UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO
PRETO

**Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato de própolis
verde: estudos de estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea**

Yris Maria Fonseca

RIBEIRÃO PRETO
2007

Yris Maria Fonseca

Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato de própolis verde: estudos de estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea

Dissertação de mestrado, apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: 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

Fonseca, Yris Maria

Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato de
própolis verde: estudos de estabilidade, liberação, permeação e retenção
cutânea.

Ribeirão Preto, 2007.

169 p.: il. ; 30cm

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP. Área de concentração:
Medicamentos e cosméticos.

Orientador: Fonseca, Maria José Vieira.

1. Antioxidante. 2. Própolis verde. 3. Radicais livres. 4. Estabilidade. 5.
Formulação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Yris Maria Fonseca

Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato de própolis verde: estudos de estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea

Dissertação de mestrado, apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico esta dissertação a meus pais, José Augusto e Helena, que sempre confiaram em mim, apoiaram meus sonhos e deram toda base e força para enfrentar os desafios da vida!

Agradecimientos

Primeiramente, agradeço a Deus, que me deu a vida e a possibilidade de viver tudo aquilo que vivo hoje;

À professora Maria José Vieira Fonseca, pela preciosa amizade, apoio e incentivo. E ainda, pelos seus ensinamentos acadêmicos;

Aos colegas de pós-graduação, em especial a Fabiana, Sandra e Helaine, pelo convívio e colaboração;

A Franciane, pela sincera amizade e pela prontidão em ajudar;

Aos estagiários e colegas do laboratório, em especial a Viviane, Carla e Willian, pela imprescindível cooperação e amizade;

A todos meus amigos da pós-graduação, em especial a Kauê, Maria Fernanda, Bianca e Mônica, pela amizade e momentos de descontração;

Aos técnicos Jabor e Cenzi pela colaboração e constante auxílio para realização deste trabalho;

Aos professores Yára Maria Lucisano-Valim, Pedro Alves da Rocha Filho e Osvaldo de Freitas, por disponibilizar alguns equipamentos utilizados na realização deste trabalho;

Aos amigos, Lilian e Fabrício pela amizade sincera, apoio e incentivo durante esta caminhada;

À minha família, meus irmãos Yára, Yonara e Rafael, meus cunhados Paulo e Marina, meus sobrinhos Lucas, Lara, Lilian e Rafael, e em especial, a meus pais José Augusto e Helena, pela compreensão, apoio e incentivo durante todos estes anos em Ribeirão Preto;

Ao Conselho nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro concedido;

A todos aqueles que de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho;

Muito Obrigada!

"É na experiência da vida que
o homem evolui"
(Harvey Spencer Lewis)

Resumo

Resumo

FONSECA, Y. M. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato de própolis verde: estudos de estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea.** 2007. 169p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Tem sido reportado que os danos UV induzidos são devidos principalmente pela geração de EROs. Assim, compostos capazes de inibir a ação e a formação destas EROs, serão capazes de proteger a pele dos danos UV induzidos. Devido suas propriedades, a própolis pode ser aplicada como antioxidante tópico para prevenir e/ou tratar os danos UV induzidos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o conteúdo de flavonóides e polifenóis e a atividade antioxidante, em diferentes sistemas “in vitro”, dos extratos fluido e seco de própolis brasileira verde. Em adição, formulações tópicas adicionadas com extrato fluido de própolis verde foram desenvolvidas e sua estabilidade física e funcional foi avaliada. Foram também avaliadas a capacidade de liberação, permeação e retenção dos compostos antioxidantes destas formulações. O conteúdo de flavonóides e polifenóis encontrado para ambos extratos foi de 2,29 mg/g e 18 mg/g, respectivamente. Foi observado que o extrato de própolis verde apresentou a mesma quantidade de polifenóis que outros extratos de própolis já estudados, entretanto apresentou menor quantidade de flavonóides. Este extrato demonstrou ainda, atividade antioxidante de forma dose dependente contra diferentes radicais, tais como DPPH[•], superóxido (O²⁻), hidroxila (OH[•]), peroxila (LOO[•]) e alkoxila (LO[•]). E ainda, as formulações desenvolvidas foram estáveis fisicamente e funcionalmente. A F 01 foi capaz de liberar seus compostos antioxidantes mais eficazmente que as outras formulações

desenvolvidas. Entretanto, somente a F 03 reteve seus compostos antioxidantes na epiderme viável. Estes resultados dão boas perspectivas para aplicar o extrato de própolis verde topicamente para prevenir e/ou tratar os danos UV induzidos na pele. Em adição, pode ser sugerido que F 03 pode ser aplicada topicamente para prevenir e/ou tratar o estresse oxidativo UV induzido na pele com probabilidade de sucesso.

Palavras chave: antioxidante, própolis, formulação, estabilidade, liberação, permeação e retenção.

Abstract

Abstract

FONSECA, Y. M. **Development of topical formulations containing green propolis extract: stability, release, permeation and retention studies.** 2007. 169p. Dissertation (Master) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

It has been reported that UV- induced damage is due mainly to the generation of ROS. Then, compounds able to inhibit the action and the formation of these ROS, will be able to protect the skin from UV-induced damage. Due to their properties, propolis can be applied as topical antioxidants to prevent and/or treat UV-induced damages. Thus, the purpose of this work was to evaluate the polyphenol and flavonoid contents and the antioxidant activity, in different “*in vitro*” systems, of the Brazilian green propolis fluid and dry extracts. In addition, topical formulations added with green propolis fluid extract were developed and their physical-chemical and functional stabilities were assessed. It was also evaluated the release, permeation and skin retention capacity of the antioxidant compounds from these formulations. The flavonoid and polyphenols contents found for both extracts were 2.29 mg/g and 18 mg/g, respectively. It was observed that green propolis extract showed the same amount of polyphenols as other propolis extracts which has already been studied, however showed lower amounts of flavonoids. This extract also showed antioxidant activity in a dose dependent manner against different radicals, such as DPPH[•], superoxide (O²⁻), hydroxyl (OH[•]), alkoxyl (LO[•]) and peroxy radicals. Furthermore, the formulations developed were physically and functionally stable. F 01 was able to release its antioxidant compounds in more efficient way than the other developed formulations. However, only F 03 retained its antioxidant

compounds on viable epidermis. These results give good perspectives to apply green propolis extract topically in order to prevent and/or treat UV-damaged skin. In addition, it may be suggested that F 03 could be topically applied to prevent and/or treat UV- induced oxidative stress on skin with probability of success.

Key words: antioxidant, propolis, formulation, stability, release, permeation e retention.

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura líquido cristalina em fase lamelar.....	44
Figura 2: Estrutura líquido cristalina em fase hexagonal e fase hexagonal inversa.....	45
Figura 3: Camadas da pele e seus apêndices.....	46
Figura 4: Mecanismos de penetração na pele.....	48
Figura 5: Célula de difusão de Franz.....	71
Figura 6: Formação do complexo flavonóide-Al.....	79
Figura 7: Teor de flavonóides totais no extrato fluido (EF) e seco de própolis verde, após solubilização por diferentes solventes.....	80
Figura 8: Teor de polifenóis totais no extrato fluido e seco de própolis verde, após solubilização por diferentes solventes.....	82
Figura 9: Curva da medida da atividade doadora de H^+ ao radical DPPH $^{\bullet}$ para extrato fluido e seco de própolis verde, após solubilização por diferentes solventes.....	83
Figura 10: Espectro de absorção na região UV encontrado para extrato fluido de própolis verde.....	87
Figura 11: Curva de inibição da emissão da luz da reação luminescente xantina/luminol/XOD encontrada para extrato fluido e seco de própolis verde.....	89
Figura 12: Representação esquemática da estrutura química de um flavonóide.....	90
Figura 13: Linearidade encontrada na determinação da atividade sequestradora do radical superóxido gerado pelo sistema xantina/luminol/XOD.....	92
Figura 14: Curva de inibição da emissão da luz da reação luminescente H_2O_2 /luminol/HRP encontrada para extrato fluido e seco de própolis verde.....	95
Figura 15: Linearidade encontrada na determinação da atividade sequestradora dos radicais gerados pelo sistema H_2O_2 /luminol/HRP.....	97
Figura 16: Representação esquemática da reação de Fenton.....	98
Figura 17: Curva de inibição da peroxidação lipídica encontrada para extrato fluido de própolis verde.....	99
Figura 18: Linearidade encontrada na determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica pelo extrato fluido de própolis verde.....	101
Figura 19: Curva da atividade sequestradora de radicais hidroxilas encontrada para extrato fluido e seco de própolis verde.....	103

Figura 20: Linearidade encontrada na determinação da atividade sequestradora de radicais hidroxilas.....	105
Figura 21: Perda de água das emulsões desenvolvidas.....	112
Figura 22: Área das gotículas das emulsões desenvolvidas, determinada microscopicamente.....	116
Figura 23: Tamanho das gotículas, determinado pelo coulter DELSA 440SX.....	117
Figura 24: Estudo microscópico com luz polarizada da F 01 em aumento de 400x.....	118
Figura 25: Microscopia de luz polarizada da F 02 em aumento de 200x.....	119
Figura 26: Medidas de pH das formulações armazenadas em diferentes temperaturas.....	122
Figura 27: Porcentagem de inibição da emissão da luz da reação luminescente xantina/luminol/XOD com luminol encontrada pelas formulações e EF não veiculado....	124
Figura 28: Atividade doadora de H^+ ao radical DPPH $^{\bullet}$ pela formulação F 03 e EF não veiculado.....	124
Figura 29: Porcentagem de inibição da emissão da luz da reação luminescente xantina/luminol/XOD encontrada pelas formulações F 01, F 02 e EF não veiculado armazenados em diferentes condições de armazenamento.....	127
Figura 30: Porcentagem de redução de radicais DPPH $^{\bullet}$ encontrada pela formulação F 03 e EF não veiculado armazenados em diferentes condições de armazenamento.....	128
Figura 31: Porcentagem de inibição da emissão da luz da reação luminescente xantina/luminol/XOD encontrada pelas amostras A e B e EF no estudo de “sink conditions”.....	130
Figura 32: Perfil de liberação dos compostos antioxidantes presentes nas formulações F 01, F 02 e F 03.....	132

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição das formulações.....	66
Tabela 2: Precisão do método de determinação da medida da atividade doadora de H ⁺ ao radical DPPH [•] , no extrato fluido e seco de própolis verde, após solubilização por diferentes solventes.....	86
Tabela 3: Precisão do método de determinação da atividade antioxidante pelo sistema xantina/luminol/XOD no extrato fluido e seco de própolis verde.....	91
Tabela 4: Limite de quantificação do método de determinação da atividade antioxidante pelo sistema xantina/luminol/XOD no extrato fluido e seco de própolis verde.....	93
Tabela 5: Precisão do método de determinação da atividade antioxidante pelo sistema H ₂ O ₂ /luminol/HRP no extrato fluido e seco de própolis verde.....	96
Tabela 6: Precisão do método de determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica no extrato fluido de própolis verde.....	101
Tabela 7: Precisão do método de determinação da atividade sequestradora de radical hidroxila no extrato fluido e seco de própolis verde.....	104
Tabela 8: Medida do pH das emulsões armazenadas em diferentes condições.....	120
Tabela 9: Comparação da quantidade equivalente a EF liberada após 6 horas e coeficientes de correlação.....	133
Tabela 10: Recuperação do método de extração dos componentes do extrato de própolis, responsáveis pela atividade antioxidante, retidos em pele de orelha de porco.....	136
Tabela 11: Retenção dos compostos antioxidantes em pele de orelha de porco da formulação F 03 e EF.....	139

Lista de Abreviaturas

ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

CAPE = caffeic acid phenethyl ester.

COX = ciclooxigenase.

D = coeficiente de difusão.

DP = desvio padrão.

DPPH[•] = 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.

DPR = desvio padrão relativo.

EAP = extrato aplicado na pele.

EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid.

EF = extrato fluido de própolis verde.

EGTA = ethylene glycol tetraacetic acid.

EPM = erro padrão da média.

ERos = espécies reativas de oxigênio.

ESE = extrato sem processo de extração, apenas diluído.

ESP = extrato sem aplicação na pele, apenas passou por método de extração.

F 01 = formulação 01.

F 02 = formulação 02.

F 03 = formulação 03.

FDA = Food Drug Administration

HRP = horseradish peroxidase.

IC₅₀ = concentração inibitória 50%

INF- γ = interferon gama.

MDA = malondialdeído.

NF- κ B = fator nuclear kappa B.

P 01 = placebo 01.

P 02 = placebo 02.

P 03 = placebo 03.

PA = para análise

pH = potencial hidrogeniônico.

PVC = poli cloreto de vinila.

Q₆ = quantidade equivalente a EF liberada após 6 horas.

r = coeficiente de correlação.

rpm = rotações por minuto.

RUV = radiação ultravioleta.

SHA 50% = solução hidroalcoólica 50%.

SHA 80% = solução hidroalcoólica 80%.

SHA 95% = álcool etílico 95% PA.

SP = propilenoglicol.

TBA = ácido tiobarbitúrico.

TBARS = espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico.

TNF- α = fator de necrose tumoral alfa.

UR = umidade relativa.

UV = ultravioleta.

UVA = radiação ultravioleta A.

UVB = radiação ultravioleta B.

XOD = xantina oxidase.

Sumário

1. Introdução e revisão da literatura.....	32
1.1. A radiação solar e os danos causados à pele.....	32
1.2. Os radicais livres contribuem para o câncer e envelhecimento da pele.....	33
1.3. Os antioxidantes naturais e a inibição dos danos causados pela RUV.....	34
1.4. A própolis verde e suas propriedades.....	35
1.5. Estabilidade de formulações cosméticas.....	37
1.5.1. Testes físico-químicos e a estabilidade das formulações.....	41
1.6. Estudo de liberação, permeação e retenção cutânea.....	45
2. Objetivos.....	53
2.1. Objetivo geral.....	53
2.2. Objetivos específicos.....	53
3. Material e métodos.....	56
3.1. Material.....	56
3.1.1. Reagentes.....	56
3.1.2. Equipamentos e acessórios.....	56
3.1.3. Matéria-prima.....	57
3.2. Métodos.....	57
3.2.1. Escolha do melhor solvente para solubilizar o extrato seco de própolis verde sem perda da atividade antioxidante e caracterização físico-química dos extratos.....	57
3.2.1.1. Determinação do teor de flavonóides.....	58
3.2.1.2. Determinação do teor de polifenóis.....	59
3.2.1.3. Medida da atividade doadora de H^+ ao radical DPPH $^{\bullet}$	59
3.2.1.4. Espectro de absorção e absorvância específica.....	59
3.2.2. Avaliação da atividade antioxidante do extrato de própolis verde.....	60

3.2.2.1. Atividade sequestradora do radical superóxido gerado no sistema xantina/luminol/XOD por quimioluminescência.....	60
3.2.2.2. Atividade sequestradora dos radicais gerados no sistema H ₂ O ₂ /luminol/HRP por quimioluminescência.....	61
3.2.2.3. Atividade inibidora da peroxidação lipídica.....	62
3.2.2.3.1. Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato.....	63
3.2.2.4. Atividade sequestradora do radical hidroxila	64
3.2.2.5. Validação das metodologias para determinação da atividade antioxidante.....	65
3.2.3. Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato fluido de própolis verde.....	65
3.2.3.1. Estudo de estabilidade.....	66
3.2.3.1.1. Estabilidade física.....	67
3.2.3.1.1.1. Características Organolépticas.....	67
3.2.3.1.1.2. Perda de água.....	67
3.2.3.1.1.3. Teste de centrifugação.....	68
3.2.3.1.1.4. Tamanho das gotículas.....	68
3.2.3.1.1.5. Análise microscópica.....	68
3.2.3.1.1.6. Avaliação do pH.....	69
3.2.3.1.2. Estabilidade da atividade antioxidante das emulsões.....	69
3.2.3.1.2.1. Avaliação da interferência dos constituintes das formulações na atividade antioxidante.....	70
3.2.3.2. Estudo de liberação, permeação e retenção.....	70
3.2.3.2.1. Estudo de “Sink Conditions” para a avaliação da atividade antioxidante nos estudos de liberação, permeação e retenção cutânea.....	72

3.2.3.2.2. Estudo de liberação in vitro de formulações tópicas adicionadas de extrato de própolis.....	73
3.2.3.2.3. Estudo de permeação e retenção “in vitro” das formulações tópicas adicionadas de extrato de própolis.....	74
3.2.3.2.3.1. Permeação.....	74
3.2.3.2.3.2. Estudo da recuperação do método de retenção cutânea.....	75
3.2.3.2.3.3. Retenção.....	75
3.3. Análise estatística dos resultados.....	76
4. Resultados.....	79
4.1. Escolha do melhor solvente para solubilizar o extrato seco de própolis verde sem perda da atividade antioxidante e caracterização físico-química dos extratos.....	79
4.1.1. Determinação do teor de flavonóides.....	79
4.1.2. Determinação do teor de polifenóis.....	81
4.1.3. Medida da atividade doadora de H^+ ao radical DPPH $^{\bullet}$	83
4.1.3.1. Validação da medida da atividade doadora de H^+ ao radical DPPH $^{\bullet}$	85
4.1.4. Espectro de absorção e Absorvância específica.....	86
4.2. Avaliação da atividade antioxidante do extrato de própolis verde.....	87
4.2.1 Atividade sequestradora do radical superóxido gerado no sistema xantina/luminol/XOD por quimioluminescência.....	87
4.2.1.1. Validação da atividade sequestradora do radical superóxido gerado no sistema xantina/luminol/XOD por quimioluminescência.....	91
4.2.2. Atividade sequestradora dos radicais gerados no sistema H_2O_2 /luminol/HRP por quimioluminescência.....	93
4.2.2.1. Validação da atividade sequestradora dos radicais gerados no sistema H_2O_2 /luminol/HRP por quimioluminescência.....	95

4.2.3. Atividade inibidora da peroxidação lipídica.....	97
4.2.3.1. Validação da atividade inibidora da peroxidação lipídica.....	100
4.2.4. Atividade sequestradora do radical hidroxila.....	102
4.2.4.1. Validação da atividade sequestradora do radical hidroxila.....	103
4.3. Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato fluido de própolis verde.....	105
4.3.1. Estudo de estabilidade.....	109
4.3.1.1. Estabilidade física.....	109
4.3.1.1.1. Características Organolépticas.....	109
4.3.1.1.2. Perda de água.....	110
4.3.1.1.3. Teste de centrifugação.....	113
4.3.1.1.4. Tamanho das gotículas.....	113
4.3.1.1.5. Análise microscópica.....	118
4.3.1.1.6. Avaliação do pH.....	120
4.3.1.2. Estabilidade da atividade antioxidante das emulsões.....	123
4.3.1.2.1. Avaliação da interferência dos constituintes das formulações na atividade antioxidante.....	123
4.3.1.2.2. Estabilidade antioxidante das formulações.....	125
4.3.2. Estudo de Liberação, Permeação e Retenção.....	129
4.3.2.1. Estudo de “Sink Conditions”.....	129
4.3.2.2. Estudo de liberação in vitro de formulações tópicas adicionadas de extrato de própolis.....	130
4.3.2.3. Estudo de permeação e retenção “in vitro” de formulações tópicas adicionadas de extrato de própolis.....	134
4.3.2.3.1. Estudo da recuperação do método de retenção cutânea.....	135

4.3.2.3.2. Permeação e retenção.....	137
5. Conclusão.....	142
Referências bibliográficas.....	145
Apêndice.....	159

Introdução e revisão da literatura

1. Introdução e revisão da literatura

1.1. A radiação solar e os danos causados à pele

Um dos problemas ambientais de maior preocupação é a destruição da camada de ozônio. Sem essa camada a incidência de raios solares indesejáveis sobre a Terra aumenta, com o conseqüente aumento dos seus efeitos danosos. Assim, tem crescido muito a procura por substâncias capazes de proteger a pele contra a radiação ultravioleta (RUV) de forma eficaz.

Estima-se que no Brasil apareça cerca de 70 mil novos casos de câncer por ano. Segundo o INCA (Instituto Nacional do Câncer), o câncer de pele é o tipo mais freqüente, correspondendo à cerca de 25% de todos os tumores malignos registrados no Brasil. Isso porque a principal causa desses tumores, além da predisposição genética, é a exposição ao sol.

A fotolesão da pele refere-se às alterações do tecido cutâneo causadas pela exposição aguda ou crônica à RUV (PAGNONI, 2003). Os raios ultravioleta (UV) atingem a Terra numa proporção de apenas 5%, mas são os maiores responsáveis pelos efeitos nocivos nos indivíduos. Tais efeitos incluem a curto e médio prazo perda de água e ressecamento da pele, provocando aspecto opaco, perda da elasticidade, eritema, descamação e aparecimento de manchas. Podem ocorrer queimaduras solares de diferentes graus, induzidas pela radiação ultravioleta B (UVB), sendo que a queimadura crônica pode resultar em câncer em fases mais avançadas da vida. Pode ocorrer ainda, fotoimunossupressão, que é uma conseqüência dos efeitos das radiações UVB sobre as defesas imunitárias do organismo. Em indivíduos predispostos pode ocorrer fotossensibilidade, fototoxicidade e fotoalergia. Em longo prazo as RUV levam ao fotoenvelhecimento, elastose, danos oculares e câncer de pele (OLIVEIRA et al., 2004).

1.2. Os radicais livres contribuem para o câncer e envelhecimento da pele

As respostas da pele à radiação ultravioleta são dependentes de muitas variáveis, incluindo comprimento de onda, dose e características da pele, e variam de inflamação moderada e eritema à hiperplasia, queimaduras, envelhecimento e malignidades cutâneas. A susceptibilidade genética é um importante determinante das respostas à RUV (HECK et al., 2004).

O processo de fotoenvelhecimento da pele está relacionado à formação de radicais livres. No momento em que as radiações solares penetram na pele, são absorvidas por substâncias ali encontradas, denominadas cromóforas. O processo de dissipação dessa energia absorvida leva a produção de radicais livres. Estes radicais livres se ligam a células sadias da pele, provocando ruptura ou alterações das suas rotas metabólicas (OLIVEIRA et al., 2004).

Os cromóforos da pele (DNA, porfirinas, ácido urônico e aminoácidos aromáticos) iniciam uma reação fotoquímica que conduz à resposta inflamatória. As conseqüências destas reações resultam em eritema, edema, sensação ardente e dor. A exposição aguda da pele a RUV induz a síntese e liberação de eicosanóides (produtos derivados do ácido araquidônico), histamina, cininas, citocinas e outros fatores quimiotáticos, como também a expressão de moléculas de adesão na superfície da epiderme e células da derme. Todos estes mediadores ativam células endoteliais na derme, aumentam a permeabilidade vascular e promovem o acúmulo de células inflamatórias 12 a 14 horas depois do dano (TEDESCO et al., 1997).

