., 1998; SAIJA et al., 1998). A ação de alguns fotoquimioprotetores, como a enzima superóxido dismutase (SOD) e polifenóis do chá verde (DI MAMBRO; FONSECA, 2007; ELMETS et al., 2001) têm sido avaliada e demonstraram inibição do eritema UV induzido.

O estudo *in vivo* para avaliar o efeito de fotoquimioproteção do extrato de própolis foi realizado utilizando a F2, preparada com a base auto-emulsionante Polawax[®] adicionada de 2,5 % de extrato de própolis alcoólico, pois esta formulação se apresentou estável e com capacidade de permeação e retenção cutânea.

Na avaliação visual, os animais dos grupos controle (C - sem tratamento) e aqueles tratados com as formulações base (F2 B) sem extrato de própolis em ambos protocolos de tratamento mostraram eritema evidente e edema após 24 horas da exposição à irradiação de 2 DEM (187,74 mJ cm⁻²) e, após 48 horas, além de eritema, também apresentaram leve descamação. Os animais tratados com a formulação adicionada de EPA em ambos protocolos de tratamento, mostraram diminuição do eritema e não apresentaram edema após 24 horas da

exposição à irradiação. Após 48 horas da irradiação, os animais do protocolo de tratamento 1 tratados com a formulação adicionada do EPA somente antes da irradiação apresentaram eritema e descamação. Assim, os resultados observados neste protocolo, sugerem que este tratamento foi efetivo apenas na inibição do edema, e teve pouco sucesso na diminuição das outras alterações de pele (eritema e descamação).

Por outro lado, no mesmo período, os animais do protocolo de tratamento 2 tratados com a formulação adicionada do EPA antes e após a irradiação mostraram uma importante diminuição no eritema e principalmente apresentaram grande descamação. Estes resultados sugerem que este tratamento poderia estar inibindo o processo inflamatório por inibir o edema e diminuir o eritema e, além disso, poderia estar acelerando a renovação celular, pois a grande descamação deve estar relacionada à maior cicatrização da área lesionada pela radiação UVB. Esta maior renovação celular ainda pôde ser observada com a contínua avaliação dos animais deste protocolo de tratamento. Após 120 horas da exposição à radiação, foi observado que os animais tratados com a formulação adicionada de EPA não apresentavam nenhuma alteração visual na pele, mas os animais do grupo controle e do grupo tratado com a formulação sem EPA apresentaram sinais de queimadura solar causado pela exposição UV.

Apesar dos poucos estudos encontrados na literatura avaliando formulações tópicas adicionadas de extrato de própolis, os resultados observados neste estudo estão de acordo com Gregory et al. (2002), que reportaram que uma formulação tópica adicionada com própolis melhorou a cicatrização e diminuiu a inflamação em pequenas queimaduras humanas. Além disso, também tem sido demonstrado que a aplicação tópica de pomadas contendo extrato de própolis é efetiva em inibir edema de pata de ratos induzido por carragenina e seu efeito anti-inflamatório está relacionado com a inibição da quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares humanos (NAITO et al., 2007).

A formação do eritema também foi avaliada com o equipamento Chromameter, que é um equipamento capaz de medir a coloração avermelhada na pele pela avaliação do valor “a”. O número obtido pela diferença do valor “a” entre a pele irradiada e a não irradiada determinou o eritema, sendo que quanto menor este número, menor o eritema. Como pode ser observado nas Figuras 39 e 40, a diferença dos valores de “a” determinados nas áreas expostas ou não à irradiação UVB, mostram que há uma diferença menor nos animais tratados com a formulação adicionada de EPA em ambos protocolos de tratamento após 24 e 48 horas da exposição à irradiação UVB, ou seja estes animais apresentam menor eritema. Porém, só foi observado uma diferença significativa na diferença do valor de “a”, após 48 horas de exposição, para os animais do protocolo de tratamento 2.

Figura 39 – Diferença no valor de “a” calculado após 24 e 48 horas da exposição à radiação UVB para os animais do protocolo de tratamento 1. C: Controle; F2 B: Formulação 2 base (sem extrato); F2 EPA: Formulação 2 com extrato.

Figura 40 – Diferença no valor de “a” calculado após 24 e 48 horas da exposição à radiação UVB para os animais do protocolo de tratamento 2. C: Controle; F2 B: Formulação 2 base (sem extrato); F2 EPA: Formulação 2 com extrato. (*) Diferença significativa, para $p < 0,05$ – One Way Anova.

Ao compararmos os dois protocolos de tratamento, foi possível observar que para maior efetividade do antioxidante, há a necessidade da realização do tratamento com a F2 contendo extrato de própolis não só antes como também depois da exposição à irradiação UVB. Estes resultados estão de acordo com o encontrado na literatura para outros antioxidantes como tocoferol, SOD e glutathiona, que mostraram ser incapazes de proteger a pele contra o eritema quando foram aplicados topicamente antes da exposição à irradiação UVB. Provavelmente, estes resultados podem estar relacionados a uma rápida depleção dos compostos naturais dentro da pele, causado pela irradiação UVB, ou também por um rápido metabolismo dentro da epiderme viável ou pela reabsorção pela microcirculação na derme (BONINA et al., 1998).

Portanto, apesar dos tratamentos propostos com a formulação adicionada do EPA não serem capazes de evitar completamente todas alterações que a exposição à radiação UVB causam na pele de camundongos sem pêlo, pode ser sugerido que a formulação adicionada do EPA apresenta boas perspectivas para ser efetiva na diminuição dos prejuízos na pele

causados pela radiação UVB, pois foram capazes de diminuir o eritema, evitar o edema e acelerar a cicatrização (somente protocolo de tratamento 2). Desta forma, estes resultados sugerem que mais estudos nesta área merecem ser realizados para o completo entendimento do efeito do extrato de própolis na prevenção e/ou tratamento de doenças da pele causadas pela radiação UVB.

4.5.4 Avaliação da inibição da depleção dos níveis de GSH pela formulação adicionada de extrato de própolis

4.5.4.1 Determinação da dose de irradiação para depleção dos níveis de GSH

Como descrito na literatura (CASAGRANDE et al., 2006b), a dose de irradiação UVB de cerca de $2,538 \text{ J cm}^{-2}$ é a dose submáxima capaz de reduzir os níveis intracelulares de GSH na pele de camundongos de forma significativa. Esta dose foi então novamente avaliada e os resultados podem ser observados na Figura 41. Pode ser observado que com esta dose de irradiação, há uma diminuição de aproximadamente 37% da concentração de GSH nas amostras de pele do grupo irradiado comparado ao grupo controle. Desta forma, a dose proposta de $2,538 \text{ J cm}^{-2}$ foi adequada para a realização dos estudos posteriores.

Figura 41 – Concentração de GSH observado nos grupos controle e irradiado com uma dose de $2,538 \text{ J cm}^{-2}$. (*) Diferença significativa, para $p < 0,05$ – t-test. (n = 3).

4.5.4.2 Avaliação da inibição da depleção do GSH

No sistema de fotoproteção cutânea, a disponibilidade de quantidades suficientes de GSH reduzido é absolutamente essencial. GSH é um componente não enzimático do sistema de defesa antioxidante endógeno conjuntamente com ácido ascórbico e ubiquinona 9. GSH é um tripeptídeo consistindo de ácido γ -glutâmico, cisteína e glicina e é o mais prevalente antioxidante na maioria dos tecidos, incluindo a pele. Este antioxidante pode atuar como um sequestrador direto de radicais livres, sendo assim, seu principal efeito protetor contra a radiação UVB. O GSH quebra radicais pela doação de átomos de hidrogênio e o resultante radical, que é muito menos reativo decai biomolecularmente formando GSSH. Além disso, o GSH também pode atuar como um doador de hidrogênio para vários outros antioxidantes endógenos, como o ascorbato (AFAQ; MUKHTAR, 2001).

Com a exposição à irradiação UVB, o conteúdo de GSH é significativamente reduzido induzindo um aumento nos níveis de EROS (ASHRAF; GALADARI; PATEL, 2006; HO et al., 2005). Assim, tem sido demonstrado que a depleção de GSH pode predominantemente levar à morte celular devido ao acúmulo de EROS em fibroblastos de pele humana irradiados com UVB, pois o GSH é o principal sistema antioxidante nas células (HO et al., 2005). No entanto, estudos evidenciam que a Vitamina C, cafeína, quercetina, e outros compostos fenólicos atuam como protetores da depleção de GSH induzida pela radiação UV (CASAGRANDE et al. 2006b; HO et al., 2005)

Com base nestas evidências, foi detectado que a dose $2,538 \text{ J cm}^{-2}$, como mostrado acima, é capaz de levar a depleção dos níveis GSH na pele de camundongos, comparado com o grupo não irradiado. Na Figura 42 pode ser observado a curva padrão de GSH na concentração de 0-40 μM , que foi utilizada para determinação dos níveis de GSH na pele dos animais.

Figura 42 – Curva Padrão do GSH utilizando como reagente de derivação o OPT. A fluorescência foi determinada em 350 e 420 nm, para excitação/emissão.

O tratamento tópico dos animais expostos à radiação UVB com a F2 adicionada de EPA 2,5% pode ser observado na Figura 43. Nos grupos 1 e 4 (C = Controle) onde não houve tratamento, percebemos a diminuição dos níveis de GSH no grupo de animais irradiados. Com relação aos animais irradiados, foi observado que o tratamento com a F2 B (F2 base, ou seja, sem extrato), não mostrou diferença significativa na redução dos níveis de GSH comparado ao grupo Controle. No entanto, podemos perceber que o tratamento dos animais com a F2 adicionada de EPA 2,5% protegeu significativamente a depleção de GSH, comparando com os animais irradiados, mas sem tratamento. Também foi observado que os níveis de GSH do grupo de animais tratados com F2 EPA e irradiados foi até mesmo maior do que os níveis de GSH dos animais sem irradiar, o que é difícil ser explicado. Desta forma, estes estudos merecem ser realizados posteriormente com um número maior de animais para serem mais bem entendidos.

Figura 43 – Concentração dos níveis de GSH encontrado nos grupos de animais sem irradiar e irradiados tratados ou não com F2 adicionada de extrato de própolis 2,5%. C: Controle (sem formulação); F2 B: Formulação 2 base (sem extrato); F2 EPA: Formulação 2 com extrato.; (n = 3).

Há pelo menos três mecanismos envolvidos na depleção dos antioxidantes pela radiação UV, que podem explicar a ação fotoquimioprotetora dos antioxidantes aplicados topicamente: (i) absorção direta da luz; (ii) interação com EROS gerados por moléculas fotosensibilizadas pela radiação UV, e (iii) reciclagem de antioxidantes, onde um antioxidante é consumido pela reciclagem de outro (SHINDO et al., 1994). Baseado nestas evidências foi avaliado a capacidade da formulação adicionada de EPA em agir como um fotoprotetor, pela determinação do fator de proteção solar (FPS) *in vitro* (MANSUR et al., 1986). O FPS desta formulação em estudo foi inferior a 0,5, indicando que a ação antioxidante da formulação deve estar relacionada à sua capacidade de sequestrar EROS, além de reciclar outros antioxidantes endógenos como o GSH, o que poderia explicar os altos níveis de GSH nos animais tratados com F2 EPA.

Foram realizados também estudos onde se aplicou uma solução de propilenoglicol com EPA 2,5% (v/p) nos animais, porém este tratamento não preveniu a depleção do GSH induzido pela irradiação UVB de forma significativa. Este tratamento foi capaz de recuperar

cerca de 20% os níveis de GSH após a exposição à irradiação UVB, sugerindo que a utilização da solução com propilenoglicol não possibilitou a passagem efetiva dos componentes antioxidantes do extrato de própolis para a epiderme e derme dos animais. Para avaliar esta hipótese, foi realizado um estudo de permeação cutânea, onde esta solução de propilenoglicol proposta foi avaliada. Os resultados mostraram que esta solução não foi capaz de promover a permeação/retenção cutânea dos componentes antioxidantes presentes no extrato de própolis, indicando que o veículo utilizado na aplicação tópica influencia diretamente na eficácia de substâncias fotoquimioprotetoras, tais como o extrato de própolis. Esta influência do veículo também foi verificada para a eficácia fotoquimioprotetora da quercetina. Casagrande e colaboradores (2006b) demonstraram que formulações tópicas adicionadas de quercetina que possuíam maior conteúdo graxo apresentaram maior ação inibidora da depleção de GSH UV-induzido do que formulações com menor conteúdo graxo.

Os resultados observados nestes estudos preliminares da ação fotoquimioprotetora do extrato de própolis devem ser levados em consideração em futuras pesquisas para comprovar a eficácia e a segurança deste promissor extrato natural, que poderá ter importantes aplicações terapêuticas em certas doenças de pele causadas, iniciadas ou exacerbadas pela irradiação UV. Assim, novos estudos com número maior de animais, com formulações com composição diferenciada e contendo promotores de absorção merecem ser realizados em um futuro próximo.

5. Conclusões

Após a avaliação cuidadosa dos resultados obtidos durante o período de estudo, as conclusões foram:

5.1 – Os extratos de própolis alcoólico e glicólico apresentaram teor de polifenóis e flavonóides de acordo com as normas da Legislação Brasileira (BRASIL - Instrução Normativa nº3, 2001);

5.2 – O EPA e EPG demonstraram atividade antioxidante inibindo a peroxidação lipídica, a degradação da deoxirribose, a quimioluminescência gerada no sistema H_2O_2 /luminol/HRP e em maior extensão inibindo a quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD, apresentando neste método valores de IC_{50} 0,006 e 0,007 $\mu L mL^{-1}$, para EPA e EPG, respectivamente;

5.3 – Dentre as formulações desenvolvidas e submetidas à um estudo prévio de estabilidade física, as formulações preparadas com Hostacerin® SAF (F1) e Polawax® (F2) se apresentaram estáveis por 30 dias e foram selecionadas para serem avaliadas em estudo de estabilidade acelerada e de longa duração;

5.4 – No período de estudo (1 ano) da estabilidade acelerada e de longa duração das formulações, foi observado que somente a F2 apresentou estabilidade quanto às características organolépticas, ao teste de centrifugação, ao valor do pH (apesar da formulação precisar de um tempo para estabilização do pH) quando armazenadas à TA. Quanto à homogeneidade das gotículas e quanto à estabilidade funcional, estas formulações permaneceram estáveis tanto em temperatura ambiente quanto a $40^{\circ}C \pm 2^{\circ}C/70\% UR \pm 5\% UR$;

5.5 – O método de determinação do ácido *p*-cumárico por CLAE foi adequado para avaliar os estudos de liberação das formulações adicionadas de extrato de própolis, apresentando resultados de validação dentro de normas estabelecidas (ANVISA, 2003; EUA – FDA, 2001);

5.6 – O método de quantificação da atividade antioxidante na solução receptora se apresentou adequada para avaliar os estudos de liberação, permeação e retenção cutânea das formulações

adicionadas de extrato de própolis apresentando os resultados da validação dentro de normas estabelecidas (ANVISA, 2003; EUA – FDA, 2001);

5.7 – Os estudos de liberação *in vitro* das formulações adicionadas de extrato de própolis alcoólico demonstraram que o ácido *p*-cumárico e EEP (equivalentes ao extrato de própolis) foram liberados segundo o modelo de Higuchi, sendo que a formulação com menor conteúdo graxo (F1 - Hostacerin[®] SAF) foi capaz de liberar quantidades maiores de EEP e principalmente do ácido *p*-cumárico, comparada à formulação com Polawax[®] (F2);

5.8 – No estudo de permeação e retenção cutânea *in vitro* em pele de camundongo, não foi observado diferença estatística na permeação e retenção cutânea de EEP entre as formulações;

5.9 – No estudo de permeação e retenção cutânea na pele de porco, foi observado que a F2 permitiu uma maior retenção cutânea (significativamente diferente, com $p < 0,05$) de EEP que a F1, porém sem diferença significativa para a permeação cutânea. A melhor retenção causada pela F2 pode estar relacionada à desestruturação da camada córnea pelos seus componentes;

5.10 – Os estudos preliminares de eficácia *in vivo* demonstraram que formulações contendo EPA aplicadas antes e após a exposição à irradiação UVB levaram à diminuição do eritema e inibição do edema, além de também ter aumentado a cicatrização da região lesionada de camundongos sem pêlo, sugerindo sua ação antiinflamatória;

5.11 –A aplicação tópica do extrato de própolis também pode ser efetiva na inibição da depleção do GSH pela irradiação UVB;

5.12 – Mais estudos relacionados à eficácia do extrato de própolis merecem ser realizados para o completo entendimento do seu efeito na prevenção e/ou tratamento de doenças da pele causadas pela radiação UVB.

6. Referências Bibliográficas

ADDICKS, W.J., FLYNN, G.L., WEINER, N.D., CURL, R.L. Drug delivery from topical formulations: theoretical prediction and experimental assessment. In: OSBORNE, D.W., AMAMNN, A.H. **Topical Drug Delivery Formulations**, Marcel Dekker, New York, 1990, p.213-220.

AFAQ, F., MUKHTAR, H. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoageing. **Experimental dermatology**, Oxon, v.15, p.678-684, 2006.

AFAQ, F., ADHAMI, V.M., MUKHTAR, H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v.571, p.153-173, 2005.

AFAQ, F, MUKHTAR, H. Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v.63, p.61-69, 2001.

ARUOMA, O.I. Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and disease. **Journal of American Oil Chemistry Society**, Champaign, v. 75, p 199-211, 1998.

ARUOMA, O.I. Deoxyribose Assay for Detecting Hydroxyl Radicals. **Methods in Enzymology**, New York, v.233, p.57-66, 1994.

ASHRAF; S., GALADARI; S., PATEL, M. Protein S-thiolation and depletion of intracellular glutathione in skin fibroblasts exposed to various sources of oxidative stress. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v.22, p. 75-79, 2006.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**, Porto Alegre, Artmed, 2005, 678p.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in própolis research. **Evidence based Complementary and Alternative Medicine –eCAM**, Oxford, v.2, p.29-32, 2005.

BANKOVA, V.; MARCUCCI, M.C. Standardization of propolis: present status and perspectives. **Bee World**, Cardiff, v.81, p.182-188, 2000.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy Research**, W. Sussex, v.15, p.561-571, 2001.

BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACHOVÁ, Z.; FERENCIK, M. Chemistry, Physiology and Pathology of free radicals. **Life Sciences**, Oxford, v.65, p.1865-1874, 1999.

BERRETA, A. A. **Desenvolvimento e avaliação de uma forma farmacêutica de liberação sustentada contendo extrato padronizado de própolis para o tratamento de queimaduras**. 2003. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

BLACK, H. Potential involvement of free radical reactions in ultraviolet light mediate cutaneous damage. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v.46, p.213-221, 1987.

BONINA, F.P.; SAIJA, A.; TOMAINO, A.; LOCASCIO, R.; RAPISARDA, P.; DEDEREN J.C. *In vitro* antioxidant activity and *in vivo* photoprotective effect of a red orange extract. **International Journal of Cosmetic Science**, London, v.20, p.331-342, 1998.

BONINA, F.; LANZA, M.; MONTENEGRO, L.; PUGLISI, C.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SAIJA, A. Flavonoids as potencial protective agents against photo-oxidative skin damage. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.145, p.87-94, 1996.

BRASIL – AGÊNCIA NACIONAL DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA - **Guia para realização de estudos de estabilidade, RE nº1, de 29 de Julho de 2005**. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis>. Acesso em 31 de Março de 2006.

BRASIL – AGÊNCIA NACIONAL DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA - **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**, 2004. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis>. Acesso em 31 de Março de 2006.

BRASIL – AGÊNCIA NACIONAL DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA – **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos - Resolução – R.E. nº899, de 29 de Maio de 2003**. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03.htm. Acesso em 10 de Novembro de 2004.

BRASIL – **Instrução Normativa nº 3 de 19 de Janeiro de 2001**, Brasil – obtida na página da Internet: <http://www.conapis.com.br/legislacao.htm>. Acesso em 20 de Junho de 2005.

BRONAUGH, R.L., HOOD, H.L., KRAELING, M.E.K., YOURICK, J.J. Determination of percutaneous absorption by in vitro techniques. In: BRONAUGH, R.L., MAIBACH, H.I. **Percutaneous absorption – Drugs, Cosmetics, Mechanisms and Methodology**, 3rd. ed., Marcel Dekker, New York, 1999, p.229-234.

BRONAUGH, R.L., COLLIER, S.W. In vitro methods for measuring skin permeation. In: ZATZ, J.L. **Skin Permeation – Fundamentals and Application**, Allured Publishing Corporation, Wheaton, 1993, p.93-111.

BUDIC-LETO, I., LOVRIC, T. Identification of phenolic acids and changes in their content during fermentation and ageing of white wines Posip and Rukatac. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v.40, p.221-225, 2002.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal Lipid Peroxidation. **Methods in Enzymology**. New York, v. 52c, p.302-310, 1978.

BURATTI, S. BENEDETTI, S., COSIO, M.S. Evaluation of the antioxidant power of honey, propolis and royal jelly by amperometric flow injection analysis. **Talanta**, Amsterdam, v.71, p.1387-1392, 2007.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.38, p.347-363, 1998.

BURKITT, H.G., YOUNG, B., HEATH, J.W. **Pele** In: **Wheater – Histologia Funcional**. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.153-169, 1994.

CAIN, K.; SKILLETER, D.N. Preparation and Use of Mitochondria in Toxicological research. **Journal of Biochemical Toxicology**, Deerfield Beach, v.243, p. 217-254, 1987.

CARINI, M.; ALDINI, G.; PICCONE, M.; FACINO, R.M. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. **Il Farmaco**, Pavia, v.55, p.526-534, 2000.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; VERRI Jr., W.A., JABOR, J.R.; SANTOS, A.C.; FONSECA, M.J.V. Evaluation of functional Stability of Quercetin as a Raw Material and in Different Topical Formulations by its antilipoperoxidative activity. **AAPS PharmSciTech**, Virgínia, v.7, p.E1-E8, 2006a.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; VERRI Jr, W.A.; DORTA, D.J.; dos SANTOS, A.C.; FONSECA, M.J.V. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology b: Biology**, Lausanne, v.84, p.21-27, 2006b.

CASAGRANDE, R. . **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo quercetina: controle físico-químico e avaliação da eficácia in vivo**. 2005. 229 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

CASTALDO, S., CAPASSO, F. Própolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, Amsterdam, v.73 Suppl. 1, p.S1-S6, 2002.

CAUSON R. Validation of Chromatographic Methods in Biomedical Analysis – Viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 689, p. 175-180, 1997.

CHANG, C.C., YANG, M.H., WEN, H.M., CHERN, J.C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, Taipei, v.10, p. 178-182, 2002.

CHARRO, M.B.D. Sistemas dispersos heterogêneos. In: JATO, J.L.V. **Tecnologia Farmacêutica: Aspectos fundamentais de los sistemas farmacêuticos y operaciones básicas**. v. 1, Editorial Síntesis S.A., Madrid, 1997, p. 207-316.

CHOI, Y.M.; NOH, D.O.; CHO, S.Y.; SUH, H.J.; KIM, K.M.; KIM, J.M.; Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. **LWT-Food Science and Technology**, Switzerland, v.39, p.756-761, 2006.

CIOCA G. CALVO, L. Liquid crystals and cosmetics applications. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v.105, n.5, p.57-62, 1990.

COS, P.; YING, L.; CALOMME, M.; HU, J.P.; CIMANGA, K.; POEL, B.V.; PICTERS, L.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V. Structure Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers. **Journal of Natural Products**, Washington, v.61, p.71-76, 1998.

CSÓKA, I., CSÁNYI, E., ZAPANTIS, G., NAGY, E., FEHÉR-KISS, A., HORVÁTH, G., BLAZSÓ, G., ERÖS, I. In vitro and in vivo percutaneous absorption of topical dosage forms: case studies. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam v.291, p.11-19, 2005.

DARR, D.; FRIDOVICH, I. Free radicals in cutaneous biology. **Journal of Investigative Dermatology**, New York, v.102, p.671-675, 1994.

DI MAMBRO, V.M. **Desenvolvimento de formulações tópicas com associações de antioxidantes: avaliação da estabilidade física, antioxidante das formulações, permeação cutânea *in vitro* e eficácia *in vivo***. 2005. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005a.

DI MAMBRO, V.M., FONSECA, M.J.V. Assays of physical stability and antioxidant activity of topical formulations added with different plant extract. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v.37, p.287-295, 2005b.

DI MAMBRO, V.M., FONSECA, M.J.V. Assessment of physical and antioxidant activity stability, in vitro release and in vivo efficacy of formulations added with superoxide dismutase alone or in association with α -tocopherol. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, *in press*, 2007.

D'LEÓN, L.F.P. Estudo de Estabilidade de Produtos Cosméticos, **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v. 13, p.54-64, 2001.

ECCLESTON, G.M. Functions of mixed emulsifiers and emulsifying waxes in dermatological lotions and creams. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, Amsterdam, v.123-124, p.169-182, 1997.

ELMETS, C.A., SINGH, D., TUBESING, K., MATSUI, M., KATIYAR, S., MUKHTAR, H. Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. **Journal of the American Academy of Dermatology**, New York, v.44, p.425-432, 2001.

EUA – FDA, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). **Guidance for industry. bioanalytical method validation**, 2001. Disponível em: www.fda.gov/cder/guidance/index.htm. Acesso em: 1 junho de 2004.

FERNÁNDEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.A. Thiobarbituric Acid Test for Monitoring Lipid Oxidation in Meat. **Food Chemistry**, Oxon, v.59, p.345-353, 1997.

FISCHER, G., CLEFF, M.B., DUMMER, L.A. et al. Adjuvant effect of green propolis o humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.116, p.79-84, 2007.

FLINDT-HANSEN, H.; Mc FADDEN, N.; EEG-LARSEN, T.; THUNE, P. Effect of a new narrow-band UVB lamp on photocarcinogenesis in mice. **Acta Dermato-Venereologica**, Stockholm, v.71, p.245-248, 1990.

FLORENCE, A.T., ATTWOOD, D. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. Tradução Zuleika Rothschild. São Paulo, Edusp – Editora da Universidade de São Paulo, 2003, 732p.

FONSECA, Y.M., **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato de própolis verde : estudos de estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea**. 2007. 156 p. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

FUCHS, J. Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR- α -tocopherol, L-ascorbic acid and β -carotene in cutaneous photoprotection. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York, v.25, p. 848-873, 1998.

FUNARI, C.S., FERRO, V.O., MATHOR, M.B. Analysis of própolis from *baccharis dracunculifolia* DC (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, *in press*, 2007.

GEORGETTI, S.R. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo isoflavonóides (Isoflavin Beta®): estabilidade física, química e permeação cutânea**. 2004. 156 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

GEORGETTI, S.R., CASAGRANDE, R., DI MAMBRO, V.M. AZZOLINI, A.E.S.S., FONSECA, M.J.V. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescent method. **AAPS PharmSci**, Virgínia, v.5, p.210-214, 2003, article 20 – <http://www.pharmsci.org>.

GETIE, M., GEBRE-MARIAM, T., RIETZ, R., NEUBERT, R.H.H. Evaluation of the release profiles of flavonoids from topical formulations of the crude extract of the leaves of *Dodonea viscosa* (Sapindaceae), **Pharmazie**, Berlin, v.57, p.320-322, 2002.

GIROTTI, S.; FINI, F.; FERRI, E.; BUDINI, R.; PIAZZI, S.; CANTAGALLI, D. Determination of Superoxide Dismutase in Erythrocytes by a Chemiluminescent assay. **Talanta**, London, v.51, p.685-692, 2000.

GOGOLEVA, T.E., ADEMOLA, J.I., WESTER, R.C., MAGEE, T.E., MAIBACH, H.I. Relative contributions of huma skin layers to partitioning of chemichals with varying lypophilicity. In: BRONAUGH, R.L., MAIBACH, H.I **Percutaneous absorption – Drugs, Cosmetics, Mechanisms and Methodology**, 3rd ed., Marcel Dekker, New York, 1999, p.451-462.

GORNAL, L.A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction. **Journal of Biological Chemistry**. Baltimore, v. 177, p. 751-766, 1949.

GREGORY, S.R.; PICCOLO, N.; PICCOLO, M.T.; HEGGERS, J.P. Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: A naturopatic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, New York, v.8, p.77-83, 2002.

GRIMM, W. Extention of the international conference on harmonization tripartite guideline for stability testing of new drug substances and products to countries of climatic zones III and IV. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, Philadelphia, v.24, p.313-325, 1998.

GRUIJL, F.R. Skin cancer and solar UV radiation. **European Journal of Cancer**, Oxon, v.35, p.2003-2009, 1999.

GRUNBERGER, D., BANERJEE, R., EISINGER, K. et al. Preferential citotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. **Experientia**, Basel, v.44, p.230-232, 1988.

HADGRAFT, J. Skin deep. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 58, p.291-299, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, New York: Pergamon Press, 3rded., 1999, 936p.

HALLIWELL, B.; AESHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O.I. The carактерization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, London, v.33, p.601-617, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease: An Overview. **Methods in Enzymology**, New York, v.186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C.; ARUOMA, O.I. The deoxyribose method: A simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. **Analytical Biochemistry**, New York, v.165, p.215-219, 1987.

HECK, D.E., GEREEKE, D.R., VETRANO, A.M., LASKIN, J.D. Solar ultraviolet radiation as a trigger of cell signal transduction. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v.195, p.288-297, 2004.

HIGUCHI, W.I. Analysis of data on the medicament release from ointments. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Hoboken, v.51, p.802-804, 1962.

HISSIN, P.J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, New York, v.74, p.214-226, 1976.

HO, J.N., LEE, Y.H., PARK, J.S., JUN, W.J., KIM, H.K., HONG, B.S., SHIN, D.H., CHO, H.Y. PROTECTIVE EFFECTS OF Aucubin isolated from *Eucommia ulmoides* against UVB-induced oxidative stress in human skin fibroblasts. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.28, p.1244-1248, 2005.

HOLLMAN, P.C.H.; de VRIES, J.H.M.; van LEEUWEN, S.D.; MENGELERS, M.J.B.; KATAN, M.B. The absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 62, p. 1276-1282, 1995.

IDSON, B., LAZARUS, J. Semi-Sólidos. In: LACHMAN, L., LIEBERMAN, H.A., KANING, J.L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2001, p. 907-953.

INAL, M.E.; KAHRAMAN, The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet induced oxidative stress in rats. **Toxicology**, Amsterdam, v. 154, p. 21-29, 2000.

KOHEN, R. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress, -new approaches for their evaluation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v.53, p.181-192, 1999.

KROL, W.; CZUBA, Z.; SCHELLER, S.; PARADOWSKI, Z.; SHANI, J. Structure-activity Relationship in the Ability of Flavonols to Inhibit Chemiluminescence. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 41, p.121-126, 1994.

KUMAZAWA, S., HAMASAKA, T., NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, Oxon, v.84, p.329-339, 2004.

LARRUCEA, E., ARELLANO, A., SANTOYO, S., YGARTUA, P., Combined effect of oleic acid and propylene glycol on the percutaneous penetration of tenoxicam and its retention in the skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v.52, p.113-119, 2001.

LATREILLE, B., PAQUIN, P. Evaluation of emulsion stability by centrifugation with conductivity measurements. **Journal of Food Science**, Oxon, v. 55, p.1666-1668, 1990.

LEMÁNSKA, K.; SZYMUSIAK, H.; TYRAKOWSKA, B.; ZIELINSKI, R.; SOFFERS, A.E.M.F.; RIETJENS, I.M.C.M. The Influence of pH on Antioxidant and the Mechanism of Antioxidant Action of Hydroxyflavones. **Free Radicals in Biology and Medicine**, New York, v.31, p.869-881, 2001.

LEONARDI, G.R., GASPAR, L.R., MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Estudo da variação o pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v.77, p.1-8, 2002.

LIN, J.Y, SELIM, M.A.; SHEA, C.R.; GRICHNIK, J.M.; OMAR, M.M.; MONTEIRO-RIVIERE, N.A., PINNEL, S.R. Uv photoprotection by combination topical antioxidant vitamin C and vitamin E. **Journal of the American Academy of Dermatology**, New York, v.48, p.866-874, 2003.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Bases dermocosméticas. **Revista de Cosmiatria & Medicina Estética**, São Paulo, v.2, n.2, p.32-35, 1994.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; BRADA, M.V.L. Estudo da Estabilidade física de bases dermocosméticas contendo ésteres fosfóricos. **Aerosol & Cosméticos**, São Paulo. v.14, n.79, p.8-11, 1992.

MANSUR, J.S., BREDER, M.N.R., MANSUR, M.C.d'A, AZULAY, R.D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v.61, p.121-124, 1986.

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

MENON, G.K. New insights into skin structure:scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v.54, supl.1, p.S3-S17, 2002.

MISRA, H.P.; SQUATRITO, P.M. The role of Superoxide Anion in Peroxidase-Catalysed Chemiluminescence of Luminol. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 215, p.59-65, 1982.

MONTENEGRO, L.; BONINA, F.; RIGANO, L.; GIOGILLI, S.; SIRIGU, S. Protective effect evaluation of free radical scavengers on UVB induced human cutaneous erythema by skin reflectance spectrophotometry. **International Journal of Cosmetic Science**, London, v.17, p.91-103, 1995.

MOON, H., LEE, J., ZEE, O.P., CHUNG, J.H. The effect of flavonol glycoside on the expression of metalloproteinase-1 in ultraviolet-irradiated culture human skin fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v.101, p.176-179, 2005.

MUIZZUDIN, N.; MARENUS, K.; MAES, D.; SMITH, W.P. Use of chromameter in assessing the efficacy of anti-irritants and tanning accelerators. **Journal of the Society of Cosmetic Chemistry**, New York, v.41, p.369-378, 1990.

MYATAKA, H., NISHIKI, M., MATSUMOTO, H., FUGIMOTO, T., MATSUKA, M., SATOH, T. Evaluation of Propolis. I. Evaluation of Brazilian and Chinese Propolis by Enzymatic and Physico-Chemical Methods. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 20, p.496-501, 1997.