Análises histoquímicas ou por microscopia eletrônica mostram que nos minutos ou nas horas que se seguem à exposição às RUV ocorrem mudanças no metabolismo celular, seguidas por mudanças celulares, após algumas horas, e alterações funcionais após um a dois dias (MASSON e SCOTTI, 2003).

Os efeitos fotobiológicos causados, em particular, pela radiação UVB são eritematogênicos e carcinogênicos, induzindo ao fotoenvelhecimento e danos direto ao DNA,

RNA, proteínas e outros componentes da célula. No entanto, a radiação ultravioleta A (UVA) também apresenta um papel importante na indução de eritema através da geração de espécies fotossensibilizadas de oxigênio reativo, como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) ou o superóxido (O_2^-) e radicais hidroxila ($\text{OH}^\cdot$) que danificam o DNA e membranas celulares, promovem carcinogênese e mudanças associadas com fotoenvelhecimento. (TEDESCO et al., 1997).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas continuamente nas células como consequência de reações bioquímicas oxidativas e fatores externos. Diante de condições anormais como inflamação, isquemia e na presença de íons ferro catalíticos, os antioxidantes endógenos (vitamina E, vitamina C, glutathione redutase, superóxido dismutase, etc.) podem ser incapazes de conter a formação de EROs. As espécies reativas de oxigênio formadas podem causar dano celular por peroxidação de lipídios de membrana e de proteínas, por desarranjo de DNA e inativação de enzimas. Este dano pode estar envolvido na etiologia de diversas doenças humanas, como doença coronariana, inflamação, doenças neurodegenerativas, câncer e intoxicação por álcool (RUSSO et al., 2002).

O processo de desenvolvimento de câncer de pele envolve estimulação da síntese de DNA, dano ao DNA, inflamação, imunossupressão, hiperplasia epidermal, desregulação do ciclo celular, depleção das defesas antioxidantes, indução de ciclooxigenases, aumento na síntese de prostaglandinas, e indução de ornitina descarboxilase (AFAQ et al., 2005).

1.3. Os antioxidantes naturais e a inibição dos danos causados pela RUV

Os danos causados pela radiação solar parecem ser causados principalmente pela geração de radicais livres e liberação de mediadores do processo inflamatório. Conseqüentemente, substâncias capazes de inibir a ação ou geração destes radicais livres e a

liberação de mediadores do processo inflamatório são capazes de gerar fotoproteção da pele evitando ou minimizando os danos causados pela radiação solar.

A fotoquimioprevenção tem sido apreciada como um viável modo de reduzir a ocorrência de câncer de pele. Nos últimos anos, o uso de agentes, especialmente antioxidantes botânicos, presentes na dieta comum e bebidas consumidas pela população, tem ganhado considerável atenção como agentes fotoquimiopreventivos para uso humano. Muitos destes agentes também têm encontrado um lugar nos produtos de cuidado para pele (AFAQ et al., 2005).

Têm-se sugerido uma ampla variedade de compostos que podem atuar como antioxidantes “*in vivo*”, os quais demonstram ser agentes quimiopreventivos dos danos da RUV, tais como a vitamina E, ácido ascórbico, β -caroteno, licopeno, compostos fenólicos, como epigallocatequina galato presente no chá verde, retinóides, genisteína, quercetina (HALLIWELL et al., 1995; OFFORD et al., 2002; WRIGHT, SPENCER e FLOWERS, 2006; FREI e HIGDON, 2003; CASAGRANDE et al., 2006), dentre outros.

Substâncias com propriedades antioxidantes e antiinflamatórias têm sido alvo de pesquisas nos últimos anos. Além disso, a busca por princípios ativos de origem natural tem crescido cada vez mais, devido a sua eficácia e segurança relatadas.

1.4. A própolis verde e suas propriedades

A própolis é um dos poucos remédios naturais que tem mantido sua popularidade durante um longo período de tempo (CASTALDO e CAPASSO, 2002). Trata-se de uma resina utilizada pelas abelhas para proteção da colméia, que apresenta diversas propriedades farmacológicas já descritas e que vem sendo amplamente estudada.

Dobrowolski e colaboradores (1991) descreveram a atividade antibacteriana, antifúngica e antiinflamatória da própolis. Pascual e colaboradores (1994) revelaram a atividade seqüestradora de radicais hidroxila e radicais superóxido pelo extrato de própolis. Fitzpatrick e colaboradores (2001) estudaram a inibição pela própolis da produção de NF- κ B e TNF- α em cultura de células de macrófagos estimulados por PG-PS. Em 2002, Rossi e colaboradores relataram que a própolis é capaz de inibir a atividade da COX (ciclooxigenase) de forma dose dependente. Sá-Nunes e colaboradores (2003) estudaram a estimulação da produção de INF- γ pela própolis em células do baço. Hosnuter e colaboradores (2004) relatam que CAPE (caffeic acid phenethyl ester), um composto presente na própolis, foi capaz de inibir o estresse oxidativo do plasma de ratos. O extrato aquoso e alcoólico de própolis exibiram efeito antiinflamatório em modelos animais (HU et al., 2005). E ainda, Simões e colaboradores (2004) relataram a inibição pela própolis verde da produção de espécies de oxigênio reativo em cultura de neutrófilos estimulados.

A própolis brasileira é classificada em doze grupos, baseados nas características físico-químicas, sendo cinco no sul do Brasil, um no sudeste e seis no nordeste (PARK et al., 2004). A origem botânica da própolis do grupo 12 é a *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo) sendo este tipo de própolis denominada popularmente como própolis verde.

A própolis verde possui em sua composição ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, pinobanksina, canferol, kaempferide, isosakuranetina, crisina, acacetina, artepelin C, entre outros compostos fenólicos. A artepelin C apresenta-se como seu constituinte majoritário representando cerca de 38,58 mg/g de própolis (PARK et al., 2004).

No Japão, a procura por própolis que contenha artepelin C é grande, uma vez que este composto tem despertado grande interesse por apresentar importantes propriedades biológicas (PAREDES-GUZMÁN et al, 2005).

Estudos sugerem que compostos fenólicos, como flavonóides e derivados de ácidos hidroxicinâmico, presentes na própolis, tenham significava contribuição na sua atividade antioxidante e antiinflamatória (RUSSO et al, 2002; HOSNUTER et al, 2004; DE CASTRO, 2001).

Uma possível ação benéfica da própolis verde sobre os danos causados pela RUV à pele pode estar relacionada aos constituintes fenólicos, uma vez que tais danos estão relacionados à geração de radicais livres e instalação de processo inflamatório.

Vários estudos da atividade farmacológica da própolis são descritos, porém são poucos os estudos direcionados a um grupo específico de própolis, tendo sua origem botânica e constituição definidas. Devido suas propriedades antioxidante e antiinflamatória, a própolis pode ser utilizada em formulações tópicas visando a prevenção ou o tratamento dos danos na pele causados pela radiação solar, como eritema, aparecimento de manchas, descamação, fotoenvelhecimento e câncer.

1.5. Estabilidade de formulações cosméticas

O uso de géis é bastante amplo. Os géis são utilizados em sistemas de liberação para administração oral, tópica, nas mucosas ou nos olhos e em injetáveis intramusculares ou implantes subcutâneos para liberação controlada. Cosmeticamente, os géis são empregados em uma grande variedade de produtos, incluindo xampus, fragrâncias, dentifrícios e preparações para cuidado da pele e cabelos (ZATZ e KUSHLA, 1996).

Uma formulação tipo gel instável, sob circunstâncias normais, exhibe algumas mudanças irreversíveis em suas propriedades reológicas, as quais causam a não aceitabilidade no seu uso final (ZATZ e KUSHLA, 1996).

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 (LACHMAN et al., 2001). Cremes aquosos e loções tendem a serem mais aceitáveis pelo paciente, pois são fáceis de aplicação e espalhamento na pele, e possuem efeito refrescante (SMITH; MALBACH; SURBER, 2000).

Emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis de dois líquidos imiscíveis. Devido a esta natureza dinâmica seus constituintes são afetados pela temperatura e tempo de armazenamento. A estrutura gel, que forma depois da manipulação para estabilizar a emulsão, pode enrijecer, contrair e encolher em temperaturas frias ou amolecer, expandir e fluidificar em altas temperaturas (KALLIOINEN et al., 1994). O mesmo pode acontecer em preparações do tipo gel.

Muitos fatores contribuem para desestabilização das formulações durante o processo de produção, transporte e armazenamento, inclusive os tipos de componentes presentes e o modo que a formulação foi produzida (MUN et al., 2006).

A estabilidade cinética de emulsões normalmente é aumentada usando emulsificantes, que são componentes que agem na interface óleo/água, facilitando a geração de pequenas gotículas durante homogeneização. Eles reduzem a tensão interfacial e melhoram a estabilidade da emulsão formando membranas protetoras ao redor das gotículas ou gerando forças repulsivas entre as gotículas (GU et al., 2005).

Predizer a estabilidade destes sistemas tão complexos é muitas vezes arriscado se apenas condições de estresse são avaliadas. Métodos rápidos para prever a estabilidade das formulações são usualmente baseados na avaliação de características físico-químicas (KALLIOINEN et al., 1994).

Segundo a IFSCC (International Federation of Societies of Cosmetic Chemists) o teste de estabilidade é considerado um procedimento preditivo, baseado em dados obtidos de

produtos armazenados em condições que visam acelerar alterações passíveis de ocorrer nas condições de mercado. Como em todo procedimento preditivo os resultados não são absolutos, mas têm probabilidade de sucesso.

O estudo da estabilidade de produtos cosméticos fornece informações que indicam o grau de estabilidade relativa de um produto nas várias condições a que possa estar sujeito desde sua fabricação até o término de sua validade. O estudo da estabilidade de produtos cosméticos contribui para:

- ✓ Orientar o desenvolvimento da formulação e do material de acondicionamento adequado;
- ✓ Fornecer subsídios para o aperfeiçoamento das formulações;
- ✓ Estimar o prazo de validade e fornecer informações para a sua confirmação;
- ✓ Auxiliar no monitoramento da estabilidade organoléptica, físico-química e microbiológica, produzindo informações sobre a confiabilidade e segurança dos produtos;

Antes de iniciar os estudos de estabilidade, recomenda-se submeter o produto (emulsão) ao teste de centrifugação. Sugere-se centrifugar uma amostra a 3.000 rpm durante 30 minutos. O teste de centrifugação produz estresse na amostra simulando um aumento na força de gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis instabilidades (BRASIL. ANVISA. RE nº 1, de 29 de julho de 2005). Segundo Schueller e Romanowski (1998) a desestabilização pode ser observada na forma de cremeação, separação de fases, floculação, coalescência, entre outras descritas a seguir:

- ✓ Na cremeação ou na sedimentação as gotículas tendem a separar-se da fase externa da emulsão, emergindo (cremeação) ou sedimentando-se (sedimentação) dependendo da diferença de densidade entre as duas fases. Estes processos podem ser revertidos após agitação;
- ✓ Na floculação ocorre agregação reversível das gotículas, sem coalescência. Também pode ser revertido após agitação;

✓ Na coalescência duas gotículas ou mais da fase dispersa aproximam-se e fundem-se para formar uma única gotícula maior. Este processo é irreversível e resultará em separação de fases da emulsão;

Segundo o guia de estabilidade de produtos cosméticos, publicado pela ANVISA em 2005, o produto deve permanecer estável e qualquer sinal de instabilidade indica a necessidade de reformulação. Se aprovado no teste de centrifugação, o produto pode ser submetido aos testes de estabilidade, os quais podem ser classificados em três tipos descritos a seguir:

✓ Estabilidade preliminar: este teste também é conhecido como teste de triagem ou de curto prazo, tem como objetivo auxiliar e orientar a escolha 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. Emprega 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. Este tipo de estudo de estabilidade foi o empregado no presente trabalho;

✓ Estabilidade acelerada: também conhecida como estabilidade normal ou exploratória tem como objetivo fornecer dados para prever a estabilidade do produto, tempo de vida útil e compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento. Este teste é empregado também na fase de desenvolvimento do produto utilizando-se lotes produzidos em escala laboratorial e piloto de fabricação, podendo estender-se às primeiras produções. Emprega geralmente condições menos extremas que o teste anterior. Serve como auxiliar para a determinação da estabilidade da formulação. Pode ser realizado, ainda, quando houver

mudanças significativas em ingredientes do produto e ou do processo de fabricação, em material e acondicionamento que entra em contato com o produto, ou para validar novos equipamentos ou fabricação por terceiros;

✓ Teste de prateleira: também conhecido como estabilidade de longa duração ou *Shelf life*, tem como objetivo validar os limites de estabilidade do produto e comprovar o prazo de validade estimada no teste de estabilidade acelerada. É um estudo realizado no período de tempo equivalente ao prazo de validade estimado durante os estudos de estabilidade relacionados anteriormente. É utilizado para avaliar o comportamento do produto em condições normais de armazenamento. A frequência das análises deve ser determinada conforme o produto, o número de lotes produzidos e o prazo de validade estimado. Recomendam-se avaliações periódicas até o término do prazo de validade e, se a intenção é ampliá-lo, pode-se continuar o acompanhamento do produto;

O prazo de validade é caracterizado como o período de vida útil, durante o qual o produto mantém suas características originais. Antes de ser um requisito legal, é, sobretudo, um requisito técnico de qualidade, pois um produto instável do ponto de vista físico-químico, microbiológico ou toxicológico, além da perda de eficácia poderá também causar algum dano e comprometer a confiabilidade frente ao consumidor (BRASIL. ANVISA. RE nº 1, de 29 de julho de 2005).

1.5.1. Testes físico-químicos e a estabilidade das formulações

As emulsões e géis são sistemas instáveis, as quais são altamente susceptíveis à desestabilização durante o processo de armazenamento e transporte. A desestabilização das emulsões pode acontecer através de uma variedade de mecanismos físico-químicos, incluindo separação gravitacional, floculação e coalescência (GU et al., 2005). O teste de centrifugação

fornece informações rápidas sobre a estabilidade das emulsões, pois se estabelece um aceleração dos mecanismos físico-químicos naturais que poderiam ocorrer como a força gravitacional.

Outro teste utilizado em ensaios de estabilidade é a avaliação das características organolépticas, que são características das substâncias e produtos referentes ao perfil sensorial identificado por: aspecto, cor, odor e sabor. As características organolépticas determinam os parâmetros de aceitação do produto pelo consumidor. Fornece parâmetros que permitem avaliar, de imediato, o estado em que se encontra sua amostra em estudo por meio de análises comparativas, com o objetivo de verificar alterações como: separação de fases, precipitação e turvação, permitindo o reconhecimento primário do produto. Deve-se utilizar uma amostra de referência, recentemente elaborada, ou uma amostra do produto, armazenada a temperatura adequada, para evitar modificações nas propriedades organolépticas (BRASIL. ANVISA. RE n° 1, de 29 de julho de 2005).

Alterações do pH também podem indicar modificações na estabilidade do produto. E ainda, alterações do tamanho mediano das partículas ou da distribuição de tamanho das gotículas são parâmetros importantes na avaliação da estabilidade. O rápido aumento no tamanho dos glóbulos indica baixa estabilidade.

A avaliação da estabilidade da atividade funcional, como a atividade antioxidante, das formulações desenvolvidas, pode trazer informações importantes sobre modificações ou perda desta atividade em função do tempo e das diferentes condições de armazenamento. A perda da atividade funcional implica diretamente na perda de eficácia do produto desenvolvido.

A microscopia de luz polarizada é adequada para detecção de cristais líquidos liotrópicos (exceto mesofase cúbica) porque os cristais líquidos demonstram birrefringência semelhante a um cristal real. A mesofase hexagonal pode ser reconhecida pela sua estrutura

típica de forma de leque. A mesofase lamelar demonstra tipicamente raias oleosas com inserção de cruz de malta (MÜLLER-GOYMANN, 2004).

O estado líquido cristalino combina propriedades de ambos os estados líquido e sólido, representa estados intermediários e são chamados de mesofases. Um pré-requisito para formação de fase líquido cristalina é uma forma molecular anisotrópica. Um fármaco por si só pode satisfazer o requerimento para formação de cristal líquido (sais de ácidos orgânicos e bases com forma molecular anisotrópica). A mesofase é alcançada por aumento da temperatura ou por adição de solventes, formando cristais líquidos termotrópicos ou liotrópicos. Como os cristais líquidos termotrópicos, variações na temperatura podem causar transformação de fase entre diferentes mesofases de cristais líquidos liotrópicos (CIOCA e CALVO, 1990; MÜLLER-GOYMANN, 2004).

Cristais líquidos liotrópicos originam-se de moléculas que podem formar mesofases, não as próprias moléculas, mas seus hidratos ou solvatos, bem como associados de hidratos ou moléculas solvatadas. A hidratação ou solvatação da maioria das moléculas na forma de bastão resultam em diferentes geometrias (cone ou cilíndrica) (MÜLLER-GOYMANN, 2004).

Os arranjos cilíndricos em camadas resultam em fase lamelar com camadas polar e apolar alternadas. Água e soluções aquosas de fármacos podem ser incluídas na camada polar, resultando em aumento da espessura da camada (figura 1).

Figura 1: Estrutura líquido cristalina em fase lamelar. Reproduzido de TIDDY, 1980.

Analogamente, moléculas com afinidade apropriada podem ser incluídas na camada não polar. Em adição, para aumentar a espessura da camada da fase lamelar, a inclusão lateral entre as moléculas é possível com aumento da concentração de solvente, o qual transforma a forma de bastão das moléculas solvatadas para forma de cone, levando a mudança de fase. Dependendo da polaridade do agente solvatante e da própria molécula, a transição resulta em fase hexagonal ou fase hexagonal inversa (figura 2) (TIDDY, 1980).

Com a troca geométrica molecular durante a solvatação, a forma cúbica e forma cúbica inversa são desenvolvidas, consistindo de micelas esféricas ou elipsoidais e/ou micelas inversas. Muitas mesofases liotrópicas são possíveis dependendo da concentração da molécula que forma a mesofase, da característica lipofílica ou hidrofílica do solvente e da própria molécula. Entretanto, nem todas as possíveis formas teóricas de mesofases podem ocorrer na prática (MÜLLER-GOYMANN, 2004; TIDDY, 1980).

Figura 2: Estrutura líquido cristalina em fase hexagonal (a) e fase hexagonal inversa (b). Reproduzido de TIDDY, 1980.

1.6. Estudo de liberação, permeação e retenção cutânea

O sucesso do desenvolvimento de formulações requer não somente otimização da atividade farmacológica, mas também a liberação eficiente para o sítio alvo (PAGLIARA et al., 1999). A popularidade da pele como sítio de liberação de fármacos tem sido exemplificado pelo aumento de produtos tópicos que estão disponíveis no mercado. Embora as formulações tópicas sejam comumente destinadas a liberar o fármaco localmente, atualmente tem-se utilizado esta via para liberação sistêmica de fármacos, a qual demonstra alguns benefícios biofarmacêuticos, como a eliminação do efeito de primeira passagem hepática (SMITH, MALBACH e SURBER, 2000; ABRAHAM, CHADHA e MITCHELL, 1995).

A principal função da pele é separar e proteger o interior do corpo do ambiente externo, além de receber estímulo sensorial, ajudar a regular a temperatura do corpo e excretar substâncias não desejadas. A pele também previne a entrada de microrganismos, substâncias químicas e várias formas de radiação, além de proteger os fluidos e tecidos corporais (BARRY, 2002).

Estruturalmente a pele possui uma série de camadas, há três grandes divisões: epiderme (estrato córneo e epiderme viável), derme e hipoderme (figura 3).

http://www.nurse-prescriber.co.uk/education/visual_lib/vl_skincondprep.htm, publicada

Figura 3: Camadas da pele e seus apêndices.

O estrato córneo funciona como uma proteção física e barreira química. É formado por uma camada compacta de células (corneócitos) alongadas, mortas e desidratadas, as quais 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. Entre estes corneócitos está presente a maioria do material lipídico na forma de lipídios neutros (ZATZ, 1993; BOUWSTRA et al., 2003).

O estrato córneo pode ser descrito como uma “parede de tijolos”, onde as células queratinizadas são embebidas em uma matriz lipídica, organizada em bicamadas e composta por ceramidas (45-50 %), colesterol (25 %), ácidos graxos (10-15 %) e uma pequena fração de lipídios (5 %) (MADISON, 2003). Cada corneócito do estrato córneo é envolto por um

envelope protéico. Sua superfície interior é ligada aos filamentos de queratina que preenchem os corneócitos, enquanto que a superfície externa é covalentemente ligada à uma camada de hidroxiceramidas denominada envelope lipídico (MADISON, 2003).

Dessa forma, a composição do estrato córneo e a disposição das células e lipídios no estrato córneo criam um caminho tortuoso e fazem dele uma importante barreira que controla a saída de compostos e água do organismo, assim como a entrada de compostos acidental ou deliberadamente na pele, representando assim, o principal obstáculo à penetração cutânea de fármacos (MADISON, 2003). 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 (BARRY, 2002; SMITH, MALBACH e SURBER, 2000).

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 de renovação celular é igual à taxa de desprendimento das células mais externas do estrato córneo. 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 (ZATZ, 1993; BARRY, 2002; SMITH, MALBACH e SURBER, 2000; BOUWSTRA et al., 2003).

A derme, localizada imediatamente sob a epiderme, é um tecido conjuntivo que contém fibras protéicas, vasos sanguíneos, terminações nervosas, órgãos sensoriais e glândulas. A derme é responsável pela maioria da força mecânica e das sensações da pele. As principais células da derme são os fibroblastos, responsáveis pela produção de fibras e de uma substância gelatinosa, a substância amorfa, na qual os elementos dérmicos estão mergulhados. Sob a pele, há uma camada de tecido conjuntivo frouxo, o tecido subcutâneo, rico em fibras e

em células que armazenam gordura (células adiposas ou adipócitos). A camada subcutânea, denominada hipoderme, atua como reserva energética, proteção contra choques mecânicos e isolante térmico. (ZATZ, 1993; BARRY, 2002; SMITH, MALBACH e SURBER, 2000).

Três mecanismos possíveis têm sido sugeridos para permeação de solutos através do estrato córneo (figura 4). O primeiro é através dos folículos pilosos e por glândulas sudoríparas, o segundo e terceiro são rotas inter e transcelulares (ABRAHAM, CHADHA, MITCHELL, 1995; BARRY, 1988). O caminho intercelular envolve a passagem somente pelos domínios lipídicos intercelulares, já o caminho transcelular atravessa as células e os espaços intercelulares (ZATZ, 1993).