NAGAI, T.; INOVE, R.; INOVE, H.; SUZUKI, N. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, Oxon, v.80, p.19-33, 2003.

NAITO, Y., UASUMURO, M., KONDOU, K., OHARA, N. Antiinflammatory effect of topically applied propolis extract in carrageenan-induced rat hind paw edema. **Phytotherapy Research**, W. Sussex, *in press*, 2007.

NAKAJIMA, Y., SHIMAZAWA, M., MISHIMA, S., HARA, H. Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects *via* antioxidant actions. **Life Sciences**, Oxford, v.80, p.370-377, 2007.

OZGOVÁ, S.; HERMÁNEK, J.; GUT, I. Different antioxidant effects of polyphenols on lipid peroxidation and hydroxyl radicals in the NADPH-, Fe-ascorbate- and Fe-microsomal systems, **Biochemical Pharmacology**, London, v. 66, p1127-1137, 2003.

PAGLIARA, A., REIST, M., GEINOZ, S., CARRUPT, P.A., TESTA, B. Evaluation and prediction of drug permeation, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. London, v.51, p.1339-1357, 1999.

PAREJO, I., CODINA, C., PETRAKIS, C. KEFALAS, P. Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH free radical assay, **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, New York, v. 44, p.507-512, 2000.

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

PASCUAL, C; GONZALEZ, R.; TORRICELLA, R.G. Scavenging action of propolis extract against oxigen radicals. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v.41, p.9-13, 1994.

PASCUAL, C.; DEL CASTILHO, M.D.; ROMAY, C. A New Luminol Sensitized Chemiluminescence Method for Determination of Superoxide Dismutase. **Analytical Letters**, Philadelphia, v.25, p.837-849, 1992.

PAULINO; N., TEIXEIRA, C., MARTINS, R. et al. Evaluation of the Analgesic and Anti-inflammatory effects of a Brazilian green Própolis. **Planta Medica**, Basel, v.72, p.99-906, 2006.

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

PHARMASPECIAL, ESPECIALIDADES QUIMICAS E FARMACÊUTICAS LTDA.: www.pharmaspecial.com.br. Acesso em 15 de Maio de 2004, palavra chave: Hostacerim.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, Washington, v.63, p.1035-1042, 2000.

PINNELL, S.R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, New York, v. 48, p. 1-19, 2003.

PRINDERRE, P., PICCERELLE, P.H., CAUTURE, E., KALANTZIZ, G., REYNER, J.P., JOACHIM, J. Formulation and evaluation of O/W emulsions using experimental design. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.163, p.73-79, 1998.

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

RIEGER, M. Emulsões In: LACHMAN, L., LIEBERMAN, H.A., KANING, J.L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2001, p.855-906.

RIEGER, M.M. Teste de Estabilidade para Emulsões. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v.8, n.5, p. 47-56, 1996.

RODRIGUES, T.; SANTOS, A.C.; PIGOSO, A.A.; MINGATTO, F.E.; UYEMURA, A.S.; CURTI, C. Thioridazine interacts with the membrane of mitochondria acquiring antioxidant activity toward apoptosis – potentially implicated mechanisms. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 136, p.136-142, 2002.

RÖPKE, C.D., KANEKO, T.M., RODRIGUES, R.M., da SILVA, V.V., BARROS, S., SAWADA, T.C.H., KATO, M.J., BARROS, S.B.M. Evaluation of percutaneous absorption of 4-nerolidylcatechol from four topical formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.294, p.109-116, 2002.

ROSA, F.S. **Influência de promotor de absorção cutânea e derivados ésteres do ácido 5-aminolevulínico na terapia fotodinâmica do câncer de pele**. 2002 178 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

ROUGIER, A., DUPUIS, D., LOTTE, C. MAAIBACH, H.I. Stripping method for measuring percutaneous absorption in vivo. In: BRONAUGH, R.L., MAIBACH, H.I **Percutaneous absorption – drugs, Cosmetics, Mechanisms and Methodology**, 3rd.ed, Marcel Dekker, New York, 1999, p.375-394.

RUSSO, A., CARDILE, V., SANCHEZ, F., TRONCOSO, N., VANELLA, A., GARBARINO, J.A. Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. **Life Sciences**, Oxford, v.76, p.545-558, 2004.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; GIACCHI, M.; DE PASCALE, A.; BONINA, F.; Influence of different penetration on *in vitro* skin permeation and *in vivo* photoprotective effect of flavonoids. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.175, p.85-94, 1998.

SANTOS, A.C., UYEMURA, S.A., LOPES, J.L.; BAZON, J.N.; MINGATTO, F.E.; CURTI, C. Effect of Naturally Occurring Flavonoids on Lipid Peroxidation and Membrane Permeability Transition in Mitochondria, **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 24, p.1455-1461, 1998.

SCHUELLER, R., ROMANOWSKI, P. Understanding emulsions. **Cosmetics & Toiletries**, Oak Park, v.113, n.9, p.39-44, 1998.

SHIMIZU, K., ASHIDA, H., MATSUURA, Y., KANAZAWA, K. Antioxidant bioavailability of artemisinic acid in Brazilian propolis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.424, p.181-188, 2004.

SHINDO, Y.; WITT, E.; HAN, D.; PACKER, L. Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. **Journal of Investigative Dermatology**, New York, v. 102, p.470-475, 1994.

SINGH, S. Drug Stability Testing and Shelf-life Determination According to International Guidelines. **Pharmaceutical Technology**, Eugene, v. 23, p. 68-88, 1999.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, New York, v.299, p.152-172, 1999.

SMITH, E.W., SURBE, C., MAIBACH, H.I. Topical dermatological vehicles: a holistic approach. In: BRONAUGH, R.L., MAIBACH, H.I. **Percutaneous absorption – Drugs, Cosmetics, Mechanisms and Methodology**, 3rd. ed, Marcel Dekker, New York, 1999, p.779-788.

SOARES, S.E. Ácidos Fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.15, p.71-81, 2002.

SOUSA, M.L. **Isolamento dos constituintes de amostras de própolis e caracterização do seu perfil químico através de cromatografia líquida de alta eficiência**. 1999. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1999.

SURBER, C., SCHWARB, F. SMITH, E. Tape-stripping technique In: BRONAUGH, R.L., MAIBACH, H.I **Percutaneous absorption – Drugs, Cosmetics, Mechanisms and Methodology**, 3rd. ed, Marcel Dekker, New York, 1999, p.395-409.

TAKESHITA, K., HIROTA, N., TERAZIMA, M. Enthalpy changes and reaction volumes of photoisomerization reactions in solution:: azobenzene and p-coumaric-acid. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Lausanne, v. 134, p.103-109, 2000.

THORPE, G.H.G.; KRICKA, L.J. Enhanced Chemiluminescent Reactions Catalyzed by Horseradish Peroxidase. **Methods in Enzymology**, New York, v.133, p.331-353, 1986.

VOLPERT, R.; ELSTNER, E.F. Biochemical activities of propolis extracts II. Photodynamic Activities. **Zeitschrift fur Naturforschung Section A- Journal of Physical Sciences**, v.48c, p.858-862, 1993.

WANG, B.J.; LIEN, Y.H.; YU, Z.R. Supercritical Fluid Extractive Fractionation – Study of the Antioxidant Activities of Propolis. **Food Chemistry**, Oxon, v.86, p.237-243, 2004.

WESSELS, P.; HOLTZ, M.; ERNI, F.; KRUMMEN, K.; OGORKA, J. Sstatistical evaluation of stability data of pharmaceutical Products for specification setting. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v.23, p.427 – 439, 1997.

WESTER, C.R., MAIBACH, H.L. In vitro testing of topical pharmaceutical formulations. In: OSBORNE, D.W., AMAMNN, A.H. **Topical Drug Delivery Formulations**, Marcel Dekker, New York, 1990, p.213-220.

WOISKY, R.G. **Métodos de controle químico de amostras de própolis**. 128 f. Dissertação (Mestrado e Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

WRIGHT, T.I., SPENCER, J.M., FLOWERS, F.P. Chemoprevention on nonmelanoma skin cancer. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Saint Louis, v.54, p.933-946, 2006.

ZATZ, J. Rationale and approaches to skin permeation In: ZATZ, J.L. **Skin Permeation – Fundamentals and application**, Allured Publishing Corporation, Wheaton, 1993, p.11-31.

Anexos

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 05.1.307.53.6), intitulado: "Desenvolvimento de Formulações Tópicas Contendo Própolis, Estudo da Estabilidade e da Permeação da Atividade Antioxidante *in vitro* e a Avaliação da Ação Antioxidante *in vivo*", de autoria de **Franciane Delfin Marquele**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP, foi aprovado em reunião da CEUA de 03.08.05

Ribeirão Preto, 9 de agosto de 2005

Presidente da CEUA
Prof. Dr. José Clóvis do Prado Junior

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

F1 EPA

A

C

E

G

F1 EPG

B

D

F

H

Fotomicrografias da Formulação 1 adicionada de EPA ou EPG armazenada à temperatura ambiente. A e B: 1 dia armazenamento; C e D: 30 dias de armazenamento; E e F: 180 dias de armazenamento; G e H: 360 dias de armazenamento.

F1 EPA

A

F1 EPG

B

C

D

E

F

G

H

Fotomicrografias da Formulação 1 adicionada de EPA ou EPG armazenada à $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/70\% \text{ UR} \pm 5\% \text{UR}$ A e B: 1 dia armazenamento; C e D: 30 dias de armazenamento; E e F: 180 dias de armazenamento; G e H: 360 dias de armazenamento.

F2 EPA

A

C

E

G

F2 EPG

B

D

F

H

Fotomicrografias da Formulação 2 adicionada de EPA ou EPG armazenada à temperatura ambiente. A e B: 1 dia armazenamento; C e D: 30 dias de armazenamento; E e F: 180 dias de armazenamento; G e H: 360 dias de armazenamento.

F2 EPA

A

C

E

G

F2 EPG

B

D

F

H

Fotomicrografias da Formulação 2 adicionada de EPA ou EPG armazenada à $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/70\% \text{ UR} \pm 5\% \text{UR}$ A e B: 1 dia armazenamento; C e D: 30 dias de armazenamento; E e F: 180 dias de armazenamento; G e H: 360 dias de armazenamento.

Spray-dried propolis extract. I: Physicochemical and antioxidant properties

F. D. MARQUELE, K. M. STRACIERI, M. J. V. FONSECA, L. A. P. FREITAS

Received February 8, 2005, accepted June 13, 2005

Prof. Dr. Luis A.P. Freitas, Via do Café s/n, Ribeirão Preto, SP, 14040-903, Brazil
lapdfrei@usp.br

Pharmazie 61: 325–330 (2006)

The effect of spray drying on the chemical and biological properties of alcoholic extract of green propolis was investigated. The total polyphenol and flavonoid contents in spray-dried propolis extract were determined by the Folin-Ciocalteu and aluminum chloride colorimetric methods, respectively. The antioxidant activity of the dry extract was assessed by the membrane lipid peroxidation inhibition method, using quercetin as reference. The polyphenol content was shown to depend on the drying air outlet temperature and its square at the 0.5% significance level, while the flavonoid content depended only on the square of the outlet temperature at the 5% significance level. Polyphenol and flavonoid recovery after spray-drying ranged from 45.1 to 54.9% and 30.6 to 40.8%, respectively. The antioxidant activity of the spray-dried propolis was shown to be affected by the extract feed rate and air outlet temperature at a significance level of 0.1%. The spray-dried propolis extract showed significant antioxidant activity, with 50% lipid peroxidation inhibition at concentrations ranging from 2.5 to 5.0 µg/ml.

1. Introduction

Propolis (bee glue) is a resin collected by bees for use in and around the hive. It has been used by man since ancient times for its pharmaceutical properties and is still widely used as a remedy in folk medicine, as a constituent of "bio-cosmetics" and for numerous other purposes. Commercial interest in propolis has shown a steady increase in recent years (Bankova and Marcucci 2000).

Up to now, more than 150 compounds, mainly polyphenols, have been identified as constituents of propolis collected in different countries (Pascual et al. 1994). The composition of propolis depends on the vegetation of the area from where it was collected and on the bee species. Propolis from tropical zones, like Brazilian green propolis, consists mainly of prenylated derivatives of *p*-coumaric acid and flavonoids (Simões et al. 2004).

It has been suggested that the biological activities of propolis depend mainly on the presence of this large number of flavonoids. These are reported to have antioxidant, anti-inflammatory, anticancer and antiviral activities, as well as antimicrobial effects (Pascual et al. 1994; Moreno et al. 2000; Sforcin et al. 2000; Banskota et al. 2001; Nagai et al. 2003; Kumazawa et al. 2004).

Antioxidant activities of alcoholic and aqueous extracts of propolis from different origins have been studied extensively worldwide. Scavenging of free radicals generated in inflammatory processes was reported by Krol et al. (1996). Recently, Cuban red propolis has shown scavenging action against oxygen radicals (Pascual et al. 1994). Argentine propolis has been reported to inhibit lipid oxidation (Isla et al. 2001). Almost all propolis extracts evaluated by Banskota et al. (2000) showed scavenging activity towards DPPH free radicals to a similar extent.

Recently, there has been an increasing interest in dry extracts of natural products, including propolis. The powdered extract presents obvious advantages in pharmaceutical formulations, such as the possibility of easy preparation of tablets and capsules. Furthermore, the spray-dried propolis extract, SDPE, is expected to present better stability. Available literature indicates that no previous studies on the effect of spray-drying of propolis extract on its chemical constituents and antioxidant activity have been performed.

In this work the effect of the drying process on total polyphenol, TPC, and flavonoid content, TFC, was studied. Also, the antioxidant activity, AOA, of spray-dried propolis extract (SDPE) was assessed using the peroxidation of cellular membrane lipids method, using mitochondria as the lipid source. In this system generation of reactive oxygen species (ROS) occurs, which is increased in the presence of Fe²⁺, leading to oxidative damage to lipids. Response surface methodology, RSM, was used to evaluate the effect of drying parameters on SDPE composition and antioxidant activity.

2. Investigations, results and discussion

The full experimental design used in this study can be seen in Table 1. The results shown in this Table are averaged values of TPC, TFC and AOA, for illustrative purposes only. The response surface analysis was carried out with values of TPC and TFC in duplicate and AOA in quintuplicate. In general the powders obtained by APE spray-drying showed excellent physical aspect, uniform color, low apparent density and good flow properties. This is due to the use of colloidal silica as a drying aid.

Table 1: Experimental design and resulting TPC, TFC and AOA

EXPER. RUN	X1 W _E	X2 T	TPC (µg/mg)	TFC (µg/mg)	AOA (U/µg)
1	+1	+1	42.29	12.54	0.248
2	+1	0	40.8	11.90	0.15
3	+1	-1	43.53	13.50	0.223
4	0	+1	42.32	13.43	0.166
5	0	0	37.83	10.58	0.162
6	0	-1	46.02	14.03	0.257
7	-1	+1	43.47	12.56	0.558
8	-1	0	40.17	12.72	0.695
9	-1	-1	45.57	12.15	0.895

2.1. SDPE polyphenol and flavonoid content

The Folin-Ciocalteu method is currently used to determine total polyphenol, and in the present study, this method was used to determine the total polyphenol content of the propolis extract samples. This method is based on the oxidizability of phenols at basic pH, the Folin-Ciocalteu reagent working as an oxidant agent. Phenols are responsible for most of the antioxidant capacity in most plant-derived products, so that their determination can be very informative (Singleton et al. 1999).

The total flavonoid content was determined by the aluminum chloride colorimetric method. The principle of this method is that aluminum chloride forms acid stable complexes with the C-4 keto group and either the C-3 or C-5 hydroxyl group of flavones (chrysin, apigenin, luteolin) and flavonols (rutin, morin, quercetin, myricetin, kaempferol, quercitrin and galangin). In addition, aluminum chloride forms acid labile complexes with the ortho-dihydroxyl groups in the A or B ring of flavonoids. Quercetin was shown to be a reliable reference compound as compared to 15 other flavonoid standards investigated by Chang et al. (2002). The acid complex of quercetin, similarly to other flavonoids, has an absorption maximum at 415 nm.

For the response surface analysis of TPC and TFC the samples were analyzed in duplicate. The effect of spray-drying temperature, T (°C) and extract feed rate, W_E (ml/min), on SDPE polyphenol content is shown in Fig. 1. The response surface plot shows that extract feed rate did not affect the TPC, while the drying air outlet temperature exerted a strong non-linear effect on TPC. However, the

Fig. 1: Response surface of TPC after APE spray-drying**Table 2:** Analysis of variance on TPC data

Factor	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F _{calc}
WE	2.240	1	2.240	1.636
T	16.509	1	16.509	0.984*
WE ²	1.347	1	1.347	12.057
T ²	72.800	1	72.800	53.170*
WE × T	0.342	1	0.342	0.264
Error	16.430	12	1.369	
Total	109.687			

* Significant at 0.5%

effects of those factors on TPC can be more reliably evaluated by analysis of variance on the experimental data. The resulting analysis can be seen in Table 2.