Figura 4: Mecanismos de penetração na pele. Reproduzido de <<http://www.ijpr-online.com/Docs/20041/IJPR226.htm>>

A rota de penetração tem sido muito debatida nas últimas décadas, mas evidências experimentais sugerem que em condições normais, a rota predominante é através de espaços

intercelulares. O espaço intercelular possui 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; ABRAHAM, CHADHA e MITCHELL, 1995).

No desenvolvimento de uma formulação para liberação tópica de fármacos, muitos fatores devem ser considerados, como a estabilidade do fármaco, o uso específico do produto e o sítio de aplicação. O potencial de liberação do fármaco do veículo é dependente das propriedades físico-químicas do fármaco e dos componentes químicos da matriz que foram combinados para formar a formulação (SMITH, MALBACH e SURBER, 2000).

A solubilidade da substância ativa na formulação é de importância primária na determinação da taxa na qual esta substância atravessa uma membrana como a pele. A difusão é um processo cinético passivo que ocorre a favor do gradiente de concentração da região de maior para de menor concentração. Portanto, quanto maior a concentração da substância ativa em solução na formulação, maior será o gradiente de difusão. A substância ativa deve estar em solução para influenciar o gradiente de concentração, pois a substância ativa que está em suspensão não contribui para o gradiente de concentração. Porém, cristais em suspensão desta substância podem funcionar como reservatórios. A solubilidade da substância ativa também pode ser influenciada pela presença de co-solventes na formulação. Estes co-solventes aumentam a solubilidade da substância ativa na formulação e produzem maiores gradientes de concentração através da interface veículo-pele. Porém, com o aumento da solubilidade, a partição da substância ativa entre a membrana e o veículo pode diminuir e a liberação pode ser retardada (SMITH, MALBACH e SURBER, 2000).

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 e antioxidantes, 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.

Predizer o transporte químico através da pele é importante tanto para otimização da liberação tópica quanto transdermal. Para facilitar a estimativa da absorção percutânea, sistemas “*in vitro*” têm sido desenvolvidos (PLAGLIARA et al., 1999).

Estudos de liberação “*in vitro*” podem servir como uma importante ferramenta para uma avaliação inicial de formulações experimentais na área de desenvolvimento de produto. A substância ativa deve ser liberada do veículo, e depois deve estar disponível para penetração no estrato córneo e nas camadas inferiores da pele (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).

Após estudos de liberação é necessário avaliar a penetração de substâncias ativas na ou através da pele. Estes estudos são normalmente realizados 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, esta tem demonstrado propriedades histológicas e fisiológicas similares à da pele humana (PAGLIARA et al., 1999).

Na área cosmética, estudos de absorção na ou através da pele são de grande importância, pois em geral, os componentes cosméticos não devem ter absorção através da pele (absorção sistêmica) (BRONAUGH; COLLIER, 1993). Porém, as substâncias ativas de produtos anti-envelhecimento e hidratantes devem atingir o estrato córneo e a epiderme para

exercerem seu efeito (SEQUEIRA, 1993). Portanto, estudos de permeação e retenção cutânea “*in vitro*” são úteis para avaliar a biodisponibilidade de substâncias ativas e comparar formulações em desenvolvimento. Em muitos casos, somente resultados comparativos são necessários (WESTER; MALBACH, 1990).

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar o extrato fluido e seco de própolis verde quanto ao teor de polifenóis e quanto à atividade antioxidante em diferentes sistemas “*in vitro*”. E ainda, formulações tópicas contendo extrato fluido de própolis verde foram desenvolvidas, sua estabilidade físico-química e funcional foram avaliadas e estudos de liberação, permeação e retenção “*in vitro*” das mesmas foram conduzidos.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterização do extrato fluido e seco de própolis verde;
 - Escolha do solvente para solubilizar o extrato seco de própolis verde sem perda de ativos e atividade antioxidante:
 - ✓ Determinação do teor de flavonóides e polifenóis;
 - ✓ Espectro de absorção;
 - ✓ Atividade doadora de H^+ ao radical DPPH $^{\bullet}$;
 - Determinação da atividade antioxidante por diferentes metodologias:
 - ✓ Atividade antioxidante pelo sistema xantina/luminol/XOD;
 - ✓ Atividade antioxidante pelo sistema H_2O_2 /luminol/HRP;
 - ✓ Atividade sequestradora do radical hidroxila;
 - ✓ Atividade inibidora da peroxidação lipídica;
- Validação das metodologias de determinação da atividade antioxidante empregadas;
- Desenvolvimento de formulações tópicas;
- Avaliação da estabilidade físico-química das formulações:
 - ✓ Testes de centrifugação;

- ✓ Avaliação do pH;
- ✓ Microscopia óptica;
- ✓ Microscopia de luz polarizada;
- Avaliação da estabilidade funcional das formulações:
 - ✓ Medida da atividade antioxidante pelo sistema xantina/luminol/XOD;
 - ✓ Medida da atividade doadora de H^+ ao radical DPPH $^{\bullet}$;
- Estudo da liberação “*in vitro*” das formulações;
- Estudo de permeação e retenção das formulações em pele de orelha de porco;

Material e métodos

3. Material e métodos

3.1. Material

3.1.1. Reagentes

Água destilada, água deionizada e ultrapurificada (Milli-Q) foram produzidas no Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Ácido gálico, ácido tiobarbitúrico, glicina, radical DPPH[•], peroxidase HRP, xantina e xantina oxidase foram adquiridas da Sigma[®], ácido ortofosfórico, carbonato de sódio PA, ácido cítrico, citrato de sódio, cloreto de alumínio, cloreto de sódio, Folin-Ciocalteu (reativo de fenol), fosfato de Sódio PA, fosfato de potássio PA, hidróxido de sódio PA, Tris-HCL, hidróxido de potássio PA, sulfato ferroso amoniacal foram adquiridos da Merck[®], cloreto de potássio, metanol PA, n-butanol PA da Vetec[®], etanol da Synth[®], ácido acético da Mallinckrodt[®], luminol e quercetina da Acros[®], carbopol[®] 940 da Goodrich[®], dimetilsulfóxido da Nuclear[®], EDTA dissódico PA da Art Lab[®], Phenova[®] (fenoxietanol e parabenos – metil, etil, propil, butil parabenos) da Croda[®], peróxido de hidrogênio da Calbiochem[®], Nipaguard[®], cera polawax e propilenoglicol da Galena[®], sacarose da AnalytiCals[®], tris da fundação Sardi, glicerina bidestilada, hostacerin SAF[®], cetiol V, palmitato de isopropila, ácido hialurônico, polissorbato 80 e polissorbato 20 da Pharmaspecial[®].

3.1.2. Equipamentos e acessórios

Agitador Fisatom, modelo 713 D; agitador magnético Ika Workds, modelo Ika Color Squid; agitador magnético multiponto 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; banho a vácuo Fabbe Primar, modelo 141; célula de difusão de Franz modificada; centrífuga clínica Excelsa Baby I, modelo 206-R, Fanem; purificador de água Millipore, modelo Milli-Q acadêmic, Millipak 40; destilador de água Quimis Q, modelo 34121; espectrofotômetro Hitashi U2001, com cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico; homogeneizador de tecidos Turrax, Tenal, modelo Turratec TE 102; luminômetro Autolumat LB953, EG & G Berthold; microscópio óptico Leica DMLB acoplado à máquina fotográfica Leica DC 300; microscópio BX50 da Olympus; pipetas automáticas de 20, 100, 200 e 1000 µL, Gilson; potenciômetro Digimed, modelo DMPH-2; potes plásticos opacos com capacidade de 50 gramas; refrigerador Cònsul Biplex; sistema Milli-Q plus Millipore/Millipore Corporation; incubadora B.O.D. MA 415 UR, Marconi; ultra-som Thorton, modelo T14.

3.1.3. Matéria-prima

Foram avaliados dois tipos de extrato de própolis verde, o fluido e o seco, ambos possuíam a mesma porcentagem em resíduo seco (11 %). Os extratos de própolis verde foram gentilmente fornecidos pela empresa Bioessens Ltda, situada na cidade de Cotia – SP.

3.2. Métodos

3.2.1. Escolha do melhor solvente para solubilizar o extrato seco de própolis verde sem perda da atividade antioxidante e caracterização físico-química dos extratos

Foram avaliados quatro tipos de solventes diferentes para solubilizar o extrato seco de própolis verde, sendo eles: álcool etílico 95 % (SHA 95 %), solução hidroalcoólica 50 % (SHA 50 %), solução hidroalcoólica 80 % (SHA 80 %) e propilenoglicol (SP).

O extrato fluido de própolis verde (EF) foi utilizado como padrão de comparação neste ensaio, pois este possui a mesma porcentagem em resíduo seco que o extrato seco. E ainda, o extrato seco foi preparado a partir do mesmo lote de extrato fluido em questão, segundo a empresa fornecedora. A escolha do melhor solvente a ser utilizado foi realizada através do teor de flavonóides e polifenóis totais e por medida da atividade doadora de H^+ ao radical DPPH $^{\bullet}$. O solvente selecionado foi utilizado para realização dos demais ensaios.

As soluções de estudo foram preparadas agitando, em agitador de tubos tipo vortex, as suspensões formadas com determinado solvente e extrato. As suspensões formadas foram mantidas em banho de ultra-som durante 10 minutos. Agitadas novamente, em agitador tipo vortex, durante mais um minuto e centrifugadas a 1660 g durante 5 minutos. Foram realizadas diluições subseqüentes a partir destas soluções, utilizando solução hidroalcoólica 80 % para determinação da atividade redutora do radical DPPH $^{\bullet}$ e flavonóides totais. Para determinação de polifenóis totais foram realizadas diluições em solução hidroalcoólica 50 %.

Para o EF, solução hidroalcoólica 80 % foi usada para a preparação da solução mãe e demais diluições, apenas para determinação de polifenóis totais foi utilizada solução hidroalcoólica 50 %.

3.2.1.1. Determinação do teor de flavonóides

Para determinação do teor de flavonóides totais foi utilizado quercetina como padrão para a construção da curva analítica. Foram adicionados a 500 μ L de amostra ou solução de quercetina, 500 μ L de solução hidroalcoólica (40 %) de cloreto de alumínio a 2 %. Após incubação por 1 hora em temperatura ambiente, foi realizada leitura da absorvância das amostras em 420 nm, em espectrofotômetro Hitaschi U2001. Foi realizado

concomitantemente o branco, onde uma alíquota de cloreto de alumínio (2 %) foi substituída pela mesma quantidade de álcool 50 % (KUMAZAWA et al., 2004).

3.2.1.2. Determinação do teor de polifenóis

Foi construída curva analítica utilizando ácido gálico como padrão. Foram adicionados a 500 µL da amostra ou soluções de ácido gálico, 500 µL do reagente Folin-Ciocalteu e 500 µL de solução de Na₂CO₃ (10 %). Em seguida, a mistura foi incubada a temperatura ambiente por 1 hora. Após, foi realizada leitura da absorvância das amostras em 760 nm, em espectrofotômetro Hitaschi U2001. Foi utilizado concomitantemente o branco onde uma alíquota da amostra foi substituída pela mesma quantidade de água deionizada (KUMAZAWA et al., 2004).

3.2.1.3. Medida da atividade doadora de H⁺ ao radical DPPH[•]

Em tubo de ensaio foram adicionados 1 mL de tampão acetato de sódio (100 mM) pH 5,5, 1 mL de álcool etílico (95 %), 100 µL de amostra e 500 µL solução alcoólica de DPPH[•] (250 µM). Depois de 10 minutos foi realizada leitura em 510 nm, em espectrofotômetro Hitaschi U2001 (BLOIS, 1958).

3.2.1.4. Espectro de absorção e absorvância específica

O espectro de absorção do extrato fluido de própolis verde e sua absorvância específica no comprimento de onda máximo (λ_{max}) foram determinados com auxílio de espectrofotômetro Hitashi U-2001. O espectro de absorção foi estabelecido entre 200 e 400

nm, com intervalos de 10 nm (MIYATAKA et al., 1997). O extrato foi diluído em solução hidroalcoólica 80 % para concentração final de 0,1 mg/mL.

3.2.2. Avaliação da atividade antioxidante do extrato de própolis verde

A atividade antioxidante do extrato de própolis verde foi avaliada em diferentes sistemas, os quais simulam a formação de diferentes EROs, sendo possível avaliar quais EROs o extrato de própolis verde é capaz de inibir. A atividade antioxidante foi expressa pela porcentagem de inibição versus a concentração de extrato no meio reacional e a porcentagem de inibição foi estabelecida pela fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{Resposta da amostra} \times 100}{\text{Resposta do grupo controle}} - 100$$

3.2.2.1. Atividade sequestradora do radical superóxido gerado no sistema xantina/luminol/XOD por quimioluminescência

As amostras de extrato fluido de própolis verde utilizadas neste ensaio foram preparadas diluindo-se o extrato previamente em propilenoglicol na concentração de 5 mg/mL e posteriormente foram preparadas diluições subsequentes em solução tampão glicina (0,1 M), pH 9,4. As suspensões formadas com extrato seco de própolis verde e solução hidroalcoólica 80 % na concentração de 10 mg/mL foram agitadas em agitador tipo vortex e em seguida, permaneceram em banho de ultra-som durante 10 minutos. As suspensões foram agitadas novamente, em agitador tipo vortex, durante mais um minuto e centrifugadas a 1660 g por 5

minutos. Em seguida, uma alíquota de 5 mL desta solução foi diluída em 5 mL de propilenoglicol. A partir desta solução foram realizadas diluições subseqüentes utilizando solução tampão glicina (0,1 M), pH 9,4. Os resultados foram expressos considerando a concentração de extrato contida no meio reacional.

Este método foi usado para avaliar a atividade seqüestradora de radical superóxido pelo extrato de própolis verde por medida da inibição da quimioluminescência produzida pela oxidação do luminol pelo radical superóxido gerado pela reação xantina-xantina oxidase (XOD). Para a determinação da atividade seqüestradora do extrato de própolis verde, foram pipetados em tubo de ensaio, 400 µL de solução preparada acrescentando EDTA (1 mM) à solução tampão glicina (0,1 M), pH 9,4. Então, foram adicionados 150 µL de xantina (6 mM), 10 µL de amostra teste e 10 µL de solução de luminol (0,6 mM). A reação foi iniciada com a adição de 100 µL de solução recém preparada de xantina oxidase (20 mU/mL) (mantida resfriada no gelo). A medida da atividade seqüestradora foi realizada durante 5 minutos a 25°C em luminômetro Autolumat LB 953 (PASCUAL et al., 1994; HIRAYAMA, et al., 1997).

3.2.2.2. Atividade seqüestradora dos radicais gerados no sistema H_2O_2 /luminol/HRP por quimioluminescência

As amostras de extrato fluido de própolis verde utilizadas neste ensaio foram preparadas diluindo-se o extrato previamente em propilenoglicol na concentração de 50 mg/mL e posteriormente foram preparadas diluições subseqüentes em solução tampão fosfato (0,1 M), pH 7,4. As suspensões formadas com extrato seco de própolis verde e solução hidroalcoólica 80 % na concentração de 50 mg/mL foram agitadas em agitador tipo vortex e em seguida, permaneceram em banho de ultra-som durante 10 minutos. As suspensões foram

agitadas novamente, em agitador tipo vortex, durante mais um minuto e centrifugadas a 1660 g por 5 minutos. Em seguida, uma alíquota de 10 mL desta solução foi diluída em 10 mL de propilenoglicol. A partir desta solução foram realizadas diluições subseqüentes utilizando solução tampão fosfato (0,1 M), pH 7,4. Os resultados foram expressos considerando a concentração de extrato contida no meio reacional.

Para determinação da atividade seqüestradora de radicais pelo extrato de própolis verde por quimioluminescência, foram pipetados em tubo de ensaio, 368 µL de tampão fosfato (0,1 M), pH 7,4, adicionando-se 10 µL da amostra teste, 100 µL de H₂O₂ (concentração final: 5x10⁻⁵ M) e 10 µL de solução de luminol (2 mg/mL) (concentração final: 1,13x10⁻⁴ M) (KROL et al., 1994). A reação foi iniciada com a adição de 500 µL de solução recém preparada de HRP (0,2 UI/mL) (horseradish peroxidase) (mantida resfriada no gelo). A medida da atividade seqüestradora foi realizada em luminômetro Autolumat LB 953, durante 10 minutos a 25°C.

3.2.2.3. Atividade inibidora da peroxidação lipídica

As amostras de extrato fluido de própolis verde utilizadas neste ensaio foram preparadas diluindo-se o extrato previamente em solução hidroalcoólica 80 % na concentração de 10 mg/mL e posteriormente foram preparadas diluições subseqüentes em meio reacional contendo KCl (130 mM) e Tris-HCL (10 mM), pH 7,4. Os resultados foram expressos considerando a concentração de extrato contida no meio reacional.

Em meio de reação contendo KCl (130 mM) e Tris-HCL (10 mM), pH 7,4 foram adicionados 10 µL de citrato de sódio (200 mM), 10 µL de amostra teste, suspensão de mitocôndria (1 mg de proteína) e sulfato ferroso amoniacal (50 µM) e em seguida a mistura reacional foi incubada a 37°C por 30 minutos (RODRIGUES et al., 2002). Para determinação

do MDA formado, 1 mL de ácido tiobarbitúrico (1 %) (TBA) preparado em NaOH (50 mM), 0,1 mL NaOH (10 M) e 0,5 mL de H₃PO₄ (20 %) foram adicionados, seguido por incubação por 20 minutos a 85°C (OHKAWA et al., 1979). O complexo MDA-TBA foi extraído com n-butanol, centrifugado a 1660 g e a absorvância determinada por espectrofotometria em 535 nm. Foram feitos concomitantemente o branco (ausência de mitocôndria), controle positivo (ausência de amostra) e controle negativo (ausência de ferro).

3.2.2.3.1. Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato

As mitocôndrias utilizadas nos experimentos foram fornecidas pelo laboratório de bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

Ratos Wistar machos pesando aproximadamente 200 g, provenientes do Biotério Central da USP de Ribeirão Preto, foram sacrificados por deslocamento cervical. O fígado destes animais foi removido e colocado em meio de homogeneização contendo sacarose (250 mmol/L), EGTA (1 mmol/L) e Hepes-KOH (10 mmol/L), 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 sacarose (250 mmol/L), EGTA (0,3 mM) e Hepes-KOH, pH 7,4. Após, centrifugação a 6000 rpm por 15 minutos, o sedimento final contendo as mitocôndrias isoladas, foi suspenso em 1 mL do meio contendo sacarose (25 mmol/L) e Hepes-KOH, pH 7,4 e submetido a dosagem de proteínas pelo método de Biureto (GORNAL; BARDAWILL; DAVID, 1949; CAIN; SKILLETER, 1987).

3.2.2.4. Atividade seqüestradora do radical hidroxila

As amostras de extrato fluido de própolis verde utilizadas neste ensaio foram preparadas diluindo-se o extrato previamente em propilenoglicol na concentração de 5 mg/mL e posteriormente foram preparadas diluições subseqüentes em solução tampão fosfato (20 mM), pH 7,4. As suspensões formadas com extrato seco de própolis verde e solução hidroalcoólica 80 % na concentração de 10 mg/mL foram agitadas em agitador tipo vortex e em seguida, permaneceram em banho de ultra-som durante 10 minutos. As suspensões foram agitadas novamente, em agitador tipo vortex, durante mais um minuto e centrifugadas a 1660 g por 5 minutos. Em seguida, uma alíquota de 5 mL desta solução foi diluída em 5 mL de propilenoglicol. A partir desta solução foram realizadas diluições subseqüentes utilizando solução tampão fosfato (20 mM), pH 7,4. Os resultados foram expressos considerando a concentração de extrato contida no meio reacional.

A medida da atividade seqüestradora do radical hidroxila foi determinada pela diminuição da formação de substâncias reativas ao TBA provenientes da degradação do açúcar deoxirribose pelo radical hidroxila gerado pela reação de Fenton (CASAGRANDE, 2005). Os meios reacionais continham um volume final de 1 mL, utilizando os reagentes na concentração final de: deoxirribose (concentração variável), tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-KOH}$, pH 7,4 (20 mM), FeCl_3 (100 μM), EDTA (104 μM), H_2O_2 (1 mM), e ascorbato (100 μM). A este meio foram adicionados 10 μL de amostra. Os meios reacionais foram incubados a 37°C por 1 hora. Para determinar as substâncias reativas ao TBA formadas foram adicionados 1 mL de TBA (1 %) preparado em NaOH (50 mM), 0,1 mL de NaOH (10 M) e 0,5 mL de H_3PO_4 (20 %). Em seguida, foi incubado a 85°C por 20 minutos. A coloração desenvolvida foi analisada em 532 nm, modificando o método descrito por HALLIWELL e colaboradores (1987). Foram preparadas, concomitantemente, uma amostra branco (ausência de deoxirribose), uma amostra controle positivo (ausência de amostra) e uma amostra controle negativo (ausência de ferro).

3.2.2.5. Validação das metodologias para determinação da atividade antioxidante

Para as diferentes metodologias utilizadas para determinação da atividade antioxidante, foram avaliadas as precisões interdia e intradia. Para determinação da precisão interdia foram realizadas nove determinações (n=9) em três dias consecutivos, e para avaliar a precisão intradia foram realizadas nove determinações (n=9) em um mesmo dia. O método foi considerado preciso quando o desvio padrão relativo (DPR) apresentou-se menor que 15% como descrito por CAUSON (1997) e RE nº899 de 2003, da ANVISA. Foram avaliados ainda, a linearidade e o limite de quantificação das metodologias. O limite de quantificação foi avaliado pela medida do DPR de três determinações de diluições sucessivas da amostra teste. Diluições com DPR maiores ou próximos a 20 % foram consideradas não precisas e, portanto, este seria o limite de quantificação do método.

3.2.3. Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato fluido de própolis verde

As formulações contendo extrato fluido de própolis verde (EF) foram desenvolvidas no Laboratório de Controle de Qualidade da FCFRP-USP. Foram desenvolvidas três formulações, cuja composição pode ser visualizada na tabela 1.

As formulações foram preparadas por simples agitação manual - formulação 01 (F 01), pelo método de inversão de fases - formulação 02 (F 02) ou por agitação mecânica - formulação 03 (F 03). Na F 02 a mistura dos componentes, após processo de fusão (80°C), foi agitada a 400 rpm, em agitador Fisatom, modelo 713 D, até resfriamento a temperatura ambiente (25°C). Para F 03, a mistura de natrosol® e tampão McIlvaine aquecido a 70°C, foi agitada a 400 rpm em agitador Fisatom, modelo 713 D, até resfriamento da dispersão, em seguida foram adicionados os demais componentes.

Nas F 01 e F 02, o EF e o conservante foram previamente solubilizados em propilenoglicol e posteriormente incorporados à formulação à temperatura ambiente, após 24 horas da manipulação. Para formulação F 03, o EF foi previamente solubilizado em uma mistura de propilenoglicol e polissorbato 20, e posteriormente incorporado à formulação à temperatura ambiente. Foram preparadas ainda, formulações placebo (P 01, P 02 e P 03) sem adição do extrato de própolis para cada formulação. As formulações foram acondicionadas em potes de PVC opacos brancos, com capacidade para 50 g, para posterior teste de estabilidade.

O EF foi incorporado às formulações na concentração de 2,5 % conforme descrito por MARQUELE e colaboradores (2005).

Tabela 1: Composição das formulações.

Componentes	F 01	F 02	F 03	P 01	P 02	P 03
Hostacerin SAF [®]	6%	-	-	6%	-	-
Polawax [®]	-	8%	-	-	8%	-
Natrosol 250HHR [®]	-	-	1,5%	-	-	1,5%
Cetiol V [®]	-	2%	-	-	2%	-
Palmitato de isopropila	-	1,5%	-	-	1,5%	-
Glicerina	-	3%	-	-	3%	-
Phenova [®]	0,5%	0,5%	-	0,5%	0,5%	-
Nipaquad [®]	-	-	0,4%	-	-	0,4%
Propilenoglicol	5%	5%	10%	5%	5%	10%
Álcool etílico	-	-	30%	-	-	30%
Polissorbato 20	-	-	1%	-	-	1%
Ácido hialurônico 1%	-	-	1%	-	-	1%
Água destilada	88,5%	80%	-	88,5%	80%	-
Tampão McIlvaine	-	-	56,1%	-	-	56,1%
EF	2,5%	2,5%	2,5%	-	-	-

3.2.3.1. Estudo de estabilidade

As formulações placebo e as formulações adicionadas de 2,5 % de EF foram armazenadas em diferentes temperaturas, 40°C ± 2 com 75 % ± 5 UR (umidade relativa), 30°C ± 2 com 75 % ± 5 UR e a 5°C, e foram avaliadas quanto a diferentes parâmetros por um

período de 180 dias, conforme a RE nº1 de 29 de julho de 2005 da ANVISA. Foram coletadas amostras para avaliação da estabilidade físico-química nos períodos de 7, 14, 21, 28, 60, 90 e 180 dias.

As formulações F 01, F 02, P 01 e P 02 foram avaliadas quanto à estabilidade física por centrifugação, pH, características organolépticas, microscopia óptica e de luz polarizada e quanto à estabilidade funcional pela determinação da atividade antioxidante utilizando o sistema xantina/luminol/XOD. As formulações F 03 e P 03 foram analisadas quanto a estabilidade física pela avaliação do pH, características organolépticas e estabilidade funcional por medida da atividade doadora de H^+ ao radical DPPH[•].

3.2.3.1.1. Estabilidade física

3.2.3.1.1.1. Características Organolépticas

As características organolépticas, como cor, odor e aspecto, foram avaliadas sensorialmente, tendo como padrão de comparação amostras de formulações recém preparadas (BRASIL. ANVISA. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. RE nº 1, de 29 de julho de 2005).

3.2.3.1.1.2. Perda de água

As formulações desenvolvidas foram monitoradas quanto à perda de água, a qual foi avaliada pesando os potes contendo as formulações nos diferentes períodos de análise e calculando a porcentagem de perda de peso, que foi associada à perda da fração aquosa.

3.2.3.1.1.3. Teste de centrifugação

O teste de centrifugação foi realizado utilizando 2 g de cada amostra, submetendo-as à centrifugação a 1660 g por 30 minutos em centrífuga Excelsa baby I modelo 206, potência 440 watts, Fanem (MAIA CAMPOS & BADRA, 1992).

3.2.3.1.1.4. Tamanho das gotículas

Uma alíquota das amostras foi colocada entre lâmina e lamínula e observada sob aumento de 1000x utilizando microscópio Leica DMLB acoplado ao software LEICA Q WIN DD 300, o qual calcula a área das gotículas. Foram calculadas as áreas de 15 gotículas para cada formulação. Os resultados foram expressos em $\mu\text{m}^2 \pm$ erro padrão.

Com o objetivo de confirmar os resultados adquiridos no método acima descrito, as formulações F 01 e P 01 foram também diluídas 1:100 em água recém destilada e mantidas sob agitação, em agitador magnético, durante 30 minutos. Em seguida, foram analisadas quanto à distribuição do tamanho das gotículas, com auxílio de coulter DELSA 440SX (DE MORAIS et al., 2006).

3.2.3.1.1.5. Análise microscópica

As formulações foram examinadas por microscopia de luz polarizada, utilizando microscópio BX50 da Olympus, em temperatura ambiente (25°C). Foi observado a presença de anisotropia, a qual indica a presença de estruturas líquido-cristalinas.

3.2.3.1.1.6. Avaliação do pH

A avaliação do pH foi realizada pela medida direta do pH, com peagômetro Digimed DM20, utilizando solução aquosa das amostras a 10 % (DI MAMBRO e FONSECA, 2005).

3.2.3.1.2. Estabilidade da atividade antioxidante das formulações

O método para determinação da atividade antioxidante das formulações F 01 e F 02 foi o mesmo método descrito por Pascual e colaboradores (1994) e Hirayama e colaboradores (1997) utilizado para determinação da atividade nos extratos (item 3.2.2.1.). Foram preparadas diluições das formulações em tampão glicina (0,1 M), pH 9,4 de forma a conseguir concentrações de extrato correspondente à quantidade necessária para se conseguir porcentagens de inibição da emissão da luz da reação luminescente xantina/luminol/XOD de aproximadamente 50 %. Desta forma, 1 g de formulação foi diluída em 5 g de tampão glicina (0,1 M), pH 9,4, e 600 µL desta solução foi diluída para 10 mL com tampão glicina (0,1 M), pH 9,4. Avaliou-se então, a atividade antioxidante desta última diluição. As porcentagens de inibição das formulações foram concomitantemente comparadas com a inibição produzida pelo EF não veiculado.

O método para determinação da atividade antioxidante das formulações F 03 foi o mesmo método descrito por Blois (1958) utilizado para determinação da atividade nos extratos (item 3.2.1.3.). Foram preparadas diluições das formulações em solução hidroalcoólica 80 %, de forma a conseguir concentrações de extrato correspondente à quantidade necessária para se obter porcentagens de inibição do sistema de aproximadamente 50 %. Assim, 1 g de formulação foi diluída em 5 g de solução hidroalcoólica 80 % e 4 mL desta solução foram diluídos novamente para 10 mL com solução hidroalcoólica 80 %. Desta última diluição, foi avaliada a atividade antioxidante. As porcentagens de inibição das

formulações foram concomitantemente comparadas com a inibição produzida pelo EF não veiculado.

3.2.3.1.2.1. Avaliação da interferência dos constituintes das formulações na atividade antioxidante

O método para determinação da atividade antioxidante das formulações foi avaliado quanto à interferência dos constituintes das mesmas. Para F 01, F 02, P 01 e P 02 foram preparadas diluições das formulações, em tampão glicina (0,1 M), pH 9,4, de forma a conseguir concentrações de extrato correspondente à quantidade necessária para se obter porcentagens de inibição da emissão da luz da reação luminescente xantina/luminol/XOD de aproximadamente 40 % e 70 %. As porcentagens de inibição das formulações foram concomitantemente comparadas com a inibição produzida pelo EF não veiculado.

Para F 03 e P 03 foram preparadas diluições das formulações, conforme o item 3.2.3.1.2., de forma a conseguir concentrações de extrato correspondente à quantidade necessária para se obter porcentagens de inibição do sistema de aproximadamente 50 %. As porcentagens de inibição das formulações foram concomitantemente comparadas com a inibição produzida pelo EF não veiculado.

3.2.3.2. Estudo de Liberação, Permeação e Retenção cutânea

As formulações desenvolvidas foram avaliadas quanto a sua capacidade em disponibilizar os ativos para o meio e de permear ou reter estes ativos na pele de orelha de porco.

Os ensaios foram conduzidos utilizando células de Franz modificadas (figura 5), com $1,77\text{ cm}^2$ de área de difusão e com compartimento para solução receptora de 12 mL. A solução receptora utilizada foi solução tampão fosfato de potássio (20 mM), pH 7,4 contendo NaCl (0,9 %) e polissorbato 80 (0,5 %), previamente degasificada. A solução receptora permaneceu sob agitação (400 rpm) por uma barra magnética e foi mantida a 37°C por um banho circulante que envolve as células.

Seis células de difusão foram utilizadas nos experimentos, sendo que duas delas foram utilizadas como branco nos ensaios de liberação, onde foram acondicionadas formulações base sem extrato. E nos ensaios de permeação e retenção três células foram utilizadas com formulações com ativo e três delas com formulações placebo. Desta forma, a solução receptora das formulações placebo foi utilizada como referência nos ensaios analíticos. Foram utilizados 500 mg de cada formulação.

Figura 5: Célula de difusão de Franz.

Para verificar o quanto de EF estava sendo liberado, permeado ou retido, foi utilizada a atividade antioxidante, pelo método quimioluminescente xantina/luminol/XOD, como forma de quantificar o extrato. Os resultados foram expressos em quantidade equivalente a extrato

de própolis (μg), determinada relacionando a porcentagem de inibição obtida com IC_{50} (quantidade de extrato que fornece 50 % de inibição da quimioluminescência do sistema), previamente determinado, com a porcentagem de inibição alcançada pelas amostras dos ensaios de liberação, permeação ou retenção.

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

Neste ensaio, 10 vezes mais o conteúdo de EF contido em 500 mg de formulação (125 mg, amostra A) e a quantidade contida em 500 mg de formulação (12,5 mg, amostra B) foram solubilizados na solução receptora. Desta forma, 2,5 g de extrato de própolis foi previamente solubilizado em 5 mL de propilenoglicol, sendo esta a mesma proporção extrato/propilenoglicol adicionadas no preparo de 100 g de formulação. Alíquotas de 250 μL e 25 μL desta solução foram adicionadas a 11,75 mL e 11,98 mL, respectivamente, de solução receptora no compartimento receptor da célula de Franz. Estas soluções foram agitadas por uma barra magnética por 1 hora e mantidas a 37°C por banho circulante. Alíquotas de 2,6 mL das amostras foram diluídas, novamente, em 10 mL (amostra B) e 100 mL (amostra A) de tampão glicina (0,1 M), pH 9,4, de forma a obter porcentagens de inibição de aproximadamente 50 %. As porcentagens de inibição do sistema xantina/luminol/XOD pelas amostras foram comparadas com a porcentagem de inibição causada pelo EF apenas diluído em tampão glicina (0,1 M), pH 9,4 na mesma proporção que as amostras. O teste foi realizado com $n=5$ e os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM.

3.2.3.2.2. Estudo de liberação “*in vitro*” de formulações tópicas adicionadas de extrato de própolis

Nos ensaios de liberação foi utilizada membrana de éster de celulose (nitrato 70-80 % e acetato) tipo HA lisa branca, Millipore[®], com tamanho de poro de 0,45 μm , a qual foi colocada entre o compartimento doador e receptor da célula de Franz. Amostras de 500 mg das formulações foram colocadas sobre a membrana e o compartimento receptor foi preenchido com 12 mL de solução receptora.

Amostras da solução receptora (200 μL) foram coletadas das células de Franz nos seguintes intervalos: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas para avaliar a cinética de liberação. O mesmo volume da solução receptora limpa foi devolvido ao compartimento receptor da célula de Franz. As amostras foram armazenadas a -20°C até serem avaliadas.

A quantificação da atividade antioxidante dos componentes liberados das formulações foi determinada por quimioluminescência pelo método xantina/luminol/XOD. Conforme descrito no item 3.2.2.1., mas com modificação do volume de amostra e meio, os quais foram de 20 μL e 390 μL , respectivamente.

Foi determinado o perfil de liberação dos compostos antioxidantes do EF presente nas formulações desenvolvidas. Três modelos diferentes de liberação foram avaliados, sendo estes: 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.

3.2.3.2.3. Estudo de permeação e retenção “*in vitro*” das formulações tópicas adicionadas de extrato de própolis

Os experimentos de permeação foram conduzidos utilizando 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 cuidadosamente removida com a ajuda de tesoura e bisturi. Vasos sanguíneos e gordura foram retirados, sendo que somente a derme e a epiderme foram isoladas. As peles de orelha de porco foram armazenadas a – 20°C até o ensaio, por um período máximo de 30 dias.

3.2.3.2.3.1. Permeação

Este ensaio foi realizado conforme protocolo descrito no item 3.2.3.2.. Desta forma, uma porção de pele foi acondicionada entre o compartimento doador e receptor da célula de Franz de forma que o estrato córneo foi mantido em contato com a formulação e a derme em contato com a solução receptora. O experimento foi conduzido por 12 horas. Após este período, amostras da solução receptora foram retiradas e armazenadas a – 20°C. Após, foi determinada a atividade antioxidante dos compostos presentes no EF pelo método xantina/luminol/XOD, como descrito nos item 3.2.2.1., mas com modificação do volume de amostra e meio, os quais foram de 20 µL e 390 µL, respectivamente. As amostras de peles, após permeação, foram limpas com algodão embebido em água destilada e então avaliadas quanto à retenção.

3.2.3.2.3.2. Estudo da recuperação do método de retenção cutânea

Como descrito por Röpke e colaboradores (2002) para realizar 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. Desta forma, amostras de pele de orelha de porco tiveram o estrato córneo retirado pelo método do tape stripping, conforme descrito a seguir. Em seguida, estas amostras de pele foram enriquecidas com concentrações conhecidas de EF, picotadas e transferidas para um tubo de Beckman contendo 2 mL de metanol. As amostras de pele enriquecidas com extrato de própolis sofreram processo de extração como descrito a seguir, no estudo de retenção. Após, foi avaliado a atividade antioxidante dos compostos extraídos das amostras pelo método xantina/luminol/XOD.

Foram avaliadas duas concentrações diferentes de extrato, 2,5 mg e 0,5 mg de EF, concentração correspondente a 20 % e 4 % da concentração de extrato contida em 500 mg de formulação, respectivamente. O extrato foi aplicado na pele orelha de porco e extraído. E ainda, uma amostra de extrato foi processada pelo método extração sem ser aplicado na pele, com o intuito de avaliar se o processo de extração causava deterioração dos componentes ativos.

3.2.3.2.3.3. Retenção

A área da pele de porco exposta à formulação, utilizada no experimento de permeação, foi limpa e isolada por um template. Então, retirou-se o estrato córneo da pele por “tape stripping”, sendo que a epiderme viável e a derme foram avaliadas quanto à retenção dos componentes do EF responsáveis pela atividade antioxidante.

“Tape stripping”: Esta técnica consiste na retirada do estrato córneo da pele pela utilização de fitas adesivas (SURBER; SCHWART; SMITH, 1999). Desta forma 15 pedaços

de fitas adesivas transparentes (fita adesiva 3M) foram cortadas e pressionados de forma uniforme sobre a área exposta à permeação. As fitas retiradas foram descartadas, pois não foi possível estabelecer a atividade nestas fitas, o quanto de extrato ficou retido no estrato córneo, pois os constituintes das fitas interferiram no método de avaliação da atividade antioxidante empregado.

A região isolada por templete, depois de retirado o estrato córneo, foi picotada, transferida para tubo de Beckman contendo 2 mL de metanol e triturada em Turrax por 2 minutos a 18000 rpm. O homogenato obtido permaneceu em banho de ultra-som por 15 minutos. Após os 15 minutos, o homogenato foi agitado em agitador de tubos por 1 minuto a 2200 rpm e centrifugado a 1660 g por 15 minutos. O sobrenadante foi submetido à secagem sob ar comprimido e após secagem, as amostras foram ressuspensas em 500 µL de metanol para serem avaliadas quanto à atividade antioxidante pelo método xantina/luminol/XOD, como descrito item 3.2.2.1., mas com modificação do volume de amostra e meio, os quais foram de 20 µL e 390 µL, respectivamente.

A utilização de metanol para ressuspender as amostras provenientes da extração das peles, não influenciou no método de determinação da atividade antioxidante, sendo que curva analítica de extrato de própolis e o branco da reação também foram realizados com metanol.

3.3. Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo programa de estatística GraphPad Prism[®] (versão 3.0, 1999). Os resultados foram expressos pela média $\pm$ erro padrão da média (EPM) ou $\pm$ desvio padrão (DP), comparando os diferentes grupos de acordo com o método de análise de variância ANOVA de uma via, seguido do teste de múltiplas

comparações de Dunnett's, Tukey's e t-teste. Foram consideradas diferenças significativas os valores de $p < 0,05$.

Resultados e discussão

4. Resultados e discussão

4.1. Escolha do melhor solvente para solubilizar o extrato seco de própolis verde sem perda da atividade antioxidante e caracterização físico-química dos extratos

4.1.1. Determinação do teor de flavonóides

O método de determinação de flavonóides totais tem como princípio a formação de um complexo estável entre o cloreto de alumínio e o carbono C-4 do grupo ceto e os grupos hidroxila dos carbonos C-3 e C-4 de flavonas e flavonóis (figura 6) (CHANG et al., 2002). O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonóides, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Desta forma, é possível determinar a quantidade de flavonóides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos (WOISKY, 1996).

Figura 6: Formação do complexo flavonóide-Al. Reproduzido de Markham, 1982.

O teor de flavonóides foi determinado através da equação $y=0,04724x-0,007711$ ($r=0,99979$) obtida com padrão de quercetina. Houve diferença significativa (Anova, seguido

Tukey's) no conteúdo de flavonóides entre o extrato fluido (EF) e extrato seco quando este foi solubilizado em álcool etílico 95 % (SHA 95 %) e propilenoglicol (SP), com redução de 11,79 % e 36,68 %, respectivamente (figura 7).

Figura 7: Teor de flavonóides totais no extrato fluido (EF) e seco de própolis verde, após solubilização por diferentes solventes. Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ EPM. * diferença significativa $p < 0,05$.

EF, ESA 95 %, ESA 50 %, ESA 80 %, ESP = extrato fluido de própolis verde, extrato seco de própolis verde solubilizado em álcool etílico 95 %, em solução hidroalcoólica 50 %, em solução hidroalcoólica 80% e em propilenoglicol, respectivamente.

O conteúdo de flavonóides totais encontrado para o EF e seco de própolis verde, sendo este solubilizado em solução hidroalcoólica 80 % (SHA 80 %), foi de 2,29 mg/g, sendo este teor bem mais baixo do encontrado por Marquede e colaboradores (2005) para extrato fluido e glicólico de própolis marrom, 4,7 mg/g e 4,79 mg/g, respectivamente.

Esta diferença de teores pode estar relacionada à diferença de composição química entre as própolis. Numerosos estudos realizados nos últimos anos descrevem que a composição da própolis pode ser completamente diferente quimicamente e biologicamente (BANKOVA, 2005). O que determina a composição química da própolis é a origem da planta

da própolis, ou seja, a planta a qual a abelha poliniza. Assim, a diversidade da própolis está relacionada com a região onde se encontram determinadas plantas.

4.1.2. Determinação do teor de polifenóis

Diversos trabalhos descrevem a importância dos polifenóis na atividade antioxidante. O método de Folin-Ciocalteu para determinação de polifenóis totais tem como princípio a propriedade do íon fenolato ser oxidado. A reação de redução da mistura dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico em meio alcalino a óxidos de tungstênio e molibdênio é causada pelos compostos fenólicos, formando um complexo de coloração azul (ADELMANN, 2005). O reagente de Folin-Ciocalteu reage completamente com compostos fenólicos presentes nas amostras, quando carbonato de sódio é adicionado ao meio reacional, isto se deve ao fato do íon fenolato ser completamente oxidado em pH 10 (SINGLETON et al., 1999).

O teor de polifenóis foi determinado através da equação $y=0,0332x-0,0016$ ($r = 0,99945$) obtida com padrão de ácido gálico. Após solubilização em solventes diferentes, uma redução significativa (Anova, seguido de Tukey's) do conteúdo de polifenóis, em relação ao teor encontrado para extrato fluido, foi observada quando o extrato seco foi solubilizado em solução de hidroalcoólica 80 %, álcool etílico 95 % e propilenoglicol, com redução de 7,77 %, 31,47 % e 44,23 %, respectivamente (figura 8).

Figura 8: Teor de polifenóis totais no extrato fluido e seco de própolis verde, após solubilização por diferentes solventes. Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ EPM. * diferença significativa $p < 0,05$.

EF, ESA 95 %, ESA 50 %, ESA 80 %, ESP = extrato fluido de própolis verde, extrato seco de própolis verde solubilizado em álcool etílico 95 %, em solução hidroalcoólica 50%, em solução hidroalcoólica 80 % e em propilenoglicol, respectivamente.

O teor de polifenóis encontrado no extrato fluido de própolis verde foi de 18,27 mg/g e 18,11 mg/g para extrato seco solubilizado em solução hidroalcoólica 50 %. Estes teores são próximos ao encontrado por Marquele e colaboradores (2005) para os extratos fluido e glicólico de própolis marrom, 13,3 mg/g e 13,33 mg/g, respectivamente.

No entanto, o teor de polifenóis descrito por Choi e colaboradores (2006) para extrato de própolis brasileira e de diversas regiões da Coreia é bem maior que o encontrado neste estudo, sendo de 120 mg/g para própolis brasileira e cerca de 180 mg/g para própolis de diversas regiões da Coreia. O mesmo é observado com o teor de flavonóides totais. Deduz-se que esta discrepância de teor seja devido à forma de preparo do extrato, de maneira que a porcentagem em resíduo seco pode ser maior no estudo realizado por Choi e colaboradores (2006).

4.1.3. Medida da atividade doadora de H^+ ao radical DPPH $^{\bullet}$

Os resultados demonstraram que os extratos fluido e seco de própolis verde possuem atividade antioxidante, sendo capazes de reduzir o radical DPPH $^{\bullet}$. O extrato fluido apresentou IC₅₀ de 0,07 mg/mL. O melhor solvente para solubilizar o extrato seco, sem perda da atividade, foi solução hidroalcoólica 80 % (ESA 80 %), a qual apresentou o mesmo IC₅₀ do extrato fluido (figura 9). Os outros solventes apresentaram IC₅₀ de 0,106 mg/mL, 0,109 mg/mL, 0,157 mg/mL, para solução hidroalcoólica 50 % (SHA 50 %), álcool etílico 95 % (SHA 95 %) e propilenoglicol (SP), respectivamente (figura 9). Houve diferença significativa na medida da atividade doadora de H^+ ao radical DPPH $^{\bullet}$ entre o extrato fluido e extrato seco solubilizado em SHA 50 %, SHA 95 % e SP.