The ANOVA confirmed the tendencies observed in Fig. 1, showing that temperature affected the TPC at a 0.5% significance level. The square of temperature affected the TPC at a 0.5% significance level, confirming the quadratic effect observed in Fig. 1. On the other hand, the extract feed rate and its square did not affect TPC to a significant level. Also, there was no interaction between the two factors studied. In this work, only factors with significance levels higher than 10% were considered. The response surface analysis permits the fitting of a polynomial equation of the dependent variable, TPC as a function of the significant factors. The fitted equation, with correlation coefficient $R^2 = 0.9221$, is given by:

$$\text{TPC} = 39.2 - 1.17 \left(\frac{T - 80}{40} \right) + 4.27 \left(\frac{T - 80}{40} \right)^2 \quad (1)$$

The effect of the spray-drying factors on the SDPE total flavonoid content, TFC, can be seen in Fig. 2. The surface plot in this Figure shows a profile similar to the one observed for the TPC (Fig. 1), e.g. the non-linear effect of temperature and the undefined effect of extract feed rate. To evaluate those effects better, an analysis of variance was carried out and the results are shown in Table 3.

The ANOVA showed that neither extract feed rate, its square, the temperature nor the interactive terms were significant. Only the square of temperature was shown to be significant at the 5% level. The response surface analysis allows for the fitting of TFC as a function of the signifi-

Fig. 2: Response surface of TFC after APE spray-drying

Table 3: Analysis of variance on TFC data

Factor	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F _{calc}
WE	0.0884	1	0.0884	0.1121
T	0.4349	1	0.4349	0.5517
WE ²	0.0554	1	0.0554	0.0703
T ²	6.7316	1	6.7316	8.5388*
WE × T	0.9428	1	0.9428	1.1959
Error	9.4602	12	0.7884	
Total	17.7133	17		

* Significant at 5%

cant factor. The fitted equation, with correlation coefficient $R^2 = 0.6826$, is given by:

$$TFC = 11.82 + 1.30 \left(\frac{T - 80}{40} \right)^2 \quad (2)$$

The value of TPC obtained for the APE on a dry basis was 0.122 µg per 1 µg of total solids, while for the SDPE the values of TPC ranged from 0.055 to 0.067 µg/µg. Given that SDPE dry matter corresponds to the sum of solids in APE plus the amount of drying adjuvant, and the values of TPC shown above were calculated on a dry basis of solids in APE, TPC recovery varied from 45.1 to 54.9%. Regarding the TFC, the APE showed a flavonoid content of 0.049 µg/µg on a dry basis, and the SDPE varied from 0.015 to 0.020 µg/µg, showing a recovery ranging from 30.6 to 40.8%. These results suggest that extreme drying conditions may lead to significant loss of components with AOA and consequently an overall loss of SDPE activity. Next, the *in vitro* AOA of APE and SDPE are assessed and discussed.

2.2. SDPE anti-oxidant activity

As regards the evaluation of the lipid peroxidation induced by Fe^{2+} /ascorbate, the initiation of the peroxidation sequence of a membrane in a free lipid peroxide system refers to the attack of any species that has sufficient reactivity to abstract a hydrogen atom from a polyunsaturated fatty acid.

As the membrane fractions (mitochondria) used in this experiment were isolated from disrupted cells, they may contain some lipid peroxides, which are formed enzymatically in tissues by cyclooxygenase and lipoxygenase enzymes. When iron salts are added, these lipid peroxides are decomposed to generate peroxy (LOO^*) and alkoxy (LO^*) radicals that can abstract hydrogen from polyunsaturated acyl chains and propagate lipid peroxidation (Halliwell and Gutteridge 1990; Dinis et al. 1994).

The break down of peroxides will produce carbonyl compounds. The 3-carbon compound malondialdehyde (MDA) is one such carbonyl, which forms a characteristic chromogenic adduct with 2 molecules of thiobarbituric acid (TBA), which is determined at 535 nm. On the basis of the inhibition of the MDA-TBA complex formed, the relative inhibitory activity of the samples was estimated at different concentrations. The percent inhibition caused by each sample was calculated as:

$$\% = 100 - 100 \frac{I_A}{I_0} \quad (3)$$

where I_0 and I_A represent the absorbancies observed for the control (antioxidant absent) and experimental samples, respectively.

Fig. 3: Quercetin calibration curve — Percentage inhibition by quercetin of lipid peroxidation using mitochondria. Results are means $\pm$ S.D. of three measurements run in parallel. (A) Inhibition caused by quercetin at final medium concentrations: 2.5 µg/mL, 1.25 µg/mL, 0.625 µg/mL, 0.312 µg/mL, 0.156 µg/mL, 0.078 µg/mL. (B) Inhibition linearity curve caused by quercetin at final medium concentrations: 1.25 µg/mL, 0.625 µg/mL, 0.312 µg/mL, 0.156 µg/mL.

Fig. 3 shows the concentration-response curves for the lipid peroxidation inhibitory effects of spray-dried propolis extracts obtained under various drying conditions, e.g., extract feed rates and outlet temperatures. SDPE and APE were evaluated at the same final concentration (2.5, 5 and 10 µg/ml). To evaluate this loss of antioxidant activity, the units of AOA were calculated for both APE and SDPE on a basis of total solids from the original propolis extract.

Percent peroxidation inhibition was measured as a function of quercetin solutions with different concentrations. The dose-response curve obtained is shown in Fig. 4A. The inhibition index, I%, increased with increasing amount of the reference flavonoid (quercetin) added to the assay mixture. The linear bands in the dose-response curves were fitted to the calibration equations by linear regression, as shown in Fig. 4B.

Samples of the SDPE and the APE were evaluated for lipid peroxidation at concentrations at which inhibition rates gave a linear response in the quercetin curve (Fig. 4B). With the aid of the calibration equations obtained from quercetin lipid peroxidation inhibition, the equivalent antioxidant (AOA) units were calculated for each propolis extract sample when its inhibition of lipid peroxidation was about 50%. The AOA units for APE and SDPE were also calculated on a dry basis of the original APE solids content.

Fig. 5 presents the effect of drying factors on the SDPE antioxidant activity, AOA. The surface plot in Fig. 5 indicates that the extract feed rate affects the AOA while it

Fig. 4: Percentage inhibition by spray-dried propolis extracts of lipid peroxidation using mitochondria. Results are means $\pm$ S.D. of nine measurements run on different days. (A) Inhibition caused by spray-dried propolis extract produced with a feed rate of 3 mL/min at final medium concentrations: 2.5 μ g/mL, 5 μ g/mL and 10 μ g/mL. (B) Inhibition caused by spray-dried propolis extract produced with a feed rate of 2 mL/min at final medium concentrations: 2.5 μ g/mL, 5 μ g/mL and 10 μ g/mL. (C) Inhibition caused by spray-dried propolis extract produced with a feed rate of 1 mL/min at final medium concentrations: 2.5 μ g/mL, 5 μ g/mL and 10 μ g/mL.

seems that temperature is not important for SDPE activity. To support those observations, the data were submitted to variance analysis. The resulting analysis is shown in Table 4 and shows that both temperature and extract feed rate affect AOA at the 0.1% significance level. The effects of the square of both factors and their interaction are not significant. The AOA data were put into an equation, taking into account only the significant terms. The resulting equation, with correlation coefficient $R^2 = 0.9240$, is given by:

$$AOA = 119.84 - 10.17(W_E - 2) - 3.30\left(\frac{T - 80}{40}\right) \quad (4)$$

The APE showed lipid peroxidation inhibition of 47.5% at a final concentration of 2.5 μ g/mL, while some SDPE varied from about 43 to 58% at 5 μ g/mL and others from about 48 to 63% at 2.5 μ g/mL. This comparison of activity

Fig. 5: Response surface of AOA after APE spray-drying

Table 4: Analysis of variance on AOA data

Factor	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F _{calc}
WE	3100.8	1	3100.8	203.638*
T	307.2	1	307.2	20.173*
WE ²	5.9	1	5.9	0.386
T ²	27.8	1	27.8	1.824
WE $\times$ T	24.2	1	24.2	1.589
Error	593.9	39	15.2	
Total	4059.8	44		

* Significant at 0.1%

becomes clearer when the percentages of lipid peroxidation inhibition are estimated as antioxidant units, and these antioxidant units are calculated per μ g of total solids in the original APE. The final concentration of 2.5 μ g/mL of APE in the medium of lipid peroxidation corresponds to 0.2 μ g/mL in total solids. However for SDPE this same final concentration (2.5 μ g/mL) corresponds to 1.7 μ g/mL of total solids in the lipid peroxidation medium. The AOA recovery ranged from 9 to 28%, showing that some activity is lost during the spray-drying process. Better recovery is found for SDPE submitted to spray-drying at APE feed rates of 1 mL/min.

Despite SDPE having lost some of their TPC, TFC and AOA, the dry extracts could be successfully utilized in antioxidant therapy. The SDPE, when evaluated at the final concentrations of 2.5 and 5.0 μ g/mL in the medium were able to inhibit about 50% of lipid peroxidation. These AOA values are plausible, since 50 μ g/mL of alcoholic and water propolis extracts from other areas have been evaluated by copper mediated lipid peroxidation in unfractionated serum and the inhibition observed varied from 20 to 80% (Isla et al. 2001).

Also, Banskota et al. (2000) demonstrated that alcoholic and water propolis extracts from several origins were able to scavenge the stable free radical DPPH at levels ranging from 5.9 to 94 μ g/mL. These results, together with the fact that the process can be modified to allow higher chemical and AOA recovery, suggests that despite SDPE having lost some of their activity they still present excellent antioxidant activity and this can be a valid process to obtain new pharmaceutical forms of propolis.

The chemical and antioxidant activities of spray-dried propolis extract were shown to be affected by drying conditions. The air outlet temperature was shown to affect significantly the overall polyphenol and flavonoid content and the antioxidant activity of the dry extract, with a linear or quadratic relationship. The extract feed rate significantly affected only the antioxidant activity. The recovery of polyphenols and flavonoids was significantly higher than the recovery of antioxidant activity. This may be an indication that the antioxidant activity is only partially related to the two classes of compounds observed here, and there may be other chemicals involved in its activity. It is also possible that some structural changes in flavonoids and polyphenols occurred during the drying process that caused the loss of antioxidant activity but did not interfere significantly with the determination of flavonoid and polyphenol content. Finally, the spray-dried propolis extract obtained under the conditions studied here presented a high level of lipid peroxidation inhibition and can be successfully used for biopharmaceutical purposes. The data also show the complex phenomena involved in the drying of biological materials and the resulting changes in their properties. With the increasing interest in natural products for therapeutic use, there is a need to direct efforts for better understanding of such drying/biopharmaceutical relationships.

3. Experimental

3.1. Alcoholic propolis extract (APE)

Alcoholic extract of green propolis, was purchased on the Brazilian market from Apis Flora Ltda., and originated from Oliveira, Minas Gerais. Its total solids content was 9.43% (w/v).

3.2. Spray-dried propolis extract (SDPE)

Before the drying step, APE was concentrated in a rotating evaporator to reduce its alcohol content and a drying adjuvant was added. The concentrated propolis extract, CPE, was dried in a laboratory scale spray dryer model LM MSD 1.0 (Labmaq Ltd., Brazil) under various operational conditions. The factors studied in the drying process were the drying air outlet temperature, T ($^{\circ}\text{C}$) and the extract feed rate, W_E (ml/min). The pneumatic spray nozzle was operated at an airflow rate of 40.0 l/min and a pressure of 2.0 kgf/cm². Drying airflow rate was kept constant at 0.60 m³/min. The range of drying conditions was chosen to operate outside the limits of flammability for the ethanol-air mixture (Berthold and Löffler 1993). The SDPE was collected at the dryer outlet, weighted and stored in closed flasks protected from light at 4 $^{\circ}\text{C}$.

The drying study followed a 3² full factorial design, which allows for the determination of linear, quadratic and interactive effects (Box et al. 1978). Table 5 shows the levels of the factors applied in this design. In order to follow the levels adopted in this design, the factors studied needed to be decoded. The decoding formula is given by:

$$\text{Coded Variable} = \frac{(\text{uncoded value} - 0.5 \times (\text{high value} + \text{low value}))}{0.5 \times (\text{high value} - \text{low value})} \quad (5)$$

The response function applied was a quadratic equation, as given below:

$$Y_i = A_0 + A_1X_1 + A_2X_2 + A_3X_1^2 + A_4X_2^2 + A_5X_1X_2 \quad (6)$$

where, Y_i = dependent variable = TPC, TFC or AOA; X_1 = coded CPE feed rate; X_2 = coded air inlet temperature and A_i = polynomial coefficients.

Experimental data were analyzed by response surface regression using the Visual General Linear Model (VGLM) module from the software package Statistica '99 (Statsoft, Inc.).

Table 5: Levels of factors for drying experiments

FACTORS	LEVELS		
	-1	0	+1
1. CPE feed rate, W_E (ml/min)	1.0	2.0	3.0
2. Air temperature, T ($^{\circ}\text{C}$)	40	80	120

3.3. Polyphenol and flavonoid contents

3.3.1. Extraction of flavonoid and polyphenol contents from APE and SDPE

Spray-dried propolis extract (SDPE, 0.1 g) (accurately weighed) was first dissolved in 10 mL of 80% ethanol. After centrifugation at 1000 $\times$ g for 10 min, the supernatant was collected and the precipitate was then twice extracted with 5 mL of 80% ethanol. Finally, the supernatant was combined with the previous supernatant and adjusted to 25 mL with 80% ethanol. Alcoholic propolis extract (APE) was directly diluted 50 and 100 times with 80% ethanol.

3.3.2. Polyphenol content

Total polyphenol contents, TPC, in APE and SDPE were determined by the Folin-Ciocalteu colorimetric method. 0.5 mL of APE and SDPE solution were mixed with 0.5 mL of the Folin-Ciocalteu reagent and 0.5 mL of 10% Na₂CO₃, and the absorbance was measured at 760 nm with a Hitachi U2001 spectrophotometer, after 1 h incubation at room temperature. Gallic acid was used to make the calibration curve. 25 mg of gallic acid was dissolved in 50% ethanol and then diluted to 1, 5, 10, 15 and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Kumazawa et al. 2004).

3.3.3. Flavonoid content

Total flavonoid contents, TFC, were determined using the aluminum chloride colorimetric method. To 0.5 mL of APE or SDPE solutions, 0.5 mL of 2% AlCl₃ ethanol solution was added. After 1 h at room temperature, the absorbance was measured at 420 nm with a Hitachi U2001 spectrophotometer. Quercetin was used to make the calibration curve. 10 mg of quercetin was dissolved in 80% ethanol and then diluted to 1, 5, 10, 20 and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The amount of 2% aluminum chloride was substituted by the same amount of distilled water for the blank (Kumazawa et al. 2004).

3.4. Lipid peroxidation

In addition to the lipid peroxidation inhibition tests performed for APE and SDPE, the same test was also performed for quercetin. Quercetin was used as an antioxidant reference with the purpose of comparing activities of APE and SDPE. The choice was due to the potent antioxidant activity of this flavonoid, which shows dose-dependent lipid peroxidation inhibition.

3.4.1. Sample preparation

Quercetin was diluted to yield media concentrations of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.312 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.156 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.078 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 25 mg of SDPE sample was diluted in ethanol to obtain solutions of 1 mg/mL, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, yielding final concentrations in the reaction medium of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The APE was also weighted and diluted, yielding final medium concentrations of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.4.2. Inhibition of lipid peroxidation

10 μL of each sample were added to 1.0 mL of a reaction mixture with sucrose 125 mM, KCl 65 mM and Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, and mitochondria were added to yield a final concentration of 1 mg of protein plus 50 μM ferrous ammonium sulfate and 2 mM sodium citrate for 30 min, at 37 $^{\circ}\text{C}$. For malondialdehyde (MDA) determination, 1 mL of 1% thiobarbituric acid (TBA) (prepared in 50 mM NaOH), 0.1 mL of 10 M NaOH and 0.5 mL of 20% H₃PO₄ were added, followed by incubation for 20 min at 85 $^{\circ}\text{C}$. The MDA-TBA complex was extracted with 2 mL of *n*-butanol. The samples were then centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. The blank was prepared without mitochondria and the control, equivalent to 100% peroxidation was prepared without antioxidant. The measurement was performed on the supernatant at 535 nm (Rodrigues et al. 2002).

3.4.3. Isolation of rat liver mitochondria

Mitochondria were isolated by differential centrifugation (Pedersen et al. 1978). Male Wistar rats weighing approximately 200 g were sacrificed by cervical dislocation; livers (10–15 g) were immediately removed, sliced in 50 mL of medium containing (mM) sucrose 250 EGTA 1 and HEPES-KOH 10, pH 7.2, and homogenized three times for 15 s at 1 min intervals in a Potter-Elvehjem homogenizer. Homogenates were centrifuged at 770 $\times$ g for 5 min and the resulting supernatant was further centrifuged at 9800 $\times$ g for 10 min. Pellets were suspended in 10 mL of medium containing (mM) sucrose 250 EGTA 0.3 and HEPES-KOH 10, pH 7.2, and centrifuged at 4500 $\times$ g for 15 min. The final mitochondrial pellet was suspended in 1 mL of medium containing (mM) sucrose 250 and HEPES-KOH 10, pH 7.2 and used within 3 h. Mitochondrial protein content was determined by the biuret reaction (Cain and Skilleter 1987).