Figura 9: Curva da medida da atividade doadora de H^+ ao radical DPPH $^{\bullet}$ para extrato fluido e seco de própolis verde, após solubilização por diferentes solventes. Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ EPM.

EF, ESA 95 %, ESA 50 %, ESA 80 %, ESP = extrato fluido de própolis verde, extrato seco de própolis verde solubilizado em álcool etílico 95 %, em solução hidroalcoólica 50 %, em solução hidroalcoólica 80 % e em propilenoglicol, respectivamente.

A redução da atividade antioxidante do extrato seco de própolis verde, quando solubilizado em álcool etílico 95 % e propilenoglicol, pode estar relacionada à capacidade reduzida destes solventes em solubilizar flavonóides e polifenóis, uma vez que estas substâncias estão em concentração pequena nestas soluções (figura 7 e 8). Isto confirma a idéia que os polifenóis, como flavonóides, presentes na própolis verde contribuem significativamente para atividade de antioxidante desta. Fernandes-Pachón e colaboradores (2004) descreveram que 50 % da atividade antioxidante dos vinhos tintos é atribuída à composição de fenólicos e coeficientes de correlação altos foram encontrados entre o índice de polifenóis totais e atividade de antioxidante avaliados pelos métodos ABTS, DPPH e ORAC. Além disso, Russo e colaboradores (2002) também sugerem que a atividade antioxidante da própolis seja devido a uma contribuição significativa da composição de fenólicos, e que a própolis com CAPE (caffeic acid phenethyl ester), e CAPE sozinho, também mostraram alta eficiência em reduzir o radical DPPH[•].

Embora o conteúdo de flavonóides e polifenóis não esteja reduzido significativamente no extrato solubilizado em solução hidroalcoólica 50 %, a atividade está significativamente reduzida, talvez isto seja devido à baixa solubilidade de espécies de polifenóis cruciais para atividade antioxidante. Sroka e colaboradores (2003) descrevem que a eficiência de constituintes fenólicos, como os anti-radicais e antioxidantes, depende de muitos fatores, como o número de grupos de hidroxila ligado no anel aromático e a posição da hidroxila no anel aromático.

Embora os métodos de determinação de flavonóides totais e polifenóis sejam parâmetros eficientes para caracterizar matérias-primas de origem vegetal, é necessário o uso de outro método em paralelo para avaliar a qualidade destas matérias-primas, uma vez que este método não é capaz de selecionar espécies químicas sem atividade.

O melhor solvente para solubilização do extrato seco sem perda da atividade foi à solução hidroalcoólica 80 %, mesmo que este solvente não solubilize todos os polifenóis presentes, como acima demonstrado (figura 8), adotou-se este solvente para realização dos demais ensaios devido à necessidade de padronização do preparo da amostra.

4.1.3.1. Validação da medida da atividade doadora de H^+ ao radical DPPH $^{\bullet}$

A precisão representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio (BRASIL. ANVISA. RE n° 899, de 29 de maio de 2003).

A avaliação da reprodutibilidade do método de determinação da medida da atividade doadora de H^+ ao radical DPPH $^{\bullet}$ foi realizada utilizando quatro concentrações diferentes de extrato fluido e seco de própolis verde. Foram realizadas nove ($n=9$) determinações para precisão intradia e interdia. O método demonstrou-se reprodutível tanto na precisão intradia quanto na precisão interdia, em todas as concentrações avaliadas (tabela 2), exceto para extrato seco solubilizado em propilenoglicol na concentração de 0,04 mg/mL, onde o desvio padrão relativo foi superior ao estabelecido (15 %).

Tabela 2: Precisão do método de determinação da medida da atividade doadora de H^+ ao radical DPPH $^{\bullet}$, no extrato fluido e seco de própolis verde, após solubilização por diferentes solventes.

Precisão interdia								
	0,32 mg/mL		0,16 mg/mL		0,08 mg/mL		0,04 mg/mL	
	média	DPR	Média	DPR	média	DPR	média	DPR
EF	84,97	2,10	82,18	0,64	52,91	9,54	30,64	13,02
SHA	84,01	1,62	82,67	3,75	52,38	7,85	29,47	11,74
SP	79,03	3,77	56,17	5,50	31,19	10,99	17,18	28,29
Precisão intradia								
	0,32 mg/mL		0,16 mg/mL		0,08 mg/mL		0,04 mg/mL	
	média	DPR	média	DPR	média	DPR	média	DPR
EF	86,42	0,31	79,08	6,56	46,81	3,63	26,18	4,01
SHA	85,04	0,56	74,50	9,11	44,32	8,80	24,23	11,23
SP	82,04	1,73	58,10	8,66	32,86	9,92	20,50	17,70

Os resultados representam a média de nove determinações.

Média (porcentagem de inibição) e DPR (%).

EF, ESA e ESP = extrato fluido de própolis verde, extrato seco de própolis verde solubilizado em solução hidroalcoólica 80 % e em propilenoglicol, respectivamente.

4.1.4. Espectro de absorção e Absorvância específica

O espectro de absorção na região UV é uma das características físico-químicas usadas para avaliar a própolis (MIYATAKA et al., 1997), pois tem sido relatado que várias atividades farmacológicas da própolis são atribuídas aos compostos fenólicos, como flavonóides e ácidos fenólicos nela presentes (KUMAZAWA et al., 2004), os quais apresentam absorção espectral entre 200-400 nm.

O espectro de absorção encontrado para EF demonstrou-se similar ao reportado por Miyataka e colaboradores (1997) para extratos alcoólico e aquoso de própolis brasileira, chinesa e japonesa (figura 10). E ainda, o espectro encontrado está de acordo com a instrução normativa nº3, publicada em Janeiro de 2001, pelo Ministério da Agricultura, a qual estabelece que os extratos de própolis devem apresentar picos de absorção característicos entre 200 nm e 400 nm.

O valor de absorvância específica encontrada foi de 42,9 e a absorvância máxima foi encontrada em 315 nm. A absorvância específica foi menor que a encontrada por Kumazawa e

colaboradores (2004) e por Miyataka e colaboradores (1997), os quais demonstraram valores de 102-367 e 156-461, respectivamente. Estes autores demonstraram ainda, valores de absorção máxima de 275-294 nm e 238-301, 6 nm, respectivamente.

Apesar dos autores acima reportados não terem esclarecido a forma de preparo e o teor de sólidos totais dos extratos ensaiados, os resultados obtidos sugerem que os extratos reportados e EF possuem constituição química diferenciada por apresentarem absorvância específica e absorvância máxima distintas.

Figura 10: Espectro de absorção na região UV encontrado para extrato fluido de própolis verde.

4.2. Avaliação da atividade antioxidante do extrato de própolis verde

4.2.1. Atividade sequestradora do radical superóxido gerado no sistema xantina/luminol/XOD por quimioluminescência

O ânion superóxido ocorre em processos como reparação celular, transporte de elétrons pela membrana celular da mitocôndria de bactérias, ação enzimática da xantina oxidase,

aldeído oxidase, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase ligada à membrana celular de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos (PIETTA, 2000).

O ânion superóxido formado “*in vivo*” é quase completamente convertido pela superóxido dismutase ou por dismutação não enzimática em H_2O_2 . Ambos O_2^- e H_2O_2 podem encontrar algumas moléculas alvo nas quais podem causar danos diretos (HALLIWELL et al., 1995).

Neste ensaio foi possível avaliar a habilidade do extrato de própolis em sequestrar os radicais superóxidos formados no sistema xantina/luminol/XOD através da seguinte reação:

O luminol é utilizado como um detector, o qual é oxidado pelo ânion superóxido (GIROTTI et al., 2000). Desta forma, a quantidade de luz emitida é proporcional quantidade ânions superóxido produzida pela enzima xantina oxidase.

A inibição da luz emitida neste sistema pode acontecer por inibição da enzima xantina oxidase ou por sequestro dos radicais superóxido formados a partir da atividade desta (PIETTA, 2000).

Os extratos fluido e seco de própolis verde reduziram a emissão da luz produzida pelo radical superóxido gerado no sistema xantina/luminol/XOD, revelando valores de IC_{50} de 4,1 $\mu\text{g/mL}$ e 5,4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (figura 11). Marquele e colaboradores (2005), em um estudo de avaliação da atividade antioxidante da própolis marrom, descreveram que a atividade deste extrato de própolis é devido ao sequestro de radicais superóxido e não por inativação enzimática. Assim, acredita-se que a atividade antioxidante dos extratos de própolis verde seja

atribuída, principalmente, pelo seqüestro de radicais superóxido e não por inativação da enzima xantina oxidase.

Uma vez que extrato seco foi preparado a partir do mesmo lote do extrato fluido estudado, acredita-se que a redução da atividade do extrato seco de própolis verde possa ser devido à baixa solubilização de espécies necessárias para inibir a luz emitida neste sistema ou por perda de ativos no processo de preparo do extrato seco.

Figura 11: Curva de inibição da emissão da luz da reação luminescente xantina/luminol/XOD encontrada para extrato fluido e seco de própolis verde. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de três determinações.

Cos e colaboradores (1998) demonstraram em seu estudo a relação estrutura atividade dos flavonóides como inibidores da xantina oxidase e como seqüestradores do radical superóxido produzido pela ação da XOD, eles verificaram que para uma maior atividade seqüestradora de radical superóxido são necessários um grupo hidroxila no carbono C-3 e 3 grupos hidroxila no anel B da molécula de flavonóide (figura 12).

Figura 12: Representação esquemática da estrutura química de um flavonóide. Reproduzido de Martínez- Valverde, Periago e Ros, 2000.

Marquele e colaboradores (2005) estudaram a inibição da luz emitida neste sistema pelos extrato fluido e glicólico de própolis marron, foram encontrados valores de IC_{50} de aproximadamente 0,005 $\mu\text{L/mL}$ (cerca de 5 $\mu\text{g/mL}$) para ambos extratos. Valores os quais, demonstram-se próximos ao encontrado neste estudo para própolis verde.

A reduzida quantidade de extrato necessária para causar a inibição de 50 % da emissão da luz por este sistema pode estar relacionada à presença de compostos fenólicos, como flavonóides, presentes nestes extratos e possivelmente do tipo descrito por Cos e colaboradores (1998).

Russo e colaboradores (2002) descreram que os extratos de própolis com e sem CAPE são hábeis a inibir a formação de ânions superóxido, produzido durante a autoxidação de β -mercaptoethanol, um composto tiol. Mas, o extrato de própolis com CAPE demonstrou uma maior capacidade de seqüestrar este radical.

4.2.1.1. Validação da atividade seqüestradora do radical superóxido gerado no sistema xantina/luminol/XOD por quimioluminescência

A avaliação da reprodutibilidade do método de determinação da atividade seqüestradora do radical superóxido gerado pelo sistema xantina/luminol/XOD foi realizada em três concentrações diferentes de extrato fluido e seco de própolis verde. Foram realizadas nove (n=9) determinações para precisão intradia e interdia. O método demonstrou-se reprodutível tanto na precisão intradia quanto na precisão interdia, em todas as concentrações avaliadas e para ambos os extratos (tabela 3). E ainda, apresentou valores considerados baixos de desvio padrão relativo, mesmo quando adotadas concentrações baixas de extrato, demonstrando ser um método bastante eficiente e reprodutível.

Tabela 3: Precisão do método de determinação da atividade antioxidante pelo sistema xantina/luminol/XOD no extrato fluido e seco de própolis verde.

Precisão interdia						
	3,7µg/mL		7,5µg/mL		15µg/mL	
	média	DPR	média	DPR	média	DPR
EF	46,81	4,38	64,74	3,86	80,10	5,19
ES	47,18	5,32	62,99	8,84	77,79	4,45
Precisão intradia						
	3,7µg/mL		7,5µg/mL		15µg/mL	
	média	DPR	média	DPR	média	DPR
EF	48,38	6,92	64,95	5,86	79,08	3,25
ES	49,30	5,38	64,90	2,55	78,56	2,02

Os resultados representam a média de nove determinações.

Média (porcentagem de inibição) e DPR (%).

EF = extrato fluido e ES = extrato seco solubilizado em solução hidroalcoólica 80 %.

A linearidade representa a relação entre a reposta do instrumento e a concentração do analito. (BRASIL. ANVISA. RE n°899, de 29 de maio de 2003).

A curva de resposta versus concentração do analito encontrada na determinação da atividade seqüestradora do radical superóxido gerado pelo sistema xantina/luminol/XOD apresentou resposta linear (figura 13), obtendo-se valores de coeficiente de correlação linear (r) de 0,977 e 0,991 para extrato fluido e seco, respectivamente. A curva foi construída com sete concentrações diferentes, contemplando uma faixa de concentração de 1,5 $\mu\text{g/mL}$ a 11 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 13: Linearidade encontrada na determinação da atividade seqüestradora do radical superóxido gerado pelo sistema xantina/luminol/XOD. A relação linear entre os dados foi realizada empregando a concentração versus a porcentagem de inibição. Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ EPM.

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis. Em testes de limite de quantificação admite-se desvios menores ou iguais a 20 % (BRASIL. ANVISA. RE n° 899, de 29 de maio de 2003). Os resultados obtidos, apresentados na tabela 4, demonstram que o LQ para o método em questão encontra-se abaixo da concentração de 1,4 $\mu\text{g/mL}$ para ambos extratos, uma vez que na concentração de 0,75 $\mu\text{g/mL}$ encontrou-se grande variabilidade (DPR > 20 %).

Tabela 4: Limite de quantificação do método de determinação da atividade antioxidante pelo sistema xantina/luminol/XOD no extrato fluido e seco de própolis verde.

Limite de quantificação						
	0,75µg/mL		1,4µg/mL		5,6µg/mL	
	média	DPR	média	DPR	média	DPR
EF	12,99	27,12	23,35	5,82	50,78	4,08
ES	17,43	25,32	24,50	9,74	47,60	2,34

Os resultados representam a média de três determinações.

Média (porcentagem de inibição) e DPR (%).

EF = extrato fluido e ES = extrato seco solubilizado em solução hidroalcoólica 80 %.

4.2.2. Atividade seqüestradora dos radicais gerados no sistema H_2O_2 /luminol/HRP por quimioluminescência

Embora os detalhes dos mecanismos exatos da reação H_2O_2 /luminol/HRP permaneçam desconhecidos parece que a enzima horseradish peroxidase (HRP) catalisa a oxidação de diversas moléculas como o luminol na presença de peróxido de hidrogênio. 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 que então se decompõe para render um di-ânion 3-aminofalato eletronicamente excitado que emite luz ao retornar ao estado basal (THORPE & KRICKA, 1986; DU et al.,2001).

Misra & Squatrito (1982) relatam que o radical superóxido é um intermediário desta reação e um essencial componente na produção da luz. A importância do radical superóxido na propagação desta reação foi demonstrada pela inibição da luminescência pela superóxido dismutase, a qual remove O_2^- do meio. Entretanto, esta inibição é limitada. O O_2^- na presença de peróxido de hidrogênio coopera na geração do radical hidroxila e oxigênio singlete. Difenilfuran, um seqüestrador de oxigênio singlete teve pouco efeito na inibição da emissão da luz neste sistema, indicando que o oxigênio singlete contribui pouco na luminescência. No entanto, seqüestradores de radicais hidroxilas, como manitol, benzoato e histidina, inibiram a

luminescência e confirmaram que o radical hidroxila está envolvido na produção da luminescência neste sistema.

A inibição da luz emitida neste sistema pode acontecer por inibição da enzima HRP ou por seqüestro dos radicais formados reduzindo a oxidação do luminol e conseqüentemente a luz emitida.

Os extratos fluido e seco de própolis verde apresentaram propriedade seqüestradora de radicais gerados no sistema H_2O_2 /luminol/HRP, revelando valores de IC_{50} de 77,40 $\mu g/mL$ e 84,46 $\mu g/mL$, respectivamente. O extrato seco apresentou uma atividade menor quando comparado ao extrato fluido, sendo necessária uma quantidade de 9,12 % a mais de extrato seco para atingir a mesma porcentagem de inibição que o extrato fluido (figura 14).

Assim como na avaliação da atividade antioxidante pelo método xantina/luminol/XOD, Marquele e colaboradores (2005), em um estudo de avaliação da atividade antioxidante da própolis marrom, descreveram que a atividade deste extrato de própolis é devido ao seqüestro de radicais e não por inativação enzimática. Assim, acredita-se que a atividade antioxidante dos extratos de própolis verde seja atribuída, principalmente, pelo seqüestro de radicais e não por inativação da enzima HRP.

Figura 14: Curva de inibição da emissão da luz da reação luminescente H_2O_2 /luminol/HRP encontrada para extrato fluido e seco de própolis verde. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de três determinações.

Marquele e colaboradores (2005) estudaram a inibição da luminescência neste sistema pelo extrato fluido e glicólico de própolis marrom e encontraram valores de IC_{50} equivalentes a 0,22 $\mu\text{L/mL}$ e 0,24 $\mu\text{L/mL}$ (cerca de 220 $\mu\text{g/mL}$ e 240 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente. Uma quantidade bem mais elevada que a encontrada neste trabalho, indicando que a própolis verde é mais efetiva neste sistema que a própolis estudada por Marquele e colaboradores (2005).

4.2.2.1. Validação da atividade seqüestradora dos radicais gerados no sistema H_2O_2 /luminol/HRP por quimioluminescência

A avaliação da reprodutibilidade do método de determinação da atividade seqüestradora de radicais gerados pelo sistema H_2O_2 /luminol/HRP foi realizada utilizando três concentrações diferentes de extrato fluido e seco de própolis verde. Foram realizadas nove ($n=9$) determinações para precisão intradia e interdia. O método demonstrou-se reprodutível tanto na precisão intradia quanto na precisão interdia, em todas as concentrações avaliadas e para

ambos os extratos (tabela 5), exceto na concentração de 40 µg/mL para extrato seco, onde o coeficiente de variação foi maior que 15 %, mesmo para extrato fluido houve uma maior variabilidade nesta concentração.

Tabela 5: Precisão do método de determinação da atividade antioxidante pelo sistema H₂O₂/luminol/HRP no extrato fluido e seco de própolis verde.

Precisão interdia						
	40µg/mL		80µg/mL		120µg/mL	
	média	DPR	média	DPR	média	DPR
EF	16,55	12,24	51,88	7,13	79,24	5,38
ES	15,98	8,17	49,28	7,32	76,78	4,70
Precisão intradia						
	40µg/mL		80µg/mL		120µg/mL	
	média	DPR	média	DPR	média	DPR
EF	16,96	13,22	55,09	12,86	73,89	3,86
ES	15,80	16,57	49,63	6,72	79,43	6,49

Os resultados representam a média de nove determinações.

Média (porcentagem de inibição) e DPR (%).

EF = extrato fluido e ES = extrato seco solubilizado em solução hidroalcoólica 80 %.

A curva de resposta versus concentração do analito encontrada na determinação da atividade sequestradora dos radicais gerados pelo sistema H₂O₂/luminol/HRP apresentou resposta linear direta (figura 15). Encontrou-se relação linear entre os dados obtendo-se valores de coeficiente de correlação linear (r) de 0,988 e 0,987 para extrato fluido e seco, respectivamente. A curva foi construída com seis concentrações diferentes, contemplando uma faixa de concentração de 40 µg/mL a 150 µg/mL.

Figura 15: Linearidade encontrada na determinação da atividade seqüestradora dos radicais gerados pelo sistema H_2O_2 /luminol/HRP. A relação linear entre os dados foi realizada empregando concentração versus a porcentagem de inibição. Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ EPM.

Não se encontrou o limite de quantificação até a concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, acredita-se que esta seja a concentração próxima ao limite de quantificação deste método, uma vez que esta concentração já apresenta uma variabilidade considerável (tabela 5).

4.2.3. Atividade inibidora da peroxidação lipídica

A formação de radicais peroxila ($\text{RO}_2^\bullet$) é o maior passo na propagação da peroxidação lipídica, mas $\text{RO}_2^\bullet$ pode ser também formado em sistemas não lipídicos, como as proteínas. A decomposição de peróxidos por aquecimento ou por transição catalisada por íons metálicos pode gerar ambos radicais peroxila ($\text{RO}_2^\bullet$) e alcoxila ($\text{LO}^\bullet$) (HALLIWELL et al., 1995).

Em um sistema livre de peróxidos lipídicos, a presença de Fe^{+2} inicia a reação de Fenton/Harber Weiss, gerando radical hidroxila (Figura 16). O radical hidroxila produzido pode iniciar um processo de peroxidação lipídica removendo átomos de hidrogênio dos fosfolipídeos presentes nas mitocôndrias e formando radicais lipídeos peroxila. Assim, podem

induzir uma seqüência de reações de propagação, onde outros radicais como os hidroperóxidos são formados (RODRIGUES et al., 2002).

Figura 16: Representação esquemática da reação de Fenton. Reproduzido de RONSEIN e colaboradores, 2006.

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 ferro estes peróxidos lipídicos são decompostos e originam radicais peroxila e alcoxila, sendo que ambos radicais podem propagar a peroxidação lipídica (HALLIWELL e 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-hidroxinonanal e principalmente malondialdeído (MDA). O MDA é um aldeído que reage com duas moléculas de TBA (ácido tiobarbitúrico), gerando um cromóforo rosa que é detectado espectrofotometricamente em 535 nm (MARQUELE et al., 2005).

O extrato fluido de própolis verde apresentou propriedade inibidora da peroxidação lipídica, verificada através da inibição da formação de espécies reativas ao TBA, revelando valor de IC₅₀ de 10,09 µg/mL (figura 17).

Deng e colaboradores (1997) descreveram que os flavonóides agem como antioxidantes muitas vezes por quelar íons ferro e sequestrar radicais peroxila. Desta forma, acredita-se que a ação da própolis verde em inibir a peroxidação lipídica seja devido à fração química de

flavonóides presentes nesta e provavelmente por quelar íons ferro ou seqüestrar radicais peroxila.

Figura 17: Curva de inibição da peroxidação lipídica encontrada para extrato fluido de própolis verde. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de três determinações.

Choi e colaboradores (2006) verificaram a inibição, pela própolis coreana, da peroxidação do ácido linoléico induzida por H_2O_2 UV-fotólise, monitorando as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Eles observaram que esta própolis é capaz de inibir 90 % da peroxidação do ácido linoléico na concentração de 100 μ g/mL. E ainda que, a própolis brasileira avaliada neste mesmo ensaio apresentou baixa atividade quando comparada à própolis coreana.

Russo e colaboradores (2002) verificaram também a inibição da peroxidação do ácido linoléico, induzida por H_2O_2 UV-fotólise, pelo extrato de própolis com CAPE e sem CAPE e observaram que a própolis com CAPE é mais eficiente em reduzir a formação de TBARS que a própolis sem CAPE.

Marquele e colaboradores (2005) encontraram em seu estudo valores de IC_{50} equivalentes a 0,016 $\mu\text{L/mL}$ e 0,012 $\mu\text{L/mL}$ (cerca de 16 $\mu\text{g/mL}$ e 12 $\mu\text{g/mL}$) para extrato fluido e glicólico de própolis marrom. E ainda, um estudo realizado por Di mambro & Fonseca (2005) descreve que o α -tocoferol, um antioxidante lipofílico de origem endógena encontrado nos tecidos, demonstrou IC_{50} de 0,48 $\mu\text{g/mL}$ neste ensaio.

Comparando os resultados descritos nas literaturas acima citadas com os resultados obtidos pela própolis verde neste ensaio, observa-se que a própolis verde não possui atividade inibidora da peroxidação lipídica tão eficiente quanto o α -tocoferol, mas sua atividade demonstrou-se equivalente aos outros extratos de própolis.

4.2.3.1. Validação da atividade inibidora da peroxidação lipídica

A avaliação da reprodutibilidade do método de determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica foi realizada em três concentrações diferentes de extrato fluido de própolis verde. Foram realizadas nove ($n=9$) determinações para precisão interdia e três ($n=3$) determinações para precisão intradia. O método demonstrou-se reprodutível em duas concentrações avaliadas (tabela 6). Apenas na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, na precisão interdia, o método não foi reprodutível, apresentando coeficiente de variação foi maior que 15%.

Tabela 6: Precisão do método de determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica no extrato fluido de própolis verde.

Precisão interdia						
	10µg/mL		20µg/mL		40µg/mL	
	média	DPR	média	DPR	média	DPR
EF	44,03	15,75	74,22	10,03	93,50	2,62
Precisão intradia						
	10µg/mL		20µg/mL		40µg/mL	
	média	DPR	média	DPR	média	DPR
EF	50,50	9,76	82,17	4,11	92,37	3,61

Os resultados representam a média de nove determinações.

Média (porcentagem de inibição) e DPR (%).

EF = extrato fluido e ES = extrato seco solubilizado em solução hidroalcoólica 80 %.

A curva de resposta versus concentração do analito encontrada na determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica apresentou resposta linear (figura 18), obtendo-se coeficiente de correlação linear (r) de 0,981. A curva foi construída com quatro concentrações diferentes, contemplando uma faixa de concentração de 10 µg/mL a 20 µg/mL.

O LQ para o método em questão se encontra abaixo da concentração de 10 µg/mL para ambos extratos, uma vez que nesta concentração a variabilidade é aceitável ($DPR < 20\%$).

Figura 18: Linearidade encontrada na determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica pelo extrato fluido de própolis verde. Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ EPM.

4.2.4. Atividade seqüestradora do radical hidroxila

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 seqüestrados pelo EDTA atacam a deoxirribose e iniciam uma série de reações que originam a formação de MDA (HALLIWELL et al., 1987).

A taxa de degradação de 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 de degradação da deoxirribose (MDA) quando aquecidos com TBA, em pH baixo formam um cromóforo rosa que é então espectrofotometricamente avaliado em 535 nm (HALLIWELL et al., 1987; ARUOMA, 1994).

Qualquer outra molécula adicionada que seja capaz de reagir com o radical hidroxila poderá competir com a deoxirribose por este radical, diminuindo assim a degradação deste açúcar e subseqüentemente a formação de MDA. O uso de EDTA, no meio de reação, é essencial quando se utiliza substância queladora de íon ferro, pois a inibição da degradação da deoxirribose ferro dependente, na ausência do EDTA, dependerá não somente da habilidade do antioxidante em reagir com o radical hidroxila, mas também de sua capacidade em formar complexos com íon ferro (HALLIWELL et al., 1987; ARUOMA, 1994).

Os extratos fluído e seco de própolis verde apresentaram propriedade seqüestradora do radical hidroxila, revelando valores de IC_{50} de 1,79 $\mu\text{g/mL}$ e 1,48 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (figura 19). O extrato fluído demonstrou-se 1,2 vez mais eficiente que o extrato seco na atividade seqüestradora de radicais hidroxilas.

Figura 19: Curva da atividade seqüestradora de radical hidroxila encontrada para extrato fluido e seco de própolis verde. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de três determinações.

Marquele e colaboradores (2005) encontraram valores de IC_{50} para inibição da degradação da deoxirribose, para extrato fluido e glicólico de própolis, de 0,024 μ L/mL e 0,035 μ L/mL (cerca de 24 μ g/mL e 35 μ g/mL), respectivamente. A própolis verde foi cerca de 19 vezes mais eficaz neste sistema que a própolis estudada por Marquele e colaboradores (2005).

4.2.4.1. Validação da atividade seqüestradora do radical hidroxila

A avaliação da reprodutibilidade do método de determinação da atividade seqüestradora do radical hidroxila foi realizada em três concentrações diferentes de extrato fluido e seco de própolis verde. Foram realizadas nove ($n=9$) determinações para precisão intradia e interdia. O método demonstrou-se reprodutível tanto na precisão intradia quanto na precisão interdia, em duas concentrações avaliadas e para ambos os extratos (tabela 7). Apenas na concentração de

0,3 µg/mL, onde o coeficiente de variação foi maior que 15 %, não havendo reprodutibilidade do método.

Tabela 7: Precisão do método de determinação da atividade sequestradora de radical hidroxila no extrato fluido e seco de própolis verde.

Precisão interdia						
	0,3µg/mL		2µg/mL		10µg/mL	
	média	DPR	média	DPR	média	DPR
EF	16,81	13,51	50,44	5,65	74,00	2,84
ES	19,73	19,92	51,75	7,76	71,21	6,03
Precisão intradia						
	0,3µg/mL		2µg/mL		10µg/mL	
	média	DPR	média	DPR	média	DPR
EF	15,59	25,91	48,65	5,31	76,20	2,90
ES	15,27	21,12	46,73	4,41	65,68	7,25

Os resultados representam a média de nove determinações.

Média (porcentagem de inibição) e DPR (%).

EF = extrato fluido e ES = extrato seco solubilizado em solução hidroalcoólica 80 %.

A curva de resposta versus concentração do analito na determinação da atividade sequestradora do radical hidroxila não pode ser considerada, pois a faixa linear encontrada apresenta concentrações com variabilidade do método muito grande (DPR>20 %) (figura 20).

Figura 20: Linearidade encontrada na determinação da atividade seqüestradora de radicais hidroxilas. A relação linear entre os dados foi realizada empregando a concentração versus a porcentagem de inibição. Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ EPM.

Os valores de coeficiente de correlação encontrados estão abaixo do especificado para ensaios bionalíticos ($r=0,98$) na literatura. Isto pode ser devido à variabilidade do método nesta faixa de concentração.

Os resultados obtidos, apresentados na tabela 7, demonstram ainda, que o LQ para o método em questão se encontra em torno da concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$ para ambos extratos, uma vez que na concentração de 0,3 $\mu\text{g/mL}$ se encontrou $\text{DPR} > 20\%$.

4.3. Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato fluido de própolis verde

Foram desenvolvidas três formulações, gel-creme (F 01), emulsão (F 02) e gel (F 03), contendo ou não extrato fluido de própolis verde. A composição das formulações desenvolvidas foi anteriormente apresentada na tabela 1. As características de cada constituinte das formulações estão descritas a seguir.

O hostacerin SAF[®] é um blend entre doadores de viscosidade e emulsionantes desenvolvida para possibilitar a preparação de emulsões a frio pela simples adição de água e conservantes em temperatura ambiente. Possui característica aniônica, não oleosa e com excelente estabilidade a diversos princípios ativos farmacêuticos e cosméticos. Sua concentração recomendada é de 3 a 10 %.

O hostacerin SAF[®] é composto por um doador de viscosidade, emulsionantes e emolientes. Doador de viscosidade: Aristoflex[®] AVC (Ammonium Acryloyldimethyl-taurate / VP Copolymer) que é formador de gel com excelente estabilidade e sensorial agradável. Emulsionantes: Emulsogen[®] SRO (Rapeseed Oil Sorbitol Esters), emulsionante de origem vegetal extremamente suave, baseado em óleo de canola e isento de oxido de etileno ou PEG; Hostaphat KL[®] 340D (Trilaureth-4 Phosphate) que é um triéster fosfórico de álcool laurílico etoxilado, caracterizado por um efeito emoliente e emulgador universal, aumentando a capacidade de retenção de água na pele, por ser um éster fosfórico, tem grande afinidade com os fosfolipídeos da pele. Emolientes: óleo mineral e palmitato de isopropila (PHARMASPECIAL, 2005).

A Polawax (álcool cetoestearílico e monoestearato de sorbitano etoxilado 20 OE) é uma cera auto-emulsionante não-iônica suave O/A. Sistema estável de liberação para muitos ativos em vários pH. Tolerante a eletrólitos e dispersante. Concentração recomendada: 2 a 25 % (VIAFARMANET, 2005).

O oleato de isodecila (cetiol V) assemelha-se aos lipídeos naturais da pele, apresenta boa fluidez e capacidade de penetração, é um emoliente de alta polaridade e oleosidade, possui excelente poder de espalhamento, agente reengordurante, doador de brilho, e solubilizante de ativos lipossolúveis. Concentração recomendada: 1,0– 12,0 % (VIAFARMANET, 2005).

O palmitato de isopropila é um éster emoliente de cadeia ramificada largamente utilizado em produtos para o cuidado pessoal. Apresenta propriedades emolientes, lubrificante,

dispersante, diluente para óleos vegetais e minerais para aumentar o poder solvente. Excelente veículo ou diluente para ingredientes ativos e filtros solares químicos. Concentração recomendada: 1 a 10 % (PHARMASPECIAL, 2005).

A glicerina bidestilada ou glicerol é um líquido xaroposo, incolor e inodoro, que possui propriedades emoliente e umectante. Age ainda, como solvente de princípios ativos (VIAFARMANET, 2005).

O Propilenoglicol é um importante solvente na indústria de essências e princípios ativos para incorporação em preparações farmacêuticas e cosméticas. Seu poder de inibição da fermentação e do emboloramento é igual ao do álcool etílico (PHARMASPECIAL, 2005).

O Natrosol 250HHR (hidroxietilcelulose de alta massa molecular) é um polímero gelificante com caráter não-iônico. Suas principais características são a facilidade de preparo (não requer neutralização) e a estabilidade em uma ampla faixa de pH. Esse é o principal motivo pelo qual Natrosol 250HHR é amplamente utilizado na área farmacêutica, dando origem a géis que são úteis como veículo para diversos ácidos e princípios ativos despigmentantes (ocorre pouca variação na viscosidade das soluções de Natrosol em pH 2 a 12; as maiores viscosidades são obtidas em pH 6,5 a 8,0 e as menores ocorrem em pH < 3 como resultado da hidrólise do polímero). Natrosol 250HHR pode ser utilizado na presença de tensoativos aniônicos tais como o Lauril Sulfato de Sódio, o que faz dele um agente espessante para formulações de shampoo e sabonete líquido. Concentração recomendada: 0,5 a 3,0 % (PHARMASPECIAL, 2005).

O Tampão McIlvaine pH 5,0 foi utilizado em substituição da água, na formulação gel, com o objetivo de minimizar futuras alterações de pH no estudo de estabilidade. O mesmo foi preparado pela mistura de Na_2HPO_4 (0,2 M) (17,81 g/L) e ácido cítrico (0,1 M) (21 g/L), o pH foi corrigido para 5,0 com ácido cítrico (0,1 M), com auxílio de peagômetro digital.

O Phenova[®] é um conservante líquido destinado à preservação de cosméticos e

formulações farmacêuticas de todos os tipos. Constitui de uma combinação de fenoxietanol, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno. É solúvel em propilenoglicol e etanol. E ainda, a mistura de 8 % de propilenoglicol e Phenova[®] a 0,5 % é solúvel em água. Possui um amplo alcance de ação antimicrobiana contra as bactérias gram-negativas, gram-positivas, leveduras e fungos na maioria dos sistemas. É quimicamente inerte e, portanto, compatível com a maioria dos compostos químicos. Deve ser usado nas concentrações de 0,25 a 1 % dependendo das condições (DERMATIVA, 2005).

Nipaguard[®] é uma solução a 55 % de DMDM Hidantoína em água. Conservante altamente solúvel em água e adequado ao uso em uma ampla gama de produtos para cuidado pessoal e produtos baseados em sistemas detergentes. Oferece os seguintes benefícios: Amplo espectro de atividade contra bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos e leveduras; Efetivo em pH de 3 a 8; Não-irritante aos olhos, pele ou membranas mucosas nas concentrações normais de uso (0,15 a 0,4 %); Mantém sua atividade na presença de surfactantes não-iônicos e na maioria dos ingredientes utilizados em cosmética; Altamente solúvel em água e facilmente incorporado aos produtos; Excelentes características toxicológicas (PHARMASPECIAL, 2005).

Álcool etílico e polissorbato 20 (Monolaurato de polioxietileno (20) sorbitano) foram adicionados às formulações com a função de co-solventes do extrato de própolis.

O ácido hialurônico é um polissacarídeo da família das glicosaminoglicanas, naturalmente presente na derme. Entre as várias funções desempenhadas pela derme, a regulação da hidratação é sem dúvida uma das mais importantes. O ácido hialurônico é um dos mais importantes componentes da derme envolvidos nesta função, devido à sua elevada capacidade de retenção de água. Quando aplicado topicamente, forma um filme hidratante sobre a epiderme, que ajuda a compensar a perda de água, melhorando as condições da pele e proporcionando desta forma elasticidade, suavidade e uma superfície mais homogênea. É

utilizado em géis, cremes e loções hidratantes, tónicos para peles secas e sensíveis, hidratantes para peles oleosas, produtos para área dos olhos, produtos anti-idade, hidratantes faciais e corporais e produtos pós-solares. Sua concentração usual é de 1 a 5 % (PHARMASPECIAL, 2005).

As formulações desenvolvidas apresentaram conteúdo graxo distintos, em virtude dos componentes utilizados em seu preparo. Assim, a formulação gel-creme (F 01), formulada a partir de um blend de doador de viscosidade e emulsionantes, apresentou conteúdo graxo intermediário às formulações F 02 e F 03. A F 02, uma emulsão, formulada com cera auto emulsionante polawax, demonstrou elevado conteúdo graxo, devido a presença de oleato isodecila e palmitato de isopropila. Já a F 03, um gel, formulado com polímero gelificante natrosol, não demonstra a presença de substâncias graxas em sua composição.

4.3.1. Estudo da estabilidade

O teste de estabilidade é um conjunto de testes realizados para obter informações sobre a estabilidade de produtos farmacêuticos visando definir seu prazo de validade em condições de armazenamento especificadas (BRASIL. ANVISA. RE nº 1, de 29 de julho de 2005). Neste estudo as formulações desenvolvidas foram avaliadas quanto a sua estabilidade preliminar e diferentes parâmetros físico-químicos foram analisados.

4.3.1.1. Estabilidade física

4.3.1.1.1. Características organolépticas

As formulações desenvolvidas apresentaram-se estáveis quanto às características organolépticas até o período de 60 dias em todas as condições de temperatura e umidade

avaliadas. Após este período, a F 01 apresentou sinais de instabilidade, ocorreu leve escurecimento da formulação, sendo este escurecimento observado a 30°C / 75% UR e 40°C / 75 % UR. Além do mais, após o período de 90 e 180 dias a alteração de coloração desta foi mais acentuada. Pode-se observar ainda, que a formulação placebo P 01 também demonstrou leve escurecimento. As demais formulações não apresentaram sinais de instabilidade significativos até o período de 60 dias. No entanto, após este período foi observado leve escurecimento destas formulações nas temperaturas de 30°C /75 % UR e 40°C /75 % UR.

Segundo o guia de estabilidade de produtos cosméticos, publicado pela ANVISA em 2005, o produto cosmético deve manter-se íntegro durante todo o teste, mantendo seu aspecto inicial em todas as condições, exceto em temperaturas elevadas, freezer ou ciclos, em que pequenas alterações são aceitáveis. A cor deve permanecer estável por, no mínimo, 15 dias à luz solar e pequenas alterações são aceitáveis em temperaturas elevadas. Diante deste fato, acredita-se que as formulações F 02, F 03, P 02, e P 03 podem ser consideradas estáveis frente ao teste utilizado até o período avaliado. Após 60dias, as formulações F 01 e P 01 demonstraram grandes modificações na coloração e foram consideradas instáveis após 60 dias de armazenamento, frente ao teste realizado.

4.3.1.1.2. Perda de água

No estudo de estabilidade em diferentes condições de armazenamento verificou-se também a perda de água das formulações nos diferentes períodos de análise, uma vez que muitas variações físico-químicas poderiam estar ocorrendo devido á perda de parte da fase aquosa por evaporação.

A porcentagem de perda de água das formulações variou de acordo com a temperatura a qual a formulação foi armazenada, sendo a temperatura de 40°C, a qual ocorreu a maior perda

(figura 21). No entanto, esta perda não ultrapassou 5 %, pois mesmo utilizando altas temperaturas havia também o controle de UR, a qual foi mantida a 75 %, evitando grandes perdas de água pelas formulações. Assim, deduz-se que as variações físico-químicas que possam ter ocorrido não seja devido à perda da fração aquosa da formulação.

Figura 21: Perda de água das emulsões desenvolvidas, após armazenamento em diferentes condições e em diferentes períodos de análise. Onde, A = F 01, B = F 02, C = P 01, D = P 02, E = F 03 e F = P 03.

4.3.1.1.3. Teste de centrifugação

As formulações F 01, F 02, P 01 e P 02 apresentaram-se estáveis frente ao teste de centrifugação, após 48 horas da manipulação, estando estas acondicionadas em temperatura ambiente. Até o período de 180 dias, as formulações armazenadas nas diferentes condições de temperatura e umidade também permaneceram estáveis a este teste.

4.3.1.1.4. Tamanho das gotículas

Na determinação do tamanho das gotículas podem ser utilizados vários métodos. Um deles é por microscopia, que é um método barato e pode evidenciar processos de recristalização dos princípios ativos e aditivos, pois não é necessária a diluição da amostra. Uma desvantagem é que o diâmetro é obtido somente de duas dimensões da partícula: comprimento e largura, não leva em consideração a espessura da gotícula. Outro inconveniente é o elevado número de gotículas que devem ser analisadas para obter um resultado confiável. É indicado para determinação de tamanho de gotículas entre 0,2 μm a aproximadamente 100 μm de diâmetro (JATO, 1997; MARTIN, 1993).

Outro método utilizado é o emprego de coulter, o qual baseia-se em dois princípios: na eletroforese, a qual caracteriza as partículas pelo seu movimento em um campo elétrico, e no espalhamento de luz incidida sobre as gotículas. Traz o inconveniente de precisar diluir a amostra. Entretanto, tem sido demonstrado que as alterações causadas pela diluição da amostra são pouco importantes. O aparelho utilizado neste trabalho, coulter Delsa 440SX, avalia gotículas entre 0,01 μm a aproximadamente 30 μm de diâmetro (JATO, 1997; MARTIN, 1993).

E ainda, outro método empregado é utilização de equipamentos baseados na difração de raios laser, os quais são utilizados principalmente quando o tamanho das gotículas são invisíveis ao microscópio (JATO, 1997).

Alterações do tamanho mediano das partículas ou da distribuição de tamanho das gotículas são parâmetros importantes na avaliação da estabilidade e na classificação de sistemas emulsionados. Um aumento no tamanho dos glóbulos pode indicar a existência de processos de coalescência e, portanto baixa estabilidade da formulação. De acordo com o tamanho médio das gotículas as emulsões podem ser classificadas em emulsões, nanoemulsões ou microemulsões.

Neste trabalho, foi empregada a microscopia para avaliação do tamanho das gotículas, mas devido à necessidade de confirmação dos resultados adquiridos para F 01 e P 01, outra metodologia, utilizando coulter, foi empregada.

Pode ser observado que a F 01 apresentou-se mais homogênea e apresentou gotículas menores que a F 02. A homogeneidade das gotículas foi expressa pelo EPM (erro padrão da média) e quanto maior o EPM, mais heterogênea foi considerada a formulação. A F 01 apresentou inicialmente gotículas com cerca de $3,0 \mu^2$ de área, calculando o raio pela área do círculo ($2\pi.r^2$), onde r = raio, encontra-se ± 700 nm de raio. Já a F 02, apresentou gotículas bem maiores com cerca de $16,0 \mu^2$ de área (± 1600 nm de raio) e com EPM maior, indicando maior heterogeneidade do tamanho de suas gotículas. As formulações P 01 e P 02 apresentaram tamanho e homogeneidade de gotículas similares a F 01 e F 02, respectivamente, indicando que a adição de EF a estas não alterou suas características microscópicas.

No teste de estabilidade foi observado redução significativa da área das gotículas para F 01, após o período de 90 dias com armazenamento a 30°C /75 % UR (figura 22C) e após 60 e 90 dias com armazenamento a 40°C /75 % UR (figura 22E), sendo esta redução de 40,46 %, 41,41 % e 36,62 %, respectivamente, com relação à área inicial. A F 02 demonstrou aumento

significativo da área das gotículas quando armazenada a 30°C /75 % UR após o período de 90 dias (figura 22D), sendo o aumento de 3,03 vezes em relação a área inicial, indicando sinais de instabilidade. O teste utilizado para análise estatística foi ANOVA de uma via, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunnett's, utilizando como grupo controle as áreas das gotículas inicialmente ao estudo de estabilidade. Em Apêndices A até F encontra-se as fotomicrografias das emulsões P 01 e F 01, e em Apêndices G até M encontra-se as fotomicrografias das emulsões P 02 e F 02, armazenadas em diferentes condições e períodos de análise.

Figura 22: Área das gotículas das emulsões desenvolvidas, determinada microscopicamente, após armazenamento em diferentes condições e em diferentes períodos de análise. Os resultados representam a média de quinze determinações $\pm$ EPM. Onde, A – armazenamento a 5°C para F 01 e P 01, B - 5°C para F 02 e P 02, C - 30°C / 75 % UR para F 01 e P 01, D - 30°C / 75 % UR para F 02 e P 02, E - 40°C / 75 % UR para F 01 e P 01 e F - 40°C / 75 % UR para F 02 e P 02.