Acknowledgements: Financial support from FAPESP (99/10183-6) and scholarships to Ms Stracieri (CNPq-PIBIC) and to Ms Marquede (CAPES) are gratefully acknowledged.

References

- Bankova V, Marcucci, MC (2000) Standardization of propolis: present status and perspectives. *Bee World* 8: 182–188.
- Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, Midorikawa K, Matsushige K, Message D, Huertas AAG, Kadota S (2000) Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *J Ethnopharmacol* 72: 239–246.
- Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S (2001) Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res* 15: 561–571.
- Bethold W, Löffler U (1993) Safety characteristics and their significance for the design and operation of chemical plants. *Int Chem Engin* 33: 178–183.
- Box M, Hunter WG, Hunter JS (1978) *Statistics for experimenters*. John Wiley & Sons, N. York.
- Cain K, Skilleter DN (1987) Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: Snell K and Mullock B (Eds) *Biochemical Toxicology*. IRL Press, Oxford, pp. 217–254.
- Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* 10: 178–182.
- Dinis TPC, Madeira VMC, Almeida LM (1994) Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys* 315: 161–169.
- Halliwel B, Gutteridge JMC (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Method Enzymol* 186: 1–85.
- Isla MI, Moreno MIN, Sampietro AR, Vattuone MA (2001) Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *J Ethnopharmacol* 76: 165–170.
- Krol W, Scheller S, Czuba Z, Matsumo T, Zydowicz G, Shani J, Mos M (1996) Inhibition of neutrophils chemiluminescence by ethanol extract

of propolis (EEP) and its phenolic components. *J Ethnopharmacol* 55: 19–25.

Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T (2004) Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem* 84: 329–339.

Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA (2000) Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71: 109–114.

Nagai T, Inoue R, Inoue H, Suzuki N (2003) Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. *Food Chem* 80: 29–33.

Pascual C, Gonzalez R, Torricella RG (1994) Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J Ethnopharmacol* 41: 9–13.

Pedersen P L, Greenawalt JW, Heynafarije B, Hulihan J, Decker GL, Soper JW, Bustamante E (1978) Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver-derived tissues. *Method Cell Biol* 20: 411–481.

Rodrigues T, Santos AC, Pigoso AA, Mingatto FE, Uyemura SA, Curti C (2002) Thioridazine interacts with the membrane of mitochondria acquiring antioxidant activity toward apoptosis – potentially implicated mechanisms. *Brit J Pharmacol* 136: 136–142.

Sforcin JM, Fernandes Jr. A, Lopes CAM, Bankova V, Funari SRC (2000) Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 73: 243–249.

Simões LMC, Gregório LE, Da Silva Filho AA, de Souza ML, Azzolini AECs, Bastos JK, Lucisano-Valim YM (2004) Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. *J Ethnopharmacol* 94: 59–65.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol* 299: 152–172.

Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations

Franciane D. Marquele^{a,*}, Valéria M. Di Mambro^a, Sandra R. Georgetti^a, Rúbia Casagrande^a, Yara M.L. Valim^b, Maria José V. Fonseca^a

^a Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto—USP, Av. do Café s/n 14049, 903, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Department of Physics and Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto—USP, Av. do Café s/n 14049, 903, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Received 17 November 2004; received in revised form 4 April 2005; accepted 5 April 2005

Available online 23 May 2005

Abstract

The antioxidant activity of extracts of propolis and of formulations added with these extracts were measured by scavenging different radicals in different systems. For the ethanolic extract of propolis (EEP) and the glycolic extract of propolis (GEP) the IC_{50} observed were respectively of 0.024 and 0.035 $\mu\text{L/mL}$ in scavenging hydroxyl radical, 0.016 and 0.012 $\mu\text{L/mL}$ in inhibiting lipid peroxidation, 0.22 and 0.24 $\mu\text{L/mL}$ in inhibiting chemiluminescence produced in the H_2O_2 /luminol/horseradish peroxidase (HRP) system and about 0.005 $\mu\text{L/mL}$ for both extracts in inhibiting chemiluminescence produced in the xanthine/luminol/xanthine oxidase (XOD) system.

The antioxidant activity of extracts of propolis in the formulations was not able to be assessed neither using the deoxyribose assay, since the formulation components interfered in the assay measurements, nor using chemiluminescence in the H_2O_2 /luminol/HRP system, since this method did not show to be sensitive for the extract of propolis evaluation. However, the antioxidant activity of extracts of propolis could be successfully evaluated in the formulations using both lipid peroxidation and chemiluminescence generated in the xanthine/luminol/XOD system inhibitions.

© 2005 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Propolis; Antioxidant; Topical formulation; Chemiluminescence; Lipid peroxidation; Deoxyribose assay

1. Introduction

Skin is a biological interface with the environment and functions as the first line of defense against noxious external stimuli such as ultraviolet, visible irradiation, prooxidant chemicals, infection and ionizing radiation [1].

However, by acute or chronic exposure to UV light the skin prooxidant/antioxidant equilibrium can be overwhelmed due to severe decrease of its antioxidant content and to striking formation of reactive oxygen species (ROS). This way the ROS generated in excess can attack lipids in cell membranes, proteins in tissues or enzymes, carbohydrates and DNA. So the deleterious effects of sunlight and particularly UV radiation on the skin can lead to a variety of ravages as inflammation, skin aging, tumour promotion, cutaneous auto-immune disease, and phototoxicity/photosensitivity [1].

Topical administration of antioxidants provides an efficient way to enrich the endogenous cutaneous protection system, and thus may be a successful strategy for diminishing ultraviolet radiation-mediated oxidative damage in skin [2].

Extracts of propolis are receiving renewed attention worldwide because of their beneficial effects, among them, the effective antioxidant activity and a general “back to nature trend”. Propolis typically consists of waxes, resins, water, inorganics, phenolics and essential oils [3], the exact composition of which is dependent upon the source plant(s).

Despite the chemical differences, it is well known that samples of different geographical origin and chemical composition on the skin can lead to a variety of ravages as inflammation, skin aging, tumour promotion, cutaneous auto-immune disease, and phototoxicity/photosensitivity [1].

Despite the chemical differences, it is well known that samples of different geographical origin and chemical composition

* Corresponding author. Tel.: +55 16 602 4315; fax: +55 16 633 1941.

E-mail address: frandm@fcfrp.usp.br (F.D. Marquele).

position usually demonstrate similar pharmacological activity. Propolis has shown pharmacological activities such as antioxidant [4–9], antiviral, antibacterial, antifungal, anti-amoebic [3,10,11], antiinflammatory [9], etc. This fact has led some researchers to the assumption that biological and biochemical test are the best way to standardization and evaluation of propolis. Among these tests, the assessment of the antioxidant activity by different methodologies, using enzymatic or non-enzymatic methods, it would be indicated [12].

Knowing that propolis has high antioxidant activity, it would be very important the development of topical formulations added with extracts of propolis. Also the antioxidant activity of these formulations should be accordingly assessed, using several methodologies, in order to choose the most adequate one. So raises the necessity to be concerned about formulations, since one of most challenging tasks in evaluating topical formulations is to deal with the presence of the formulations compounds that may cause interference if using a non specific method.

So, one of the objectives of this work was standardization of ethanolic and glycolic extracts of propolis using enzymatic or non-enzymatic antioxidant methodologies performed against different radicals and in different systems. It was also intended the development of different topical formulations added with extract of propolis and evaluation of these formulations using the same methods for the extracts, in order to verify, if the antioxidant activity is lost in the presence of the formulations compounds or if these compounds interfere with the method of evaluation. This way it will be possible to choose the most suitable method to perform the quality control and stability studies of the antioxidant activity of formulations added with propolis extract.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Brazilian extracts of propolis were purchased from APIS FLORA (Ribeirão Preto, SP, Brazil). The extracts were standardized using propolis from several sites of Brazil. Patent number PI 0405483-0, published in Revista de Propriedade Industrial no. 1778 from 01/02/2005). One of these extracts was ethanolic (EEP) and the another one was glycolic (GEP). The GEP was obtained from the EEP after evaporating the ethanolic portion and adding propylene glycol in the same amount. Luminol, horseradish peroxidase (HRP), thiobarbituric acid (TBA), xanthine, xanthine-oxidase (XOD) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), hydrogen peroxide 36% was purchased from Calbiochem (California, USA), deoxyribose and quercetin were purchased from Acros (New Jersey, USA), Gallic Acid and Folin–Ciocalteu were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All other chemicals were

of reagent grade and were used without further purification.

2.2. Total polyphenol and flavonoid contents in the Brazilian extracts of propolis

Total polyphenol contents in Brazilian extracts of propolis were determined by the Folin–Ciocalteu colorimetric method. 0.5 mL of EEP or GEP solution was mixed with 0.5 mL of the Folin–Ciocalteu reagent and 0.5 mL of 10% Na₂CO₃, and the absorbance was measured at 760 nm after 1 h incubation at room temperature. Total polyphenol contents were expressed as mg/g (gallic acid equivalents) [13].

Total flavonoid contents were determined using the aluminium chloride colorimetric method. To 0.5 mL of EEP or GEP solution, 0.5 mL of 2% AlCl₃ ethanol solution was added. After 1 h at room temperature, the absorbance was measured at 420 nm. Total flavonoid contents were calculated as quercetin (mg/g) from an analytical curve. The amount of 2% aluminium chloride was substituted by the same amount of distilled water in blank [13].

2.3. Test formulations

All the raw materials for the formulations were purchased from Galena (Campinas, SP, Brazil) or were a gift from Clariant (São Paulo, SP, Brazil). Emulsions were developed varying the emulsifying agent and in formulation 3 the anionic hydrophilic colloid (carboxypolymethylene, Carbopol® 940) was also added as a stabilizing agent. Macadamia nut oil, isodecyl oleate and isopropyl palmitate were added as emollient, and glycerol as a moisturizer. The preservative was a mixture of phenoxyethanol and parabens. Deionized water was used for the preparation of all formulations (Table 1). Extracts of propolis (2.5%) and preservatives were firstly solubilized in propylene glycol and next incorporated to the formulations at room temperature.

Table 1
Percent composition (w/w), of the emulsion media of the formulations

Component	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)
Hostacerin® SAF ^a	–	–	–
Croda ^b	–	8	2
Isodecyl oleate	0.5	1	0.5
Isopropyl palmitate	0.5	1	1
Macadamia nut oil	1.5	2	–
Propylene glycol	5	5	5
Glycerol	–	3	2
Carbopol® 940 (dispersion 2%)	–	–	40
Phenoxyethanol and parabene	0.5	0.5	0.5
Water	86.6	79.5	49

^a Self-emulsifying agent prepared without heating (ammonium acryloyldimethyl-taurate/VP copolymer + rapeseed oil sorbitol esters + tri-laureth-4 phosphate + mineral oil + isopropyl palmitate).

^b Self-emulsifying wax (mineral oil + petrolatum + lanolin alcohol + fatty alcohol + ethoxilated fatty alcohol).

2.4. Preparation of samples

Five hundred microlitres of each extract of propolis was solubilized with propylene glycol and diluted using the medium of each reaction to final concentrations of 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.5, 0.025, 0.0125, 0.00625, and 0.00325 $\mu\text{L/mL}$, for the following methodologies: inhibition of lipid peroxidation assay; H_2O_2 /luminol/HRP chemiluminescence assay; and the deoxyribose assay. For the xanthine/luminol/XOD chemiluminescence assay the final concentrations were 0.15, 0.075, 0.045, 0.037, 0.03, 0.019, 0.0093, and 0.0047 $\mu\text{L/mL}$. Formulations containing 2.5% of ethanol extract of propolis or glycolic extract of propolis and propolis-free formulations, were diluted 1:5 with the medium of each reaction. Next, the antioxidant activities found in the formulations were compared to the extracts of propolis in the same final concentration.

2.5. Inhibition of lipid peroxidation assay

Ten microlitres of each sample was added to 1.0 mL of a reaction mixture sucrose (125 mM), KCl (65 mM) and Tris-HCl (10 mM) (pH 7.4; medium I), and mitochondria was added to yield a final concentration of 1 mg of protein. Then, plus 50 μM ferrous ammonium sulfate and 2 mM sodium citrate was added and the samples were incubated at 37 °C for 30 min. Mitochondria was isolated by differential centrifugation from livers of male Wistar rats as described for Pedersen et al. [14] and mitochondrial protein content was determined by the biuret reaction [15]. For TBA-reactive compounds determination, 1 mL of 1% thiobarbituric acid (TBA) (prepared in 50 mM NaOH), 0.1 mL of NaOH (10 M) and 0.5 mL of H_3PO_4 (20%) were added, followed by incubation for 20 min at 85 °C. The TBA-reactive compounds were extracted with 2 mL of *n*-butanol. The samples were then centrifuged at $9800 \times g$ for 10 min. The measurement was performed on the supernatant at 535 nm [16]. The amount of TBA-reactive compounds were evaluated as malondialdehyde (MDA), and was calculated from $\varepsilon = 1.56 \times 10^5/\text{M}$.

2.6. Chemiluminescence assay

2.6.1. H_2O_2 /luminol/HRP system

Changes of chemiluminescence intensity of the H_2O_2 /luminol/HRP system were measured as follows: 10 μL of each sample was mixed with phosphate buffer (0.1 M; pH 7.4) (medium II), and a 2 mg/mL luminol solution in DMSO was added to yield a final concentration of 1.13×10^{-4} M. H_2O_2 was then added to a final concentration of 5×10^{-5} M. The reaction was started by adding HRP at a final concentration of 0.2 IU/mL, yielding final volume of 1 mL of solution [17]. Chemiluminescence was measured for 10 min at 25 °C with an Autolumat LB 953 apparatus.

2.6.2. Xanthine/luminol/XOD system

Chemiluminescent mixture was prepared immediately before analysis by mixing: 400 μL glycine buffer (0.1 M pH 9.4, 1 mM EDTA) (medium III), 150 μL xanthine (6 mM in glycine buffer), 10 μL sample, 10 μL of luminol (0.6 mM). Adding 100 μL xanthine-oxidase (XOD) solution (20 IU/mL) started the reaction. The buffer and the xanthine solution were stable for 4 and 2 weeks, respectively, when kept at 4 °C, while the XOD and luminol solutions were freshly prepared each time. Chemiluminescence was measured for 5 min at 25 °C with an Autolumat LB 953 apparatus [18].

2.7. Deoxyribose assay

The degradation of the deoxyribose by the hydroxyl radical was evaluated by mixing: 1 mL of KH_2PO_4 -KOH buffer (20 mM, pH 7.4) (medium IV), 10 μL ascorbate (100 μM), 10 μL sample, 10 μL deoxyribose (2.8 mM), 10 μL H_2O_2 (1 mM), 10 μL of Fe-EDTA solution (FeCl_3 100 μM , EDTA 104 μM). Reaction mixtures were incubated at 37 °C for 30 min, next it was added 1 mL tiobarbituric acid (1%), 100 μL of NaOH (10 M) and 500 μL H_3PO_4 (20%), and the reaction mixtures were incubated at 85 °C for 20 min. Solutions of FeCl_3 and ascorbate were made up immediately before use in deaerated water. The measurements were made at 535 nm at room temperature [19].

2.8. Statistical analysis

Data were expressed as mean $\pm$ S.E. determined of triplicate or duplicate analysis. The percentage which caused 50% of inhibition of the system assessed (IC_{50}) by the extracts of propolis were determined using GraphPad Prism® software. Extracts of propolis data and formulations containing these extracts data were evaluated using Student's *t*-test, at *P*-values < 0.05 determined significant differences among means.

3. Results and discussion

A series of experiments were performed in an attempt to evaluate the antioxidant activity of two extracts of propolis in order to show the ability of these extracts in scavenging different radicals in different systems. It was also intended to assess if the antioxidant activity expected for both extracts of propolis alone could be measured in the presence of the formulation components.

The antioxidant activity may be related to polyphenol and flavonoid content since it has been reported that these phenolic compounds can act breaking the chain reaction of lipid [20], inhibiting chemiluminescence reactions [21,22], scavenging several ROS [23], etc.

The Folin-Ciocalteu method and the AlCl_3 coloration, to determine the total polyphenol and flavonoid contents,

Table 2
Polyphenol and flavonoid content in Brazilian extracts of propolis

Extract	Polyphenol content (mg/g)	Flavonoid content (mg/g)
EEP	13.3	4.7
GEP	13.33	4.79

respectively, are currently used to analyze plants and food materials. In the present study, these methods were applied to determine total polyphenol and flavonoid contents of two extracts of propolis.

The total flavonoid and polyphenol contents were similar for both extracts and are demonstrated in Table 2. The polyphenol content in both extracts was about 2.8 times of the flavonoid content. The most common constituents of propolis from Brazil and other tropical zones are prenylated derivatives of *p*-coumaric acid, various diterpenes and flavonoids. This composition is different if compared to extracts from other origins, since the composition of propolis depends upon the vegetation of the area and the season from which it is collected [13,24].