Na confirmação dos resultados adquiridos para F 01 e P 01 através de microscopia, os resultados observados no tempo inicial e após o período de 90 dias de armazenamento, em diferentes condições de temperatura e umidade, demonstram que a 5°C a formulação P 01 apresentou aumento de 26,2 % do tamanho de suas gotículas. Já a F 01, armazenada a 30°C

com 75 % UR, apresentou aumento de 54 % do tamanho de suas gotículas e a 40°C com 75 % de UR, o aumento foi de 38 % (figura 23).

Figura 23: Tamanho das gotículas, determinado pelo coulter DELSA 440SX, para F 01 e P 01, armazenados em diferentes condições de temperatura e umidade. Os resultados apresentados representam apenas o período após 90 dias.

Onde, A: F 01 = F 01 inicialmente, F 01 5°C = F 01 armazenada a 5°C, F 01 30°C = F 01 armazenada a 30°C / 75 % UR, F 01 40°C = F 01 armazenada a 40°C / 75 % UR e B: P 01 = P 01 inicialmente, P 01 5°C = P 01 armazenada a 5°C, P 01 30°C = P 01 armazenada a 30°C / 75 % UR, P 01 40°C = P 01 armazenada a 40°C / 75 % UR.

Foram obtidos resultados diferentes utilizando metodologias diferentes. Acredita-se que os resultados obtidos pela microscopia não sejam válidos, pois o número de gotículas analisadas foi pequeno ($n=15$) e o erro nesta metodologia é muito grande. Martin (1993) descreveu que em métodos microscópicos, 300 a 500 gotículas devem ser contadas para obter uma boa estimativa de tamanho de gotículas, o que torna o método vagaroso e tedioso. Assim, acredita-se que ao utilizar um número maior de gotículas, possa ocorrer aproximação dos resultados obtidos das duas metodologias.

4.3.1.1.5. Análise microscópica

As formulações desenvolvidas foram avaliadas quanto à presença de estruturas líquido cristalinas, as quais são responsáveis por aumentar a estabilidade e a solubilidade de

substâncias pouco solúveis em água, ou na fase oleosa, modulam a liberação de fármacos e promovem a hidratação da superfície da pele (HENRIQUE DOS SANTOS et al., 2005). Esta avaliação foi realizada através de microscopia de luz polarizada, utilizando microscópio BX50 da Olympus. Foi observada a presença ou ausência destas estruturas nas formulações e determinada, através das características microscópicas, o tipo de mesofase destes cristais. E ainda, no estudo de estabilidade, foi observada a possível mudança de mesofase destas estruturas.

Não foi observada a formação de estruturas líquido-cristalinas na F 01. No entanto, na F 02 foi observada estas estruturas, as quais não foram influenciadas pela adição de EF e são características de mesofase lamelar (figuras 24 e 25).

Figura 24: Estudo microscópico com luz polarizada da F 01 em aumento de 400x. A figura foi dividida em quatro campos. À esquerda da figura (campos A e C) está a microscopia da formulação sem EF (P 01) e à direita (campos B e D) está a microscopia da formulação com EF (F 01). Acima da figura, em campo enegrecido (A e B), estão as microscopias com a luz polarizada e abaixo estão as microscopias sem luz polarizada.

Figura 25: Estudo microscópico com luz polarizada da F 02 em aumento de 200x. As figuras foram divididas em dois campos. À esquerda das figuras (campo A) estão as microscopias sem luz polarizada e à direita, em campo enegrecido (campo B), estão as microscopias com luz polarizada. Onde, 1- F 02 e 2 - P 02.

Segundo Eccleston (1997) os álcoois graxos de cadeia longa, como álcool cetosteárfico, favorecem a formação de estruturas cristalinas. Assim, deduz-se que a presença de cristais líquidos na F 02 seja devido à cera autoemulsionante polawax, a qual é composta por álcool cetosteárfico e monoestearato de sorbitano etoxilado.

Embora a F 02 apresente estruturas líquido-cristalinas que levam a melhor estabilidade da formulação, esta apresentou alterações significativas quanto ao tamanho de suas gotículas, no estudo de estabilidade. Entretanto, esta alteração não levou a separação de fase da emulsão.

Quanto à estabilidade das estruturas líquido-cristalinas em diferentes condições de armazenamento e períodos de análise, não foi observado modificações na organização destas estruturas, tipo de mesofase, até 180 dias de armazenamento em diferentes temperaturas.

4.3.1.1.6. Avaliação do pH

Houve diferença significativa, entre as formulações e seus placebos correspondentes quanto a medida de pH, frente à análise de variância ANOVA de uma via, seguido de teste de múltiplas comparações de Tukey-Kramer, com exceção da formulação 03, a qual não demonstrou variação de pH significativa após adição de extrato de própolis, conforme esperado, devido ao sistema tampão presente nesta formulação. Após a adição do ativo o pH reduziu em 12,21 % entre P 01 e F 01 (pH 5,73 - P 01 e 5,03 - F 01). Entre P 02 e F 02 o pH reduziu em 25,43 % (pH 5,86 - P 02 e 4,37 - F 02) (tabela 8). Os valores de pH das formulações mesmo sendo ácidos foram considerados compatíveis com o pH da pele, uma vez que a pele apresenta pH levemente ácido (4,6 - 5,8) (LEONARDI, GASPAR e MAIA CAMPOS, 2002).

Tabela 8: Medida do pH das emulsões armazenadas em diferentes condições.

Formulações / armazenamento	pH inicial	pH 30 dias	pH 90 dias	pH 180 dias
F 01 / 5°C	5,07±0,02	5,05±0,01	4,70±0,03	4,70±0,01
F 01 / 30°C / 75% UR	5,07±0,02	5,04±0,01	4,61±0,01	4,43±0,00
F 01 / 40°C / 75% UR	5,07±0,02	4,99±0,02	4,49±0,01	4,34±0,01
P 01 / 5°C	5,97±0,02	6,06±0,01	5,65±0,01	5,73±0,01
P 01 / 30°C / 75% UR	5,97±0,02	6,02±0,01	5,54±0,00	5,55±0,01
P 01 / 40°C / 75% UR	5,97±0,02	5,90±0,014	5,34±0,01	5,20±0,00
F 02 / 5°C	4,38±0,01	4,41±0,01	3,97±0,02	3,95±0,01
F 02 / 30°C / 75% UR	4,38±0,01	4,35±0,04	3,93±0,09	3,74±0,03
F 02 / 40°C / 75% UR	4,38±0,01	4,26±0,01	3,95±0,01	3,69±0,02
P 02 / 5°C	5,78±0,05	5,55±0,03	5,33±0,03	5,84±0,01
P 02 / 30°C / 75% UR	5,78±0,05	6,00±0,01	5,33±0,03	5,14±0,10
P 02 / 40°C / 75% UR	5,78±0,05	5,72±0,01	5,37±0,06	4,40±0,20
F 03 / 5°C	5,05±0,01	4,89±0,00	4,91±0,02	-
F 03 / 30°C / 75% UR	5,05±0,01	4,90±0,01	4,84±0,00	-
F 03 / 40°C / 75% UR	5,05±0,01	4,90±0,03	4,75±0,00	-
P 03 / 5°C	5,34±0,01	5,19±0,01	5,18±0,00	-
P 03 / 30°C / 75% UR	5,34±0,01	5,19±0,01	5,20±0,02	-
P 03 / 40°C / 75% UR	5,33±0,01	5,21±0,03	5,25±0,02	-

Os resultados representam a média de três determinações ± DP.

A variação de pH nas diferentes condições de armazenamento foi parecida para as formulações F 01 e F 02. Foi observado que o pH das formulações adicionadas ou não de EF mantiveram-se estáveis até o período de 30 dias em todas as condições de armazenamento avaliadas. Após o período de 60 dias, foi observado que o pH reduziu, também em todas as condições de armazenamento avaliadas (tabela 8 e figura 26). Observou-se ainda, que a alteração de coloração observada nestas formulações é acompanhada da redução do pH. No entanto, na formulação F 03 não foram observadas alterações de pH significativas, até o período de 90 dias, em todas as condições de armazenamento. Acredita-se que este fato deve-se a presença de sistema tampão adicionado a esta formulação.

Figura 26: Medidas de pH das formulações armazenadas em diferentes temperaturas. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de três determinações. Onde, A: armazenamento a 5°C, B: 30°C / 75 % UR e C: 40°C / 75 % UR.

4.3.1.2. Estabilidade da atividade antioxidante das emulsões

4.3.1.2.1. Avaliação da interferência dos constituintes das formulações na atividade antioxidante

A atividade antioxidante das formulações foi determinada contemplando a faixa de linearidade dos métodos. A porcentagem de inibição conseguida pelo EF não veiculado e a porcentagem de inibição alcançada pelas formulações foram comparadas. Foram utilizadas quantidades equivalentes de EF presente nas formulações e EF não veiculado. As formulações F 01 e F 02 foram avaliadas quanto à atividade antioxidante através da inibição da reação luminescente do sistema xantina/luminol/XOD. Entretanto, a formulação F 03 foi avaliada pela medida da atividade doadora de H^+ ao radical DPPH $^{\bullet}$

As formulações F 01 e F 02 contendo EF apresentaram atividade antioxidante frente ao sistema xantina/luminol/XOD, sendo a porcentagem de inibição de 41,45 %, 40,40 % e 42,42 %, na concentração de 4,1 $\mu\text{g/mL}$ de EF para F 01, F 02 e EF não veiculado (EF), respectivamente. Já na concentração de 11 $\mu\text{g/mL}$ a porcentagem de inibição foi de 62,65 %, 62,47 % e 63,24 % para F 01, F 02 e EF, respectivamente (figura 27).

Figura 27: Porcentagem de inibição da emissão da luz da reação luminescente xantina/luminol/XOD com luminol encontrada pelas formulações e EF não veiculado. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de três determinações.

A formulação F 03 contendo EF apresentou atividade doadora de H^+ ao radical $DPPH^\bullet$, sendo a porcentagem de inibição do sistema de 38,89 % e 34,27 %, na concentração de 0,08 mg/mL de EF para F 03 e EF não veiculado (EF), respectivamente (figura 28).

Figura 28: Atividade doadora de H^+ ao radical $DPPH^\bullet$ pela formulação F 03 e EF não veiculado. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de três determinações.

Não foram observadas diferenças significativas entre as formulações e o EF não veiculado, frente à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunnett's, em nenhum dos sistemas utilizados.

Os resultados sugerem que os componentes das formulações não interferem na atividade antioxidante do extrato de própolis verde. E ainda, P 01, P 02 e P 03 não demonstraram atividade antioxidante, como esperado.

Marquele e colaboradores (2005) também não encontraram diferença de inibição da emissão da luz da reação luminescente xantina/luminol/XOD, em formulações contendo extrato de própolis marrom e o extrato não veiculado. No entanto, foram necessários 0,075 $\mu\text{L/mL}$ de extrato para inibir cerca de 90 % da emissão da luz, enquanto que neste estudo foram necessários 4,1 $\mu\text{g/mL}$ (0,0041 $\mu\text{L/mL}$) de extrato para inibir cerca de 40 %, uma quantidade bem menor.

4.3.1.2.2. Estabilidade antioxidante das formulações

Após, verificada a possível interferência dos constituintes das formulações na determinação da atividade antioxidante pelo sistema xantina/luminol/XOD ou atividade doadora de H^+ ao radical $\text{DPPH}^\bullet$, foi avaliada a estabilidade da atividade antioxidante das formulações em diferentes condições de armazenamento.

A atividade antioxidante permaneceu estável até o período de 180 dias para as formulações F 01, F 02 e EF não veiculado, sob todas as condições de armazenamento avaliadas (figura 29). A F 03 também manteve sua atividade estável até o período de 90 dias, em todas as condições avaliadas (figura 30). Não houve queda significativa da atividade antioxidante frente ao teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste de múltiplas comparações Dunnett's, o qual compara diferentes grupos com um grupo controle. Adotou-se como grupo controle a atividade no tempo zero de armazenamento.

Embora ocorram alterações do pH e da coloração das formulações desenvolvidas, não foi observada alteração significativa da atividade antioxidante destas formulações.

Casagrande e colaboradores (2006) estudaram a estabilidade da atividade funcional, antioxidante, de formulações tópicas contendo quercetina e relataram que a temperatura e período de estocagem influenciam na estabilidade de formulações contendo este flavonóide. Foi observado que cremes e géis cremes não iônicos, contendo este flavonóide, perderam atividade funcional, após 6 meses quando estocados a 4°C e a 45°C e mantendo-se estáveis quando estocadas a temperatura ambiente.

Ao contrário das formulações desenvolvidas no presente trabalho, as formulações antioxidantes desenvolvidas no estudo descrito por Casagrande e colaboradores (2006) demonstraram-se instáveis quanto à atividade funcional em algumas condições de armazenamento, necessitando de condições pré-estabelecidas para seu transporte e armazenagem.

Figura 29: Porcentagem de inibição da emissão da luz da reação luminescente xantina/luminol/XOD encontrada pelas formulações F 01, F 02 e EF não veiculado armazenados em diferentes condições de armazenamento. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de três determinações. Onde, A: armazenamento a 5°C, B: 30°C / 75 % UR e C: 40°C / 75 % UR.

Figura 30: Porcentagem de redução de radicais DPPH[•] encontrada pela formulação F 03 e EF não veiculado armazenados em diferentes condições de armazenamento. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de três determinações. Onde, A: armazenamento a 5°C, B: 30°C / 75 % UR e C: 40°C / 75 %.

4.3.2. Estudo de Liberação, Permeação e Retenção

4.3.2.1. Estudo de “Sink Conditions”

Para realização dos estudos de liberação, permeação e retenção cutânea é necessário estabelecer condições adequadas experimentalmente para evitar falsos resultados. Um parâmetro a ser avaliado é a garantia da solubilidade de todo ativo na solução a qual receberá o ativo após liberação ou permeação. Neste estudo, solução tampão fosfato isotônico foi empregada com intuito de mimetizar as condições fisiológicas da pele e 0,5 % de polissorbato 80 foi empregado para garantir que toda fração apolar do extrato possa ser solubilizada. A solução receptora deve ser capaz de solubilizar dez vezes mais a concentração a ser utilizada no ensaio. Para verificar se a solução utilizada é capaz de solubilizar o EF, presente em 500 mg de formulação, foi utilizado a atividade antioxidante como forma de quantificar o extrato solubilizado, uma vez que a baixa solubilização dos constituintes deste, pode levar a redução da atividade antioxidante.

Os resultados adquiridos neste ensaio sugerem que os 12 mL de solução receptora, solução tampão fosfato de potássio (20 mM), pH 7,4 contendo NaCl (0,9 %) e polissorbato 80 (0,5 %), foram capazes de solubilizar todo extrato contido em 500 mg de formulação e dez vezes mais a concentração contida nestes 500 mg. Não foi observada diferença estatística entre as amostras avaliadas, pelo teste de variância ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Dunnett's, tomando como grupo controle o EF apenas diluído em tampão da reação luminescente (figura 31).

Figura 31: Porcentagem de inibição da emissão da luz da reação luminescente xantina/luminol/XOD encontrada pelas amostras A e B e EF no estudo de “sink conditions”. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de cinco determinações. Onde, A: concentração de EF correspondente a 10 vezes a concentração de EF contida em 500 mg de formulação, B: concentração de EF contida em 500 mg de formulação, EF: extrato fluido de própolis verde diluído em tampão glicina (0,1 M), pH 9,4.

4.3.2.2. Estudo de liberação “*in vitro*” de formulações tópicas adicionadas de extrato de própolis

O parâmetro fundamental para qualquer produto é sua eficácia, demonstrada com ensaios clínicos. Mas, o tempo e despesa associados com tais ensaios os faz inadequados como métodos de controle de qualidade rotineiros. Então, testes “*in vitro*” são usados freqüentemente para assegurar a qualidade do produto. Uma variedade de testes físicos e químicos, geralmente, são executados em produtos semi-sólidos. Por exemplo, solubilidade, tamanho de partícula e forma cristalina do componente ativo, viscosidade, e homogeneidade do produto. Mais recentemente, testes de liberação “*in vitro*” têm demonstrado um meio para assegurar compreensivelmente a liberação do componente ativo de produtos semi-sólidos.

A liberação “*in vitro*” é um dos diversos métodos padronizados, o qual pode ser usado para caracterizar formas farmacêuticas tópicas, semi-sólidas, como cremes, géis, e ungüentos. Mudanças importantes nas características da fórmula de um produto ou nas propriedades termodinâmicas do fármaco podem levar a uma diferença na liberação.

Métodos de liberação “*in vitro*” para formas de dosagem tópicas são baseados em um sistema de célula de difusão aberto, como o sistema de célula de Franz, provido normalmente com uma membrana sintética. A difusão do ativo do produto tópico através da membrana é monitorada consecutivamente através de ensaio de amostras coletadas do fluido de receptor.

Alíquotas removidas do meio receptor podem ser analisadas através de CLAE ou outra metodologia analítica. A quantidade de ativo liberada é expressa por unidade de área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) versus o tempo. A quantidade de ativo liberado é formulação-específica e pode ser usada para monitorar a qualidade do produto.

Foi determinado o perfil de liberação da atividade antioxidante do EF presente nas formulações desenvolvidas. Três modelos diferentes de liberação foram avaliados, sendo estes: ordem zero (concentração versus tempo), pseudoprimeira ordem (concentração versus raiz quadrada do tempo) e primeira ordem (Log da concentração versus tempo). Não foi possível determinar a cinética de liberação das formulações, pois os três modelos avaliados demonstraram coeficientes correlação na fração linear das curvas de liberação similares, não sendo possível estabelecer o modelo mais adequado (tabela 9).

As formulações foram comparadas quanto à quantidade de compostos antioxidantes liberados em função do tempo (figura 32). A F 01 apresentou maior liberação da atividade antioxidante que a formulação F 02, sendo observada diferença estatística significativa, pelo t-teste, em todos os tempos de liberação analisados entre as formulações. Comparando a quantidade equivalente a EF liberados após 6 horas, verificou-se que a F 01 liberou 1,7 vez mais EF que a F 02 (tabela 9). No entanto, não foi observada diferença significativa, pelo t-teste, entre a F 01 e a F 03, a qual liberou 1,20 vez menos extrato que a F 01. E ainda, também foi observada diferença significativa entre a F 02 e F 03 quanto à quantidade de EF liberado em 6 horas.

Figura 32: Perfil de liberação dos compostos antioxidantes presentes nas formulações F 01, F 02 e F 03. Os resultados representam a média de quatro determinações $\pm$ EPM.

Não foi observada qualquer interferência da solução receptora proveniente das formulações placebo P 01, P 02 e P03 na inibição do sistema xantina/luminol/XOD, não havendo inibição do sistema por estas formulações.

Tabela 9: Comparação da quantidade equivalente a EF liberada após 6 horas e coeficientes de correlação.

	F 01	F 02	F 03
Q₆^a	898,74 ± 50,65	528,72 ± 32,72	744,80±28,50
A	0,9183	0,7520	0,9361
B	0,9469	0,7709	0,9750
C	0,9293	0,7488	0,9593

^aQuantidade equivalente a EF liberada após 6 horas ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm \text{DP}$).

A – coeficiente de correlação do modelo de liberação de primeira ordem.

B – coeficiente de correlação do modelo de liberação de pseudoprimeira ordem.

C – coeficiente de correlação do modelo de liberação de ordem zero.

Os resultados representam a média de 5 determinações.

Segundo Getie e colaboradores (2002), flavonóides, como a quercetina, presentes no extrato *Dodonea viscosa*, são mais liberados de cremes hidrofilicos que de cremes lipofílicos. Casagrande e colaboradores (2007) também observaram que formulações com baixo conteúdo graxo contendo quercetina, um flavonóide com propriedades antioxidantes, liberam uma quantidade duas vezes maior de quercetina que formulações com conteúdo graxo maior. E ainda, Marquele e colaboradores (2006) avaliaram a liberação de compostos com a atividade antioxidante e de ácido cumárico de formulações contendo extrato fluido de própolis marrom e verificaram também que houve maior liberação de compostos com atividade antioxidante a partir da formulação com menor conteúdo graxo.

Considerando que a F 02 possui maior conteúdo graxo que a F 01, devido á adição de oleato de isodecila e palmitato de isopropila, os resultados encontrados estão de acordo com o resultados descritos pelos autores citados, uma vez que muitos trabalhos descrevem que a

atividade antioxidante de extratos de própolis é devido aos componentes fenólicos, como flavonóides. Embora a F 03, um gel, o qual não possui fração oleosa, tenha apresentado menor capacidade de liberação dos ativos que a F 01, as diferenças de liberação entre F 01 e F 03 não foram significativas, ambas apresentam perfil de liberação bem parecidos.

4.3.2.3. Estudo de permeação e retenção “*in vitro*” de formulações tópicas adicionadas de extrato de própolis

A eficácia de produtos para tratamento de pele é avaliada por testes clínicos, que é um processo caro e que leva muito tempo, sendo assim, usualmente emprega-se testes laboratoriais para prever resultados de testes clínicos durante o desenvolvimento de produtos. 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 tem sido empregadas nestas avaliações. A permeabilidade da pele de porco tem sido amplamente estudada e é um bom modelo animal para utilizar nestes estudos, por apresentar propriedades histológicas e fisiológicas similares à da pele humana (PAGLIARA et al., 1999). Assim, devido à facilidade de obtenção e por melhor representar as condições ideais, somente pele de orelha de porco foi empregada neste estudo.

Para que as formulações tópicas apresentem efeito clínico, é importante que os compostos ativos ultrapassem o estrato córneo e fiquem retidos nas camadas mais internas da pele. Para avaliar a capacidade dos componentes do extrato de própolis em reter ou permear na pele, a pele que sofreu o processo de permeação foi avaliada quanto à retenção de compostos com atividade antioxidante. Porém, está estabelecido que quando conduzidos experimentos de permeação, 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 por “tape stripping”, após o teste de permeação, e a atividade antioxidante de compostos retidos apenas na epiderme viável foi estabelecida.

4.3.2.3.1. Estudo da recuperação do método de retenção cutânea

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 adequada para a quantidade de analito que está presente na amostra (CAUSON, 1997).

Este ensaio foi proposto com o objetivo de avaliar a recuperação dos compostos antioxidantes do extrato de própolis e de avaliar a interferência dos antioxidantes endógenos da pele na avaliação da atividade antioxidante dos compostos retidos. Os estudos de recuperação para avaliação da retenção cutânea de compostos antioxidantes provenientes do extrato de própolis foram realizados contaminando a pele de orelha porco com concentrações conhecidas de extrato de própolis. Em seguida, procedeu-se à extração das substâncias ativas e determinação da atividade antioxidante. Neste experimento, foi utilizada pele de orelha de porco sem estrato córneo, pois nos experimentos de permeação e retenção cutânea a pele sofreu “tape stripping”.