Regarding to lipid peroxidation induced by Fe^{2+} /ascorbate, the initiation of peroxidation sequence of a membrane in a free lipid peroxide system refers to the attack of any species that has sufficient reactivity to abstract a hydrogen atom from a polyunsaturated fatty acid.

Considering that membrane fractions (mitochondria) isolated from disrupted cells, as used in this experiment, may contain some lipid peroxides, which are formed enzymatically in tissues by cyclooxygenase and lipoxygenase enzymes when iron salts are added, these lipid peroxides can be decomposed to generate peroxyl ($\text{LOO}^\bullet$) and alkoxyl ($\text{LO}^\bullet$) radicals that can abstract hydrogen from polyunsaturated acyl chains and propagate lipid peroxidation [25].

The peroxides breaking down will produce carbonyl compounds known as TBA-reactive compounds. The 3-carbon compound malondialdehyde (MDA) is one such carbonyl, which forms a characteristic chromogenic adduct with two molecules of thiobarbituric acid (TBA), that is evaluated in 535 nm.

Table 3 shows the TBA-reactive compounds formed in lipid peroxidation when extracts of propolis were added in this system and in Fig. 1 it is shown the

Fig. 1. Inhibition of lipid peroxidation induced by Fe^{2+} found for different concentrations of: (▲) glicolic extract of propolis and (□) ethanolic extract of propolis. Results are mean $\pm$ S.E. of three experiments run in parallel.

concentration–response curves obtained for this method. The percent of peroxidation inhibition was plotted against different concentrations of the extract of propolis examined and the concentration which caused 50% inhibition was taken as the IC_{50} value. The same procedure for expressing results was used for all the methodologies employed.

The percentage of inhibition was calculated using the following equation

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 - \frac{100A_s}{A_0} \quad (1)$$

where A_s is the absorbance observed when experimental sample was added, and A_0 the absorbance of the positive control (sample absence or the extract of propolis-free control formulation).

The IC_{50} for EEP and GEP were 0.016 and 0.012 $\mu\text{L/mL}$, respectively. α -Tocopherol, a well known lipophilic antioxidant of endogenous origin found in tissues showed in this methodology IC_{50} of 0.48 $\mu\text{g/mL}$ [26]. These results suggest that both extracts of propolis act inhibiting the lipid peroxidation in a more effective way than α -tocopherol. The inhibition of lipid peroxidation may be probably due to the scavenging activity against lipid peroxides, peroxyl and alkoxyl radicals and, in same extend, to the Fe^{2+} chelating activity. The precision of this method was also evaluated, showing 2.58% within-assay precision and 4.33% between-day repeatability.

Table 3
TBA-reactive compounds formed in lipid peroxidation induced by Fe^{2+}

Final concentration in medium ($\mu\text{L/mL}$)	EEP		GEP	
	TBA-reactive compounds (nM/mg of protein)	TBA-reactive compounds (%)	TBA-reactive compounds (nM/mg of protein)	TBA-reactive compounds (%)
0.1	0.17	3.22	0.13	2.47
0.05	0.36	7.05	0.13	2.61
0.025	1.70	32.82	0.90	17.38
0.0125	3.42	66.04	2.76	53.29
0.0065	3.72	71.83	3.70	71.44
Control ^a	5.18	100	5.18	100

^a Antioxidant absence.

Fig. 2. Inhibition of lipid peroxidation induced by Fe^{2+} , when formulations containing extracts of propolis were evaluated: F, formulations; EEP, ethanolic extract of propolis; GEP, glycolic extract of propolis. The samples of extract of propolis were proportional to the content of the extract in the formulations and were evaluated in a final concentration of $0.05 \mu\text{L/mL}$. Results are mean $\pm$ S.E. of three experiments run in parallel.

The antioxidant activity observed in our studies was also kept when both extracts were added to different formulations, as observed in Fig. 2. The inhibition of lipid peroxidation by extracts of propolis when analyzed in a final concentration of $0.05 \mu\text{L/mL}$ were similar to that found for formulations added with the extracts (no significant difference), suggesting that the antioxidant activity may be properly measured since the formulations components showed no interference.

The chemiluminescence assays were evaluated based on the measurements of the areas under the time courses of the luminescent emission in the presence of the extracts of propolis and the formulations containing these extracts. We estimated the relative inhibitory activity of each sample at different concentrations and in both systems used.

The percent inhibition caused by each sample was calculated as:

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 - \frac{100 \text{AUC}_1}{\text{AUC}_0} \quad (2)$$

where AUC_0 represents the area under the curve observed for the control (extract absence or propolis-free control formulations) and AUC_1 (experimental samples).

Among the assays for antioxidant activity, chemiluminescence is advantageous because of its high sensitivity and rapidity. Light emission can be markedly amplified using the H_2O_2 /luminol/HRP system [27], where in the presence of H_2O_2 , HRP catalyses the one-electron oxidation of various divalent redox molecules (luminol radical) through the catalytic cycle of the enzyme. The luminol radicals generated reacts with O_2 to yield oxidized luminol and $\text{O}_2^{\bullet-}$. This superoxide radical reacts with luminol radical to yield an endoperoxide, which then decomposes to yield an electronically excited 3-aminophthalate dianion, which in returning to its ground state emits light [28].

When compounds like propolis are added to the chemiluminescent solution, the light emission should be reduced, indicating antioxidant activity by scavenging any radical generated in this system.

The xanthine/luminol/XOD assay was evaluated by the ability of extract of propolis and the formulations containing these extracts in scavenging superoxide radical ($\text{O}_2^{\bullet-}$) generated in the following reaction:

Luminol is used as a detector, which is oxidized by the superoxide anions. The inhibition of luminescent emission caused by the decrease of superoxide anions was measured.

Concerning the possibility of enzyme inhibition in both chemiluminescent assays, the enzymes (HRP and XOD) were incubated with extracts of propolis at different temperatures varying the contact time. No enzyme inhibition was found (data not shown), showing that extracts of propolis act exclusively scavenging free radicals generated in these systems.

The IC_{50} calculated in the H_2O_2 /luminol/HRP system for EEP and the GEP were 0.22 and $0.24 \mu\text{L/mL}$, respectively. In the xanthine/luminol/XOD system the IC_{50} found for EEP and GEP were both about $0.005 \mu\text{L/mL}$, showing that the strongest antioxidant activity for propolis was found in scavenging superoxide radical (see Figs. 3 and 4). The precision of these methods were also evaluated, showing 0.78% within-assay precision and 1.10% between-day repeatability for the H_2O_2 /luminol/HRP system, and 1.57% within-assay precision and 1.17% between-day repeatability for the xanthine/luminol/XOD system.

Extracts of propolis showed about 40 times more effective in the xanthine/luminol/XOD (pH 9.4) system compared to the H_2O_2 /luminol/HRP (pH 7.4) system, this may probably be due to the pH of the medium which permitted different redox potential of the propolis antioxidant compounds, and also due to the different kind of radicals formed. May be in this more basic reaction medium (pH 9.4) the propolis antioxidant compounds can scavenge the radicals in an easier way.

Fig. 3. Inhibition of light emission from xanthine/luminol/XOD luminescent reactions with luminol found for different concentrations of: (▲) glycolic extract of propolis and (□) ethanolic extract of propolis. Results are mean $\pm$ S.E. of three experiments run in parallel.

Fig. 4. Inhibition of light emission from H_2O_2 /luminol/HRP luminescent reactions with luminol found for different concentrations of: (▲) glycolic extract of propolis and (□) ethanolic extract of propolis. Results are mean $\pm$ S.E. of three experiments run in parallel.

These methods were also evaluated for α -tocopherol and showed IC_{50} of 3.3 $\mu\text{g/mL}$ in the H_2O_2 /luminol/HRP assay [26], and this potent antioxidant didn't show any activity in xanthine/luminol/XOD assay (data not shown).

The chemiluminescence assay using xanthine/luminol/XOD system was also performed to assess the formulations (Fig. 5). The inhibitions of chemiluminescence in this system by extracts of propolis when analyzed in a final concentration of 0.075 $\mu\text{L/mL}$ were similar to those observed for formulations (no significative variance). These results suggest that the varying formulation components caused no interference with the antioxidant measurement.

However, the H_2O_2 /luminol/HRP system was not able to evaluate the formulations, since the final concentration of extract of propolis in the medium when formulations are diluted (1:5) was 0.05 $\mu\text{L/mL}$, and the activity found for the extracts of propolis in this concentration was less than 5%. So it would be necessary a 20% extract of propolis formulation to reach the same activity (about 90% inhibition) found for the other methodologies used. Nevertheless, this antiox-

Fig. 5. Inhibition of light emission from xanthine/luminol/XOD luminescent reactions with luminol when formulations containing extracts of propolis were evaluated: F, formulations; EEP, ethanolic extract of propolis; GEP, glycolic extract of propolis. The samples of extract of propolis were proportional to the content of the extract in the formulations and were evaluated in a final concentration of 0.075 $\mu\text{L/mL}$. Results are mean $\pm$ S.E. of three experiments run in parallel.

idant methodology could be successfully applied in evaluating other antioxidant compounds which had a lower IC_{50} than the extracts in study (0.22 and 0.24 $\mu\text{L/mL}$ for EEP and GEP, respectively).

The very low IC_{50} (about 0.005 $\mu\text{L/mL}$) found for both extracts of propolis in the xanthine/luminol/XOD system confirms that besides the high antioxidant activity of the extracts of propolis, this method presents high sensitivity. This implies that this method could have high applicability when intending to evaluate the antioxidant activity in very diluted formulations or in formulations which the antioxidant compound is used in low concentration.

The inhibitory capacity of chemiluminescence was also reported by Pascual [10] evaluating extracts of propolis from Cuba. These extracts had strong antioxidant activity against superoxide radicals, alkoxyl radicals and in the oxidation reaction of luminol on hydrogen peroxide.

In order to find out if propolis is active against hydroxyl radicals, the deoxyribose assay was used. The sugar deoxyribose (2-deoxy-D-ribose) is degraded on exposition to hydroxyl radical generated by a mixture of Fe^{3+} , ascorbate, and H_2O_2 in a presence of a slight molar excess of EDTA over the Fe^{3+} salt. The $\bullet\text{OH}$ radicals attack the deoxyribose and set off a series of reactions that eventually result in formation of MDA. MDA may be detected by its ability to react with thiobarbituric acid (TBA) in acid conditions [19,29].

Any other molecule added to the reaction mixture that is capable of reacting with $\bullet\text{OH}$ should compete with deoxyribose for $\bullet\text{OH}$, hence, it will decrease the rate of deoxyribose degradation. The precision of this method was also evaluated, showing 2.03% within-assay precision and 3.5% between-day repeatability.

The activity of extracts of propolis in scavenging $\bullet\text{OH}$ radicals can be seen in Fig. 6, the percentage inhibition was calculated as in Eq. (1), and it was observed that these extracts scavenge $\bullet\text{OH}$ in a dose-response way, showing IC_{50} for EEP and GEP of 0.024 and 0.035 $\mu\text{L/mL}$, respectively. These results are also better when compared to α -tocopherol,

Fig. 6. Inhibition of deoxyribose degradation found for different concentrations of: (▲) glycolic extract of propolis and (□) ethanolic extract of propolis. Results are mean $\pm$ S.E. of two experiments run in parallel.

Table 4
IC₅₀ values for the antioxidant activities of extracts of propolis

Methodologies	IC ₅₀ ^a	
	EEP ^b	GEP ^c
Lipid peroxidation assay	0.016	0.012
H ₂ O ₂ /luminol/HRP assay ^d	0.22	0.24
Xanthine/luminol/XOD assay ^d	0.005	0.005
Deoxyribose assay	0.024	0.035

^a Concentration which caused 50% inhibition.

^b Ethanolic extract of propolis.

^c Glycolic extract of propolis.

^d Chemiluminescence.

which showed IC₅₀ of 0.3 µg/mL [26]. However, this method was not able to evaluate this activity when the extracts were added in the formulations. All the formulations with propolis extract tested produced the same content of MDA as the formulation without propolis extract, implying no antioxidant activity. This result is probably due to the high reactivity of •OH and its unspecificity, thus •OH may react fast to the components of the formulations. Hence, the propolis antioxidant compounds do not have enough •OH to react, since the formulation compounds are present in a higher concentration.

This unspecific activity of hydroxyl radicals was reported for Halliwell and Gutteridge [25] showing the ability of •OH to hydroxylate easily compounds such as salicylate, benzoate, phenylalanine or phenol, attack tryptophan, convert dimethyl sulfoxide to methanal, methanesulfinic acid, or methane decarboxylate benzoic acid to CO₂, etc.

4. Conclusion

The IC₅₀ values observed for the extracts of propolis tested in the present study showed how different activities these extracts may have, and the extension that each radical may be scavenged (Table 4). In all the methodologies studied, it was possible to build a dose-response curve, showing that these methodologies may be adequate in evaluating the antioxidant activity of different extracts of propolis. And this kind of evaluation could successfully lead to standardization of propolis extracts from different geographic areas.

After evaluating the IC₅₀ found for both propolis, it was concluded that the best antioxidant activity of the extracts of propolis studied was found for the superoxide radical generated in the xanthine/luminol/XOD system, followed by lipid peroxidation inhibition and scavenging •OH radicals in the deoxyribose assay.

But only lipid peroxidation and xanthine/luminol/XOD assays were able to evaluate the antioxidant activity of formulations. In these methodologies the diluted extract of propolis-free formulation caused no effect on the observed controls, showing no interference of the different formulations components.

From the results observed in this work, it can be deduced that both propolis extract can be added to topical formula-

tions and their antioxidant activity are maintained in order to protect skin against damage caused by free radical. Nevertheless, it is essential to choose the correct method to evaluate the antioxidant activity of these formulations, with the purpose of performing a quality control work. Besides this it would be of very importance the antioxidant activity evaluation in stability studies, knowing that an antioxidant formulation could become pro-oxidant, without altering the marker compound stability that is usually used in these studies.

Acknowledgement

The authors wish to acknowledge the financial support provided by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

References

- [1] J. Fuchs, L. Packer, in: H. Sies (Ed.), *Oxidative Stress—Oxidants and Antioxidants*, Academic Press, London, 1991, pp. 559–583.
- [2] A. Saija, A. Tomaino, D. Trombetta, M. Giacchi, A. De Pasquale, F. Bonina, *Int. J. Pharm.* 175 (1998) 85–94.
- [3] J.W. Dobrowolski, S.B. Vohora, K. Sharma, S.A. Shah, S.A.H. Naqvi, P.C. Dandiya, *J. Ethnopharmacol.* 35 (1991) 77–82.
- [4] M.I. Isla, M.I.N. Moreno, A.R. Sampietro, M.A. Vattuone, *J. Ethnopharmacol.* 76 (2001) 165–170.
- [5] M.I.N. Moreno, M.I. Isla, A.R. Sampietro, M.A. Vattuone, *J. Ethnopharmacol.* 71 (2000) 109–114.
- [6] A.H. Banskota, Y. Tezuka, S. Kadota, *Phytother. Res.* 15 (2001) 561–571.
- [7] A.H. Banskota, Y. Tezuka, I.K. Adnyana, K. Midorikawa, K. Matsushige, D. Message, A.A.G. Huertas, S. Kadota, *J. Ethnopharmacol.* 72 (2000) 239–246.
- [8] C. Pascual, R. Gonzalez, R.G. Torricella, *J. Ethnopharmacol.* 41 (1994) 9–13.
- [9] R. Volpert, E. Elstner, *Z. Naturforsch. C48* (1993) 858–862.
- [10] M.C. Marcucci, F. Ferreres, C. Garcia-Viguera, V.S. Bankova, S.L. De Castro, A.P. Dantas, P.H.M. Valente, N. Paulino, *J. Ethnopharmacol.* 74 (2001) 105–112.
- [11] A. Kujumgiev, I. Tsvetkova, Yu. Serkedjieva, V. Bankova, R. Christov, S. Popov, *J. Ethnopharmacol.* 64 (1994) 235–240.
- [12] V. Bankova, M.C. Marcucci, *Bee World* 8 (2000) 182–188.
- [13] S. Kumazawa, T. Hamasaka, T. Nakayama, *Food Chem.* 84 (2004) 329–339.
- [14] P.L. Pedersen, J.W. Greenawalt, B. Heynfarje, J. Hullihen, G.L. Decker, J.W. Soper, E. Bustamante, *Method Cell Biol.* 20 (1978) 411–481.
- [15] K. Cain, D.N. Skilleter, in: K. Snell, B. Mullock (Eds.), *Biochemical Toxicology*, IRL Press, Oxford, 1987, pp. 217–254.
- [16] T. Rodrigues, A.C. Santos, A.A. Pigoso, F.E. Mingatto, S.A. Uye-mura, C. Curti, *Br. J. Pharmacol.* 136 (2002) 136–142.
- [17] W. Krol, Z. Czuba, S. Sheller, Z. Paradowski, J. Shani, *J. Ethnopharmacol.* 41 (1994) 121–126.
- [18] S. Girotti, F. Fini, E. Ferri, R. Budini, S. Piazzzi, D. Cantagalli, *Talanta* 51 (2000) 685–692.
- [19] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, O.I. Aruoma, *Anal. Biochem.* 165 (1987) 215–219.
- [20] J. Torel, J. Cillard, P. Cillard, *Phytochemistry* 25 (1986) 383–385.
- [21] W. Krol, S. Sheller, Z. Czuba, T. Matsumo, G. Zydowicz, J. Shani, M. Mos, *J. Ethnopharmacol.* 55 (1996) 19–25.

- [22] S.R. Georgetti, R. Casagrande, V.M. Di Mambro, A.E.C.S. Azzolini, M.J.V. Fonseca, *AAPS Pharm. Sci.* 5 (2003) 210–214.
- [23] W. Bors, W. Heller, C. Michel, M. Saran, *Method Enzymol.* 186 (1990) 343–355.
- [24] L.M.C. Simões, L.E. Gregório, A.A. Da Silva Filho, M.L. de Souza, A.E.C.S. Azzolini, J.K. Bastos, Y.M. Lucisano-Valim, *J. Ethnopharmacol.* 94 (2004) 59–65.
- [25] B. Halliwell, J. Gutteridge, *Method Enzymol.* 186 (1990) 1–85.
- [26] V.M. Di Mambro, M.J. Fonseca, *J. Pharmaceut. Biomed.* 37 (2005) 287–295.
- [27] L. Dodeigene, R. Thumus, Lejeune, *Talanta* 51 (2000) 415–439.
- [28] H.P. Misra, P.M. Squatrito, *Arch. Biochem. Biophys.* 215 (1982) 59–65.
- [29] O. Aruoma, *Method Enzymol.* 233 (1994) 57–66.

Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC

Franciane D. Marquele^a, Anderson R.M. Oliveira^b, Pierina S. Bonato^b,
Marilisa G. Lara^a, Maria José V. Fonseca^{a,*}

^a Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, USP Av. do Café s/n, 14049- 903 Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Department of Physics and Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, USP Av. do Café s/n, 14049- 903 Ribeirão Preto, SP, Brazil

Received 11 October 2005; received in revised form 8 December 2005; accepted 15 December 2005

Available online 9 March 2006

Abstract

Propolis is a resinous bee hive product that has many biological activities. Among these activities, the antioxidant activity deserves special interest since it suggests propolis could be successfully applied topically to prevent and treat skin damages. The skin is continuously exposed to free radicals generated in the aging process and by external stimuli such as sunlight. Thus, the development of topical formulations added with propolis extract is justified. However, it raises the necessity of being concerned about the methodologies that could be used to evaluate the propolis extract release from these formulations. So, *p*-coumaric acid content using HPLC and the antioxidant activity using chemiluminescence were used to assess the release of propolis extract from topical formulations. A low fat content formulation (F1) and a high fat content formulation (F2) were evaluated and they showed that after 6 h, 4.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (F1) and 2.75 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (F2) of the *p*-coumaric acid was released, while it was found that both formulations released about 0.85 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ of the antioxidant activity as propolis extract equivalent (AAPEE). Thus, once the antioxidant activity of propolis extract may be the result of the synergic action of several compounds, the obtained results indicate that a release study would be more conclusive if the antioxidant activity was evaluated, besides the measurement of a marker compound content.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Propolis; Release studies; Topical formulation; Chemiluminescence; Antioxidant activity; HPLC

1. Introduction

Propolis is a resinous bee hive product that has been used by man since ancient times for its pharmaceutical properties and it is still used as a constituent of “bio-cosmetics”, “health food” and for numerous other purposes [1]. Numerous studies have reported that propolis has a broad spectrum of biological activities such as antioxidant [2–5], cytotoxic, hepatoprotective [6], antiinflammatory [7,8], immunomodulatory [9], antibacterial, antifungal and antiviral [1].

From the biological activities found for propolis, the antioxidant activity deserves special interest since it suggests propolis could be successfully applied topically to prevent and treat skin damages. The skin is continuously exposed to free radicals generated in the aging process and by external stimuli such

as sunlight. It is well known that sunlight coupled with living in an oxygen-rich atmosphere causes unwanted and deleterious stresses on skin, since sunlight can overwhelm the antioxidant system, making natural protective controls inadequate, resulting in oxidative damage [10]. Thus, the development of topical formulations added with propolis extract is justified.

When drugs, be it modern or traditional, are applied topically on the skin, an active agent must be released from the carrier (vehicle) before it contacts the epidermal surface and be available for penetration into the stratum corneum and lower layers of the skin, but in the case of propolis, and other phytopharmaceuticals, there are many constituents that are able to be released from the formulation. For example, more than 150 compounds have been identified as constituents of propolis [11], thus, it is difficult to establish just a marker compound to evaluate a release study since the activity desired when propolis extract is added to topical formulations is the result of synergic action of several compounds present in the extract. The objectives of this study were, therefore, to elaborate and validate a HPLC analysis of

* Corresponding author. Tel.: +55 16 602 4315; fax: +55 16 633 1941.
E-mail address: magika@fcfrp.usp.br (M.J.V. Fonseca).

p-coumaric acid (a component present in large amounts in propolis), to evaluate and validate an antioxidant activity of propolis extract by chemiluminescence, and to study the release profile of propolis extract from topical formulations using both validated methods.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

p-Coumaric acid was supplied by Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA), ethanolic propolis extract was purchased from Apis Flora (Ribeirão Preto, Brazil—the extract was standardized using propolis from several sites of Brazil. Patent number PI 0405483-0, published in Revista de Propriedade Industrial no. 1778 from 01/02/2005). Methanol was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and was of chromatographic grade. Acetic acid was supplied by Zilquímica (Ribeirão Preto, Brazil). Sodium chloride and sodium dihydrogen phosphate were obtained from Merck (Darmstadt, Germany) all of analytical grade. The water used to prepare the solutions or mobile phase was purified in a Milli-Q-plus System (Millipore, Bedford, MA, USA). Luminol, xanthine and xanthine-oxidase (XOD) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other chemicals were of reagent grade and were used without further purification. All the raw materials for the formulations were purchased from Galena (Campinas, SP, Brazil) or were a gift from Clariant (São Paulo, SP, Brazil).

2.2. Determination of *p*-coumaric acid by HPLC

2.2.1. Apparatus and chromatographic conditions

Analyses were conducted using a Shimadzu (Kyoto, Japan) liquid chromatograph, equipped with an LC-AT VP solvent pump unit and an SPD-10A UV–visible detector operating at 268 nm. Injections were performed manually through a 50 μ L loop with a Rheodyne model 7125 injector (Rheodyne, Cotati, USA). Data were collected using a Chromatopak CR6A integrator (Shimadzu, Kyoto, Japan). The separation of *p*-coumaric acid was carried out at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ on Lichrospher 100 RP-8 column (Merck, Darmstadt, Germany) using methanol–acetic acid solution 1% (25:75, v/v), at flow rate of 1.2 mL/min. A CN column (4 mm $\times$ 4 mm, 5 μ m particle size, Merck, Darmstadt, Germany) was used as guard column.

2.2.2. Standard solutions

Stock standard solutions of *p*-coumaric acid were prepared in methanol in the concentration range of 1–200 μ g/mL. They were stored frozen at -20°C , remaining stable for at least 3 months. Working solutions of *p*-coumaric acid were prepared daily in receptor solution in the concentration range of 25–5000 ng/mL. Both standard and working solutions were protected from direct light, since we previously observed *p*-coumaric acid was degraded by light [12]. The reception solution content is further described.

2.2.3. Validation of the method

Calibration curves were obtained by spiking aliquots of 1 mL drug-free receptor solutions with standard solutions of *p*-coumaric acid in the concentration range of 25–5000 ng/mL. No internal standard was used in this method.

The sensitivity of the method was evaluated by determining the quantification limit (LOQ). The LOQ was defined as the lowest concentration that could be determined with accuracy and precision below 20% [13] over five analytical runs and it was obtained using receptor solution (1 mL) spiked with 25 ng/mL of *p*-coumaric acid. Precision was expressed as relative standard deviation (R.S.D.%) and accuracy as percent of deviation between the true and the measured value. To assess within-day precision and accuracy, replicate analyses ($n = 10$) of 1 mL of receptor solution spiked at concentrations of 75 and 4000 ng/mL of *p*-coumaric acid were performed. For between-day assays, quintuplicate receptor solution of *p*-coumaric acid were analyzed for 5 consecutive days ($n = 5$). The selectivity of the method was assured in the release studies, which are further described. For this determination, blank receptor solutions were analyzed before and after release studies.

Freeze–thaw cycle stability and short-term room temperature stability were determined. To perform the freeze–thaw cycle stability test, three aliquots ($n = 3$) at the low (25 ng/mL) and high concentration (4000 μ g/mL) of the quality control samples were stored at -20°C for 24 h and thawed at room temperature protected from direct light. When completely thawed, the samples were refrozen for 12 h under the same conditions. The freeze–thaw cycle was repeated twice more, and then the samples were analyzed on the third cycle. For the determination of short-term room temperature stability, three aliquots of each quality control sample (at the same concentrations as described above) were prepared and kept at room temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) for 12 h protected from direct light. After this period, the samples were analyzed. The peak areas obtained from both stability tests were compared to the peak areas obtained with freshly prepared samples. Student's *t*-test was applied, with the level of significance set at $p \leq 0.05$.

2.2.4. Determination of *p*-coumaric acid in propolis extract

p-Coumaric acid was chosen as marker compound in propolis extract and it was determined after diluting propolis extract 1:1000 in methanol and injecting into the HPLC instrument.

2.3. Determination of the antioxidant activity by chemiluminescence

2.3.1. Apparatus of chemiluminescence

This method was slightly modified from Girotti et al. [14] and Marquele et al. [15]. Chemiluminescent mixture was prepared immediately before analysis by mixing 360 μ L glycine buffer (0.1 M pH 9.4, 1 mM EDTA), 150 μ L xanthine (6 mM in glycine buffer), 50 μ L sample and 10 μ L of luminol (0.6 mM). Adding 100 μ L xanthine-oxidase solution (20 IU/mL) started the reaction. The buffer and the xanthine solution were stable for 4 and 2 weeks, respectively, when kept at 4°C , while the XOD and luminol solutions were freshly prepared each time.

Chemiluminescence was measured for 5 min at 25 °C with an Autolumat LB 953 apparatus. Light emission was recorded in counted photons per minute (cpm). The area under the time-course curves (AUC) was calculated. Percentage of inhibition of chemiluminescence of each sample was calculated by the formula:

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 - \frac{100 \times \text{AUC}_1}{\text{AUC}_0}$$

where AUC₀ represents the area under the curve observed for the control (extract absence) and AUC₁ (experimental samples).

2.3.2. Standard solutions

Stock standard solutions of propolis extract were prepared daily in propylene glycol in the concentration of 100 µL/mL. Working solutions of propolis extract were prepared diluting the stock solution in the drug-free receptor solution in the final medium concentrations range of 0.005–0.014 µL/mL.

2.3.3. Validation of the method

Calibration curve was obtained in the concentration range of 0.005–0.014 µL/mL of propolis extract in medium. The LOQ was defined as the lowest concentration that could be determined with accuracy and precision below 20% [13]. Precision was expressed as relative standard deviation and to assess within-day precision, replicate analyses ($n = 10$) of the concentrations 0.005, 0.007 and 0.0014 µL/mL were performed. For between-day assays, quintuplicate of the same concentrations were analyzed for 5 consecutive days ($n = 5$).

An antioxidant activity stability test was also performed. To perform the freeze–thaw cycle stability test, three aliquots ($n = 3$) at the low (0.005 µL/mL), medium (0.007 µL/mL) and high concentration (0.014 µL/mL) of the quality control samples were stored at –20 °C for 24 h and thawed at room temperature. When completely thawed, the samples were refrozen for 12 h under the same conditions. The freeze–thaw cycle was repeated twice more, and then the samples were analyzed on the third cycle. The antioxidant activities obtained were compared to the activity obtained with freshly prepared samples. The antioxidant activity stability of propolis extract was also evaluated in the receptor solution maintained at 37 °C for 24 h. For this determination the content of propolis extract present in 1 g of formulation (25 µL) was firstly solubilized in propylene glycol and then added to the receptor solution (12 mL) in the same conditions of the release study. An aliquot (600 µL) was withdrawn at specific times during 24 h. The antioxidant activity obtained from the different times were then compared to the first aliquot (time = 0). Student's *t*-test was applied, with the level of significance set at $p \leq 0.05$.

2.3.4. Determination of the antioxidant activity of propolis extract and of *p*-coumaric acid

The propolis extract was solubilized 1:10 in propylene glycol and then diluted in receptor solution rendering the final concentrations in the medium: 0.002, 0.005, 0.007, 0.009, 0.014, 0.019, 0.028, 0.037 and 0.075 µL/mL. *p*-Coumaric acid was diluted in methanol rendering the final concentrations in the medium: 0.375, 0.75, 1.5, and 3.0 µg/mL.

Table 1

Percent composition (w/w), of the emulsion media of the formulations

Component	F1 (%) ^a	F2 (%) ^b
Hostacerin® SAF ^c	6	–
Polawax® ^d	–	8
Isodecyl oleate	–	2
Isopropyl palmitate	–	1.5
Propylene glycol	5	5
Glycerol	–	3
Phenoxyethanol and parabens	0.5	0.5
Water	88.5	80

^a Lower fat content.

^b Higher fat content.

^c Self-emulsifying agent prepared without heating (ammonium acryloyl-dimethyl-taurate/VP copolymer + rapeseed oil sorbitol esters + trilaureth-4-phosphate + mineral oil + isopropyl palmitate).

^d Self-emulsifying wax (mineral oil + petrolatum + lanolin alcohol + fatty alcohol + ethoxilated fatty alcohol).

2.4. Formulations

Emulsions were developed using two different self-emulsifying agents, as it can be seen in Table 1. The developed formulations presented different fat material contents next (F1) which had the presence of hydrophilic colloid as emulsion stabilizing agent, presented lower fat content than F2. The preservative was a mixture of phenoxyethanol and parabens. Extract of propolis (2.5%, v/w) and preservatives were firstly solubilized in the propylene glycol amount and next incorporated to the formulations at room temperature. The formulations were allowed to equilibrate for 24 h at room temperature before carrying out the studies.

2.5. In vitro release studies from topical formulations containing propolis extract

The release experiments were performed using modified diffusion cells (Franz type) with 1.77 cm² diffusion area and a cellulose ester membrane HA (nitrate 75–80% and acetate—Millipore, Brazil) with pore size of 0.45 µm. Samples of 1 g of the formulations were placed on the membrane and the receptor compartment was filled with 12 mL of receptor solution: isotonic phosphate buffer 20 mM (pH 7.4) added of 0.5 % (v/v) of polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate in order to ensure “sink conditions”. Receptor solution was stirred by a rotating Teflon-coated magnet and were maintained at 37 °C by means of a circulating water bath with a jacket surrounding the cells.

Samples from the receptor solution (600 µL) were collected from the Franz cells in the following intervals: 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 24 h and the same volume of fresh receptor solution was replaced. The samples were stored until use at –20 °C. The amount of *p*-coumaric acid released in the receptor solution was assayed by HPLC using a calibration curve of standard *p*-coumaric acid. The antioxidant method was used to determine the inhibition (%) of light luminescence caused by the receptor solution. The inhibition (%) of light luminescence obtained was transformed in antioxidant activity as propolis

extract equivalent (AAPEE) $\mu\text{L/mL}$, using the regression equation obtained from the calibration curve built by plotting the concentrations of propolis extract against the inhibition (%) of each concentration. The blank vehicles without active agents served as references in the analytical measurements. Six modified diffusion cells were used in the experiments.

3. Results and discussion

Propolis extract has presented a very important antioxidant activity in several assays that we have performed in our laboratory. Its activity may be compared with other plant extracts and even with known isolated antioxidant compounds. As an example, in the inhibition of lipid peroxidation assay, it showed IC_{50} (concentration which caused 50% of inhibition of the system) of $0.016 \mu\text{L/mL}$, while *Glycyrrhiza glabra* showed $0.070 \mu\text{L/mL}$, *Ginkgo biloba* $0.05 \mu\text{L/mL}$ [16], Isoflavin Beta[®] $0.033 \mu\text{g/mL}$, Red clover $0.032 \mu\text{g/mL}$ (data not published), quercetin $0.34 \mu\text{g/mL}$ [17] and α -tocopherol $1 \mu\text{g/mL}$ [16]. Among these methods that we have performed, such as inhibition of lipid peroxidation and degradation of deoxyribose, scavenging of DPPH radical, inhibition of chemiluminescence using H_2O_2 /luminol/HRP, the inhibition of chemiluminescence using xanthine/luminol/XOD showed the best sensitivity and reproducibility [15]. So this method was chosen to evaluate the release study, since this study could request a method which is able to quantify a low quantity of antioxidant compounds.

3.1. Determination of *p*-coumaric acid by HPLC

p-Coumaric acid was chosen as a marker compound to be evaluated in propolis extract because it is a compound found in large amounts in Brazilian propolis collected in southeastern region [18].

The HPLC method developed here to perform the separation of *p*-coumaric acid, proved to be linear over the concentration range of $25\text{--}4000 \text{ ng/mL}$, with correlation coefficient, $r \geq 0.9995$. The precision and accuracy of the method were assessed for both within-day (10 spiked receptor solutions for each concentration on the same day) and between-day (5 spiked receptor solution for each concentration for 5 consecutive days) determinations. Table 2 shows the results achieved with two concentrations in the evaluation of the precision and accuracy of the method; neither R.S.D.s nor relative errors exceeded a value of 4.9%, in agreement with literature recommendations [13]. The lowest concentration quantified by the validated method (LOQs) was 25 ng/mL (Table 2). The method developed here proved to be selective since the receptor solutions of the blank formulations analyzed under the established chromatographic conditions did not show any interferences in the retention time of *p*-coumaric acid (Fig. 1C and E). The stability test showed no statistically significant difference between freeze–thaw cycles and short-term room temperature stability studies with *p*-value ≥ 0.11 .

Fig. 1A and B shows the chromatograms of the *p*-coumaric separation alone in receptor solution and in propolis extract.

Fig. 1. Chromatograms referring to the separation of *p*-coumaric acid (1). (A) Receptor solution spiked with *p*-coumaric acid, (B) propolis extract diluted 1:1000 in methanol, (C) receptor solution from the blank of formulation 1, (D) receptor solution of formulation 1 after 6 h of release, (E) receptor solution from the blank of formulation 2, (F) receptor solution of formulation 2 after 6 h of release.

Table 2
Precision and accuracy of *p*-coumaric acid evaluated in receptor solution

Concentration added (ng/mL)	Concentration found (ng/mL)	Accuracy ^a	Precision ^b
Within-day (<i>n</i> = 10) ^c			
25 ^d	26.1	4.73	4.90
75	75.1	0.14	3.38
4000	3900	−2.60	2.19
Between-day (<i>n</i> = 5) ^e			
75	73.8	4.25	−1.50
4000	3806	4.77	−4.83

^a Expressed as deviation from theoretical values.

^b Expressed as relative standard deviation.

^c Number of samples.

^d Quantification limit, *n* = 5.

^e Number of days.

It was found 0.82 mg of *p*-coumaric acid in 1 mL of propolis extract.

3.2. Determination of the antioxidant activity by chemiluminescence

As we have already pointed, the chemiluminescent method, due to its high sensitivity, rapidity and reproducibility was chosen for the evaluations of the antioxidant activity of propolis extract and of *p*-coumaric acid. The xanthine/luminol/XOD system emits luminescent light by oxidation of luminol, used as detector, by superoxide anions ($O_2^{\bullet-}$) generated in the following reaction:

The ability of a substance in scavenging superoxide anions lead to the inhibition of the luminescent light emission. The inhibition (%) of chemiluminescence versus the amount of propolis extract (μL) in the reaction medium is shown in Fig. 2A.

The method proved to be linear over the final medium concentration range of 0.005–0.014 μL/mL, with correlation coefficient, $r \geq 0.9675$. This correlation coefficient could be properly acceptable, since this method presents multi-stages which involve formation and scavenging of free radicals, besides the

Table 3
Precision of antioxidant activity of propolis extract evaluated in receptor solution

Concentration added in medium (μL/mL)	Inhibition found (%)	Precision ^a
Within-day (<i>n</i> = 10) ^b		
0.005 ^c	41.0	8.32
0.007	55.5	2.95
0.014	69.0	2.01
Between-day (<i>n</i> = 5) ^d		
0.005	43.4	7.22
0.007	54.5	5.4
0.014	70.8	3.47

^a Expressed as relative standard deviation.

^b Number of samples.

^c Quantification limit, *n* = 5.

^d Number of days.

presence of an enzyme. The precision was assessed for both within-day (10 replics of the receptor solutions for each concentration on the same day) and between-day (5 replics of each receptor solution for each concentration for 5 consecutive days) determinations. Table 3 shows the results achieved with three concentrations in the evaluation of the precision of the method; the R.S.D.s of the concentrations analyzed did not exceed a value of 8.3%, in agreement with literature recommendations [13]. The lowest concentration in the linear range quantified with R.S.D. lower than 20% (LOQs) was 0.005 μL/mL. The stability tests showed no statistically significant difference in the freeze–thaw cycles and in the antioxidant activity present in the receptor solution during 24 h with *p*-value ≥ 0.097 .

The ability of *p*-coumaric acid in scavenging superoxide anions was also evaluated. The inhibition (%) of chemiluminescence versus the amount of *p*-coumaric acid (μg) in the reaction medium is shown in Fig. 2B.

3.3. In vitro release studies from topical formulations containing propolis extract

The antioxidant defense in skin may be overwhelmed by external stimuli such as prolonged sun exposition [19], pollution and also by internal stimuli such as in the aging process. So free radicals are formed in excess and may lead to several

Fig. 2. (A) Inhibition of light emission from xanthine/luminol/XOD luminescent reaction by propolis extract. Results are mean $\pm$ S.E. of eight experiments run in parallel. (B) Inhibition of light emission from xanthine/luminol/XOD luminescent reaction by *p*-coumaric acid. Results are mean $\pm$ S.E. of three experiments run in parallel.

Fig. 3. Released *p*-coumaric acid (A) and AAPEE (B) amount from formulations 1 (■) and 2 (△), added with propolis extract.

damages. To prevent and treat skin damages, propolis extract may be used as a topical antioxidant in formulations. However, when a formulation containing propolis extract is developed, raises the necessity of being concerned with the release of this extract. In release studies the measure of drug release as a determination of bioavailability has been a subject of debate for many years. A consensus has been reached that an *in vitro* release test can serve as a valuable tool for initial screening of experimental formulations in the product development area and can serve to evaluate bioavailability [20]. Thus, a compound which is in large amount in the extract is usually used as marker. But as the antioxidant activity is the desired action, besides assaying a marker, it would be of very great interest, evaluating the antioxidant activity found in the receptor solution. So, the HPLC and the antioxidant validated methods were used to evaluate the release of propolis extract from formulations by assessing a marker (*p*-coumaric acid) and the antioxidant activity, respectively. The antioxidant activity as propolis extract equivalent was used to estimate the antioxidant activity found in the receptor solution.

Fig. 1D and F shows the chromatograms of the receptor solution of formulations 1 and 2, respectively. The release profiles of *p*-coumaric acid from both formulations are presented in Fig. 3A. It was found that after 6 h, 4.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of the *p*-coumaric acid was released from the formulation 1 (lower fat content), while 2.75 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ was released from formulation 2 (higher fat content), and this difference in the release was maintained in the following hours.

Fig. 3B shows the release profile of the AAPEE. It was found that both formulations released about 0.85 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ of AAPEE in

6 h, but formulation 1 released a higher amount of AAPEE in the following hours. This difference must be due to the fat content of the formulations. The results of the first 6 h suggest that in this period there was mainly a release of the less liposoluble compounds for both formulations. However, in the following hours, the most liposoluble compounds were probably released and the fat content of the formulations influenced the release profile. So F1, which has lower fat content, was able to release these compounds more easily. While for F2, which has higher fat content, presented more likeness to these compounds and prevented them to be released in the same way that F1.

The release data were plotted against square root of time for the determinations of the release rate from the profiles (Fig. 4). Table 4 summarizes the slopes representing the diffusion rates and also the released *p*-coumaric acid and AAPEE amounts after 12 h. The plots were linear as function of square root of time, indicating that the release follows Higuchi model.

From the release studies, it is apparent that *p*-coumaric acid and the AAPEE are better released from formulation 1 (lower fat content) than from formulation 2 (higher fat content). This behavior may be due to several influences, among them, the rheological parameters of the vehicle [21], the pH of the formulations and also due to the solubility of propolis extract in the formulations. Furthermore, knowing that *p*-coumaric acid as well as the antioxidant compounds of propolis extract must be phenolic compounds, these results are in accordance with Gete et al. [20], who concluded that a hydrophilic cream may function best in delivering flavonoids, which are phenolic compounds.

Fig. 4. Cumulative released *p*-coumaric acid (A) and AAPEE (B) through synthetic membrane from formulations 1 (■) and 2 (△), added with propolis extract.

Table 4

Comparison of the diffusion rates, correlation coefficients and the cumulative released *p*-coumaric and AAPEE amounts after 12 h

	<i>p</i> -Coumaric acid			AAPEE		
	Diffusion rate ^a	<i>r</i> ^b	<i>Q</i> ₁₂ (μg/cm ²) ^c	Diffusion rate ^a	<i>r</i> ^b	<i>Q</i> ₁₂ (μL/cm ²) ^d
F1	1.408	0.9895	5.68	0.413	0.9941	1.26
F2	1.012	0.9916	3.72	0.252	0.9502	1.00

^a Slope of the plots of amount of drug released against square root of time.^b Linear correlation coefficients.^c Amount of *p*-coumaric acid released in 12 h, assayed by HPLC.^d Amount of AAPEE released in 12 h, assayed by chemiluminescence.

Comparing the release profiles in both formulations, it can be concluded that *p*-coumaric acid was released more easily than the AAPEE. This is probably due to the difference in the solubility of *p*-coumaric acid and the propolis extract antioxidant compounds. The high release of *p*-coumaric acid, but low AAPEE release can be explained by the low antioxidant activity of *p*-coumaric acid compared to the propolis extract. Propolis extract showed IC₅₀ of 0.007 μL/mL while *p*-coumaric acid showed 1.78 μg/mL. It is also important to note that *p*-coumaric acid may suffer photoisomerization when exposed to light [12], which was observed by the HPLC determination (data not shown), however, the antioxidant activity was not lost. This finding suggests that the antioxidant activity method evaluates the activity which is present, even if a compound had suffered decomposition.

In addition, in order to prove that it was not the *p*-coumaric acid alone, the compound responsible for the antioxidant activity found in the receptor solution, we used the regression equation obtained by plotting the concentrations of *p*-coumaric acid against the inhibition (%) of each concentration, and we estimated the *p*-coumaric acid content that would be corresponding to the inhibitions found in the receptor solution during the release study. After 24 h of study, the receptor solution showed 73.1 and 64.9% of inhibition of chemiluminescence for F1 and F2, respectively. To these data, we compared the *p*-coumaric acid content determined by HPLC (Tables 5 and 6). Next, it

was observed after 24 h of release, that 1.24 and 0.77 μg/mL of *p*-coumaric acid were released and determined by HPLC for F1 and 2, respectively, while if it was the *p*-coumaric acid, the responsible for the antioxidant activity, the release would be 52.9 and 44.0 μg/mL for F1 and 2, respectively. With this comparison it became easy to observe that many other compounds must have been released and that the antioxidant method is able to determine the whole activity that is released from the formulation.

It is also important to note that the chemical composition of propolis is diversified from region to region even in the same country, as observed by Park et al. [18], the propolis from the southeastern region of Brazil has as majority compounds coumaric acid, pinobanksin and kaempferide, while the propolis from the southern has as majority compounds pinobanksin 3-acetate, chrysin, etc., and in the northeastern, none of these compounds are present. These data also suggest that an antioxidant method would be the most appropriate to evaluate propolis from different regions in order to establish quality parameters and profile of activity.

The results obtained with the antioxidant method show the real antioxidant activity released and which is able to penetrate into the skin. So, the evaluation of the antioxidant activity showed to be an important method to perform release studies of isolated compounds and mainly of extracts constituted for a mixture of antioxidant compounds.

Table 5

Comparison of the *p*-coumaric acid content released from F1 determined by HPLC and determined by its antioxidant activity

Release time, <i>T</i> (h)	Inhibition found for the receptor solution in the chemiluminescent assay (%)	Corresponding <i>p</i> -coumaric acid content (μg/mL) ^a	<i>p</i> -Coumaric content determined by HPLC (μg/mL)
2	38.2	14.4	0.41
4	45.4	22.2	0.58
6	55.1	33.1	0.68
8	56.8	34.9	0.75
10	63.2	42.1	0.80
12	67.7	47.0	0.84
24	73.1	52.9	1.24

^a The inhibition found in the receptor solution was estimated as of *p*-coumaric acid content by using the regression equation obtained by plotting the concentration of *p*-coumaric acid against the inhibition (%) of each concentration.

Table 6

Comparison of the *p*-coumaric acid content released from F2 determined by HPLC and determined by its antioxidant activity

Release time, <i>T</i> (h)	Inhibition found in the chemiluminescent assay (%)	Corresponding <i>p</i> -coumaric acid content (μg/mL) ^a	<i>p</i> -Coumaric content determined by HPLC (μg/mL)
2	40.0	16.4	0.25
4	45.0	21.9	0.32
6	55.7	33.8	0.40
8	51.5	29.2	0.43
10	52.6	30.4	0.53
12	57.0	35.3	0.55
24	64.9	44.0	0.77

^a The inhibition found in the receptor solution was estimated as of *p*-coumaric acid content by using the regression equation obtained by plotting the concentration of *p*-coumaric acid against the inhibition (%) of each concentration.

4. Conclusion

As propolis extract is known for its great antioxidant activity, the use of this extract added to topical formulations to prevent and treat skin diseases is justified. During formulation development and the release studies, besides evaluating a marker compound such as *p*-coumaric acid, we showed that the antioxidant activity may also be suitably evaluated. The results obtained with both analyses are more conclusive because the antioxidant activity desired is not only based in one marker compound, but it is the result of the synergic action of several compounds present in the extract.

Acknowledgments

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support and for granting a research fellowship.

References

- [1] A. Kujumgiev, I. Tsvetkova, Y. Serkedjieva, V. Bankova, R. Chistov, S. Popov, *J. Ethnopharmacol.* 64 (1999) 235–240.
- [2] C. Pascual, R. Gonzalez, R.G. Torricella, *J. Ethnopharmacol.* 41 (1994) 9–13.
- [3] L.M.C. Simões, L.E. Gregório, A.A. Da Silva Filho, M.L. de Souza, A.E.C.S. Azzolini, J.K. Bastos, Y.M. Lucisano-Valim, *J. Ethnopharmacol.* 94 (2004) 59–65.
- [4] M.I. Isla, M.I. Nieva Moreno, A.R. Sampietro, M.A. Vanttuone, *J. Ethnopharmacol.* 76 (2001) 165–170.
- [5] T. Nagai, R. Inoue, H. Inoue, N. Suzuki, *Food Chem.* 80 (2003) 29–33.
- [6] A.H. Banskota, Y. Tezuka, I.K. Adnyana, K. Midorikawa, K. Matsushige, D. Message, A.A.G. Huertas, S. Kadota, *J. Ethnopharmacol.* 72 (2000) 239–246.
- [7] J.W. Dobrowolski, S.B. Vohora, K. Sharma, S. Shah, S.A.H. Naqvi, P.C. Dandiya, *J. Ethnopharmacol.* 35 (1991) 77–82.
- [8] F. Borrelli, P. Maffia, L. Pinto, A. Ianaro, A. Russo, F. Capasso, A. Ialenti, *Fitoterapia Suppl.* 73 (2002) S53–S63.
- [9] N.D. Ivanoska, V.B. Dimov, V.S. Bankova, S.S. Popov, *J. Ethnopharmacol.* 47 (1995) 145–147.
- [10] S.R. Pinnell, M.D. Durban, *J. Am. Acad. Dermatol.* 48 (2003) 1–19.
- [11] A. Russo, V. Cardile, F. Sanchez, N. Troncoso, A. Vanella, J.A. Garbarion, *Life Sci.* 76 (2004) 545–558.
- [12] K. Takeshita, N. Hirota, M. Terazima, *J. Photochem. Photobiol. A* 134 (2000) 103–109.
- [13] A. Femenía-Font, V. Merino, V. Rodilla, A. López-Castellano, *J. Pharm. Biomed.* 37 (2005) 621–626.
- [14] S. Girotti, F. Fini, E. Ferri, R. Budini, S. Piazza, D. Cantagalli, *Talanta* 51 (2000) 685–692.
- [15] F.D. Marquede, V.M. Di Mambro, S.R. Georgetti, R. Casagrande, Y.M.L. Valim, M.J.V. Fonseca, *J. Pharm. Biomed.* 39 (2005) 455–462.
- [16] V.M. Di Mambro, M.J.V. Fonseca, *J. Pharm. Biomed.* 37 (2005) 287–295.
- [17] R. Casagrande, S.R. Georgetti, W.A. Verri Jr., J.R. Jabor, A.C. Santos, M.J.V. Fonseca, *AAPS Pharm. Sci. Technol.*, in press.
- [18] Y.K. Park, S.M. Alencar, C.L. Aguiar, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 2502–2506.
- [19] J. Fuchs, M.E. Huflejt, L.M. Rothfuss, D.S. Wilson, G. Carcamo, L. Packer, *J. Invest. Dermatol.* 93 (1989) 769–773.
- [20] M. Gete, T. Gebre-Mariam, R. Retz, R.H.H. Neubert, *Pharmazie* 57 (2002) 320–322.
- [21] I. Csóka, E. Csányi, G. Zapantis, E. Nagy, A. Fehér-Kiss, G. Horváth, G. Blazsó, I. Eros, *Int. J. Pharm.* 291 (2005) 11–19.