Desta forma, verificou-se que a utilização de pele sem ativo causava interferência no método empregado de medida da atividade antioxidante. Somente a pele sem adição de extrato causava inibição do sistema para determinação da atividade antioxidante, provavelmente devido aos antioxidantes endógenos da pele, como a vitamina E, os quais poderiam estar sendo extraídos da pele no processo de extração dos constituintes do extrato de própolis. Assim, para

eliminar a interferência dos componentes da pele, a pele sem ativo foi tomada como branco nas determinações posteriores. Assim, a porcentagem de inibição causada pelos componentes do extrato foi entendida como a diferença entre a pele sem extrato e a pele com extrato.

Foram avaliadas duas concentrações diferentes de extrato, 2,5 mg e 0,5 mg de EF, concentração correspondente a 20 % e 4 % da concentração de extrato contida em 500 mg de formulação, respectivamente. O extrato foi aplicado na pele de orelha de porco e extraído. E ainda, uma amostra de extrato foi processada pelo método de extração sem ser aplicado na pele, com o intuito de avaliar se o processo de extração causava inativação dos componentes ativos. Os resultados obtidos das amostras com e sem pele foram comparados com amostras de extrato diluídas na mesma concentração, sem passar pelo método de extração. Assim, estas amostras apenas diluídas foram tomadas como sendo 100 % da concentração teórica do método. Os resultados de recuperação do método estão na tabela 10.

Tabela 10: Recuperação do método de extração dos componentes do extrato de própolis, responsáveis pela atividade antioxidante, retidos em pele de orelha de porco.

	% inibição do sistema xantina/luminol/XOD	% Recuperação
2,5mg EAP^a	45,48±1,65	88,17±3,19
0,5mg EAP	65,95±1,78	108,97±2,84
2,5mg ESP^b	52,66±0,65	102,09±1,26
0,5mg ESP	61,47±4,74	102,76±7,92
2,5mg ESE^c	51,58±5,09	-
0,5mg ESE	59,82±7,02	-

^a EAP – extrato aplicado na pele;

^b ESP – extrato sem aplicação na pele, apenas passou por método de extração;

^c ESE – extrato sem processo de extração, apenas diluído;

Os resultados representam a média (n=3) ± DP.

Como observado, o método apresentou 88,17% e 108,97% de recuperação, para as concentrações 2,5 e 0,5mg de EF aplicados à pele, respectivamente. E ainda, 102,09% e 102,76% de recuperação, para as concentrações de 2,5 e 0,5mg de EF sem aplicação na pele,

apenas processadas conforme método de extração, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com Bronaugh e colaboradores (1999) que indicam que a recuperação normalmente deve ser acima de 80%, assumindo que o método tem credibilidade.

Lopes e Bentley (2005) avaliaram a recuperação de ciclosporina A de amostras de pele após estudos de penetração cutânea “*in vitro*”. Similarmente ao processo de extração adotado neste estudo, a ciclosporina A foi extraída do estrato córneo e da epiderme viável através de agitação em vortex e sonicação, utilizando metanol como solvente extrator. Assim como a recuperação encontrada no presente trabalho, a recuperação da ciclosporina A de ambas camadas da pele foi de considerada aceitável, sendo esta de 85%. A recuperação do método encontrada para o extrato de própolis foi melhor que a recuperação encontrada por Lopes e Bentley (2005), mesmo se tratando de uma mistura de várias substâncias e não um composto isolado, como ciclosporina A.

4.3.2.3.2. Permeação e retenção

A permeação das formulações sobre a pele de porco foi conduzida por 12 horas. Após 12 horas, foi avaliada a atividade antioxidante da solução receptora e da pele sem estrato córneo. A porcentagem de inibição do sistema xantina/luminol/XOD encontrada na solução receptora (permeação) e na pele sem estrato córneo, após a extração (retenção), foi estimada como a quantidade equivalente a extrato de própolis, determinada relacionando a porcentagem de inibição obtida com IC_{50} , previamente determinado, com a porcentagem de inibição alcançada pelas amostras dos ensaios.

As formulações F 01 e F 02 não demonstraram permeação e retenção dos seus componentes antioxidantes. Deduz-se que estas formulações não sejam adequadas para uso clínico, pois não são capazes de disponibilizar os ativos na derme para exercerem efeito.

Assim, possivelmente em ensaios biológicos ou clínicos, estas formulações não demonstrariam efeito algum.

Na tentativa de otimizar a retenção e a permeação da F 02, foi adicionado a esta formulação um conhecido promotor de absorção, lecitina de soja, nas concentrações de 4 % e 8 %. Esta formulação foi selecionada para otimização da retenção e da permeação, pois a F 01 demonstrou sinais instabilidade com relação à coloração. Lecitina de soja foi escolhida como promotor, devido sua baixa toxicidade, sua aceitabilidade em uso cosmético e comprovada habilidade em promover absorção de flavonóides, como descrito por Saija e colaboradores (1998). Foi observado que mesmo após a adição deste promotor, não foi observada retenção e permeação dos compostos antioxidantes. Neste estudo, o promotor de absorção, lecitina de soja, demonstrou-se ineficaz.

Assim como as formulações F 01 e F 02, a F 03 não foi capaz de permear os ativos antioxidantes. No entanto, ocorreu retenção destes na epiderme viável (tabela 11). Desta forma, esta formulação apresentou características desejadas como descrito por Zatz (1993), o qual descreve que uma substância, a qual deve exercer sua atividade nos tecidos da pele, deve ter uma boa retenção na pele com uma mínima permeação para os vasos sanguíneos.

Foi avaliada ainda, a capacidade de uma solução saturada de EF em permear e reter na pele de orelha de porco. Este ensaio teve o objetivo de avaliar se apenas o EF era capaz de permear e reter na pele e se os componentes das formulações otimizavam este processo. Desta forma, foi observado que a F 03 foi capaz reter os componentes do EF cerca de 31 % mais que a solução saturada de EF, havendo então, uma otimização do processo de retenção pela F 03 (tabela 11).

Tabela 11: Retenção dos compostos antioxidantes em pele de orelha de porco da formulação F 03 e EF.

	Retenção ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ^a
F 03	24,62 $\pm$ 9,46
EF^b	16,89 $\pm$ 5,01

^a Quantidade equivalente a extrato retida na pele por área de pele sem estrato córneo após 12 horas.

^b EF – solução saturada de EF (25 mg/mL) em propilenoglicol : tampão fosfato de sódio (2 0 mM), pH 7,4 (3:2); Os resultados representam a média (n=5) $\pm$ DP.

As interações entre veículo, substância ativa e pele podem explicar o fato da diferença na liberação, na permeação e retenção entre as formulações em estudo. A F 03 liberou melhor os componentes responsáveis pela atividade antioxidante e permitiu uma maior retenção na pele de orelha de porco, provavelmente devido à seus componentes interagirem com o estrato córneo, desestruturando-o e permitindo a maior passagem dos componentes ativos do extrato de própolis.

A composição das F 03, F 02 e F 01 são bem diferenciadas, a F 03, um gel, possui em sua composição substâncias que podem atuar como promotores de absorção, desestruturando o estrato córneo, tais como, álcool etílico, polissorbato 20 e propilenoglicol, permitindo assim, maior retenção de seus componentes antioxidantes.

A F 02, uma emulsão, apesar de possuir um arranjo estrutural similar a estrutura da pele, presença de cristais líquidos, as quais, possivelmente, facilitam a permeação cutânea, liberou menos os componentes ativos que a F 03 e não foi capaz de promover retenção e permeação na pele de orelha de porco. Provavelmente este fato pode ocorrer devido a pouca liberação dos compostos antioxidantes. Desta forma, a quantidade de ativos liberados é insuficiente para que estes possam permear e reter na pele. E além desses ativos estarem sendo pouco liberados, eles podem estar ficando presos no estrato córneo e por isso não conseguiram atingir a epiderme viável.

Embora, a F 01 tenha liberado de forma eficaz seus componentes antioxidantes, não foi observada retenção e permeação dos mesmos em pele de orelha de porco. Provavelmente, estas

substâncias podem estar ficando presas no estrato córneo e por isso não conseguem atingir a epiderme viável.

Casagrande e colaboradores (2007) avaliaram a retenção, em pele de orelha de porco, da atividade antioxidante da quercetina veiculada em formulações tópicas. Foi observado que a retenção foi tempo dependente e após 12 horas, as amostras de pele demonstraram 54% de inibição da peroxidação lipídica. Em outros estudos Casagrande e colaboradores, avaliaram a atividade fotoquimioprotetora “*in vivo*” destas formulações e observaram uma boa atividade contra os danos causados pela radiação UV.

As formulações F 01 e F 02 por não demonstraram retenção dos compostos antioxidantes presentes na própolis verde e por isso, têm grande probabilidade de não demonstrarem efeito em estudos “*in vivo*” de ação fotoquioprotetora. Entretanto, a F 03 demonstrou retenção destes compostos e portanto, tem grande probabilidade de exercer efeito fotoquiopreventivo em futuros estudos “*in vivo*”. Além disso, a própolis é composta por diversos flavonóides e demonstra pronunciada atividade antioxidante, assim como a quercetina, a qual demonstrou ação fotoquiopreventiva bastante efetiva. Desta forma, faz-se necessária à continuidade do presente trabalho avaliando a eficácia fotoquiopreventiva “*in vivo*” desta formulação e de novas formulações com maior capacidade de retenção dos componentes antioxidantes da própolis verde.

Conclusão

5. Conclusão

Diante dos resultados anteriormente apresentados pode-se concluir que:

O teor de flavonóides totais encontrado para o extrato de própolis verde foi considerado inferior ao encontrado na literatura para outras própolis. No entanto, o teor de polifenóis foi condizente ao encontrado na literatura.

O espectro de absorção demonstrou-se característico de extrato de própolis e a absorvância específica foi menor que as encontradas na literatura, assim como a absorvância máxima demonstrou-se maior que as descritas na literatura. Os resultados obtidos sugerem que os extratos reportados e EF possuem constituição química diferenciada.

O solvente utilizado para solubilização do extrato seco exerce influência no teor de flavonóides e polifenóis totais, assim como na atividade antioxidante do extrato em questão.

Os referidos extratos demonstraram atividade doadora de H^+ ao radical DPPH $^{\bullet}$, seqüestradora do radical superóxido gerado no sistema xantina/luminol/XOD, de radicais hidroxilas, de radicais gerados no sistema H_2O_2 /luminol/HRP, e atividade inibidora da peroxidação lipídica de forma dose dependente.

Quanto aos estudos de estabilidade físico-química das formulações desenvolvidas, observou-se que a F 03, formulação tipo gel, foi mais estável que as formulações F 01 e F 02, as quais demonstraram algumas alterações de coloração, pH e tamanho de partícula.

As formulações apresentaram a mesma atividade antioxidante do EF e o método de determinação da atividade antioxidante das formulações pelo sistema xantina/luminol/XOD e atividade doadora de H^+ ao radical DPPH $^{\bullet}$ apresentaram-se eficientes e sem interferência dos constituintes das mesmas. Não foi observada redução da atividade antioxidante até o período de 90 dias para F 03 e 180 dias para F 01 e F 02 no estudo de estabilidade da atividade funcional.

Embora tenha ocorrido alteração de coloração e redução do pH das formulações durante o estudo de estabilidade, não ocorreu perda da atividade antioxidante das mesmas.

Os estudos de liberação das formulações adicionadas de EF demonstraram que os compostos com atividade antioxidante foram liberados mais facilmente a partir de formulações com menor conteúdo graxo, F 01 e F 03.

As formulações F 01 e F 02 não demonstraram permeação e retenção dos seus componentes antioxidantes. A F 03 também não foi capaz de permear os ativos antioxidantes. No entanto, ocorreu retenção destes na epiderme viável. Deduz-se que a F 03 seja adequada para uso clínico, pois foi capaz de disponibilizar os ativos na epiderme viável para exercerem efeito.

Neste estudo foi observado que o extrato de própolis verde pode ser eficaz na prevenção aos danos causados pela radiação UV por apresentar pronunciada atividade antioxidante. E ainda, com base nos estudos de liberação, permeação e retenção cutânea, formulações tipo gel adicionadas deste extrato demonstraram-se adequadas para veicular este extrato. Desta forma, sugere-se que a formulação F 03 terá probabilidade de eficácia quando utilizada em estudos de atividade funcional “in vivo”, fotoquimioprotetora.

Referências bibliográficas

Referências bibliográficas

ABRAHAM, M. H.; CHADHA, H. S.; MITCHELL, R. C. The factors that influence skin penetration of solutes. *Journal of pharmaceutics and pharmacology*, London, v. 47, p. 8-16, 1995.

ADELMANN, J. **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante**. Dissertação de mestrado - Faculdade de ciências farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

AFAQ, F.; ADHAMI, V. M.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. **Mutation research**, Amsterdam, v. 571, p. 153-173, 2005.

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

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine -eCAM**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 29-32, 2005.

BARRY, B. Transdermal drug delivery. In: ALTON, M. E. **Pharmaceutics the science of dosage form design**. London: Churchill Livingstone, 2002, p. 499-533.

BARRY, B. W. Action of skin penetration enhancers-the lipid protein portioning theory. **International Journal of Cosmetic Science**, Oxford, v. 10, p. 281-293, 1988.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, London, v. 26, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BOWSTRA, J. A.; HONEYWELL-NGUYEN, P. L.; GOORIS, G. S.; PONEC, M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Progress in lipid research**, Oxford, v. 42, p. 1-36, 2003.

BRASIL. Agência nacional de vigilância sanitária – ANVISA. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Série qualidade 1, 2004. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Site visitado em: 21 de dez., 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Guia para realização de estudos de estabilidade. RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Site visitado em: 10 de dezembro, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Site visitado em: 15 de março, 2004.

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

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**, 3º ed., Marcel Dekker, New York, p.229-234, 1999

CAIN, K.; SKILLETER, D. N. Preparation and use of Mitochondria in toxicological research. **Journal of Biochemical Toxicology**, Hoboken, v. 243, p. 217-254, 1987.

CASAGRANDE, R. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo quercetina: controle físico-químico e avaliação da eficácia in vivo**. Tese de doutorado - Faculdade de ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

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, 2006.

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**, Virginia, v. 7, p. 1-8, 2006.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI Jr., W. A.; BORIN, M. F.; LOPEZ, R. F. V.; FONSECA, M. J. V. In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 328, p. 183-190, 2007.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, Milano, v.73, 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**, Taiwan, v.10, p. 178-182, 2002.

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**, Switzerland, v. 39, p. 756-761, 2006.

CIOCA, G.; CALVO, L. Liquid crystals and cosmetic applications. **Cosmetics and Toiletries**, São Paulo, v. 105, 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**, Pittsburgh, v. 61, n. 1, p. 71-76, 1998.

DE CASTRO, S. L. Própolis: Biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. **ARBS - annual review of biomedical sciences**, Botucatu, v. 3, p. 49-83, 2001.

DE MORAIS, J. M.; DOS SANTOS, O. D. H.; DELICATO, T.; GONÇALVES, R. A.; ROCHA-FILHO, P. A. Physicochemical characterization of canola oil/water nano-emulsion obtained by determination of required HLB number and emulsion phase inversion methods. **Journal of Dispersion Science and Technology**, New York, v. 27, p. 109-115, 2006.

DENG, W.; FANG, X.; WU, J. Flavonoids function as antioxidants: By scavenging reactive oxygen species or by chelating iron? **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 50, n. 3, p. 271-276, 1997.

DERMATIVA – informe técnico. Disponível em: <<http://www.dermativa.com.br>>. Site visitado em: 20 de outubro de 2005.

DI MAMBRO, V. M.; FONSECA, M. J. V. Assay of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. **Journal of Pharmaceutics and Biomedical analysis**, Oxford, v. 37, p. 287-295, 2005.

DOBROWOLSKI, J. W., VOHORA, S. B., SHARMA, K., SHAH, S. A., NAQVI, S. A. H., DANDIYA, P. C. Antibacterial, antifungal, antiamebic, anti-inflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 35, p. 77-82, 1991.

DU, J. D.; LI, Y.; LU, J. Investigation on the chemiluminescence reaction of luminol-H₂O₂-S²/R-SH system. **Analytica chimica acta**, Amsterdam, v. 448, p. 79-83, 2001.

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

FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S.; VILLANO, D.; GARCÍA-PARRILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M. Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 513, p. 113-118, 2004.

FITZPATRICK, L. R.; WANG, J.; TRUC, L. E. Caffeic acid phenethyl ester, an inhibitor of nuclear factor- κ B, attenuates bacterial peptidoglycan polysaccharide-induced. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, Bethesda, v. 299, n. 3, p. 915-920, 2001.

FREI, B.; HIGDON, V. Antioxidant activity of Tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. **American Society for Nutritional Sciences**, Bethesda, p.3275S-3284S, 2003.

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.

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, n. 2, p. 751-766, 1949.

GU, Y. S.; REGNIER, L.; McCLEMENTS, J. Influence of environmental stresses on stability of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by β -lactoglobulin-t-carregeenan. **Journal of colloid and interface science**, New York, v. 286, p. 551-558, 2005.

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

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**, New York: Pergamon Press, 3ªed., p. 1-104, 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.

HENRIQUE DOS SANTOS, O. D.; VIOLI MIOTTO, J.; MOREIRA DE MORAIS, J.; DA ROCHA-FILHO, P. A.; DE OLIVEIRA, W.; Attainment of emulsions with liquid crystal from marigold oil using the required HLB method. **Journal of dispersion science and technology**, New York, vol. 26, nº2, p. 243-249, 2005.

HIRAYAMA, O.; TAKAGI, M.; HUKUMOTO, K.; KATOH, S. Evaluation of antioxidant activity by chemiluminescence. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 247, p. 237-241, 1997.

HOSNUTER, M.; GÜREL, A.; BABUCÇU, O.; ARMUTCU, F.; KARGI, E.; ISIKDEMIR, A. The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. **Burns**, Guildford, v. 30, p. 121-125, 2004.

HU, F.; HEPBURN, H. R.; LI, Y.; CHEN, M.; RADLOFF, S. E.; DAYA, S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 100, p. 276-283, 2005.

INCA – Instituto nacional do câncer. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Site acessado em: 20 de janeiro de 2005.

JATO, J. L. **Tecnologia farmacêutica**. Madrid: Síntesis, p. 292-294, 1997.

KALLIOINEN, S.; HELENIUS, K.; YLIRUUSI, J. Influence of storage time and temperature on the stability of some emulsion creams. **Pharmazie**, Berlin, n. 49, p. 500-505, 1994.

KROL, W.; CZUBA, Z.; SCHELLER, S.; PARADOWSKI, Z.; SHANI, J. Structure activity relationship in the ability of flavonols to inhibit chemiluminescence. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 41, p. 121-126, 1994.

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

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

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Estudo da variação do 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. n. 5, p. 1-8, 2002.

LOPES, L. B.; BENTLEY, M. V. L. B. Cyclosporina A in skin samples from in vitro penetration studies may be assayed by a simple HPLC method. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 4, p.477-482, 2005.

MADISON, K. C. Barrier function of the skin: “La Raison d’etre” of the epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 121, p. 231-241, 2003.

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

MAIA CAMPOS, P. M. B. G.; RICCI, G.; SILVA, G. M.; SANTOS, E. B.; LOPES, R. A.; SEMPRINI, M. Histopathological, morphometric and stereologic studies of dermocosmetic skin formulatios containing vitamin A and/or glycolic acid. **International journal of cosmetic science**, Oxford, v. 50, p. 47-59, 1999.

MARKHAM, K. R. Techniques of flavonoid identification. **Academic Press**, London, v. 1, p. 113, 1982.

MARQUELE, F. D.; DI MAMBRO, V. M.; GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; VALIM, Y. M. L.; FONSECA, M. J. V. Assessment of the antioxidant activities of brazillian extracts of própolis alone and in topical pharmaceutical formulations. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, Oxford, v. 39, p. 455-462, 2005.

MARQUELE, F. D.; OLIVEIRA, A. R. M.; BONATO, P. S.; LARA, M. G.; FONSECA, M. J. V. Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, Oxford, v. 41, p. 461-468, 2006.

MARTIN, A. **Physical pharmacy**. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 4^{ed.}, p. 430-436, 1993.

MARTÍNEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M. J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 50, n. 1, p. 5-18, 2000.

MASSON, P.; SCOTTI, L. Fotoproteção: Um desafio para a cosmetologia. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v. 15, p. 42-53, 2003.

MISRA, H. P.; SQUATRITO, P. M. The role of superoxido anion in peroxidase-catalyzed chemiluminescence of luminol. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 215, n. 1, p. 59-65, 1982.

MIYATAKA, H., NISHIKI, M., MATSUMOTO, H., FUJIMOTO, T., MATSUKA, M., SATOH, T. Evaluation of propolis. I. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic andphysi-chemical methods. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokio, v. 20, n. 5, p. 496-501, 1997.

MULLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical

administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 58, p. 343-356, 2004.

MUN, S.; DECKER, E. A.; McCLEMENTS, D. J. Effect of molecular weight and degree of deacetylation of chitosan on the formation of oil-in-water emulsions stabilized by surfactant-chitosan membranes. **Journal of colloid and interface science**, New York, v. 296, n. 2, p. 581-590, 2006.

OFFORD, E. A.; GAUTIER, J. C.; AVANTI, O.; SCALETTA, C.; RUNGE, F.; KRAMER, K.; APPLGATE, L. A. Photoprotective potential of lycopene, β -carotene, vitamin E, vitamin C and carnosic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts. **Free Radical Biology & Medicine**, San Diego, v. 32, n. 12, p. 1293-1303, 2002.

OHKAWA, H.; OSHINI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytica chimica**, Amsterdam, v. 95, p. 351-388, 1979.

OLIVEIRA, D. A. G. C.; DUTRA, E. A.; SANTORO, M. I. R. M.; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. Protetores Solares, Radiações e Pele. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v. 16, p. 68-72, 2004.

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.

PAGNONI, A. Fotoenvelhecimento e Fotodocumentação. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v. 15, p. 70-82, 2003.

PAREDES-GUZMÁN, J.; AGUIAR, C. L.; FUJIWARA, F.; PARK, Y. K. Estudo das própolis que contém artepillin C. Disponível em: <<http://apacame.org.br>>. Site visitado em: 19 de fev., 2005.

PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical

origin of southeastern brazilian propolis. **Journal of agricultural and food chemistry**, Easton, v. 52, n. 5, p. 1100-1103, 2004.

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

PHARMASPECIAL - informe técnico. Disponível em: <<http://www.pharmaspecial.com.br>>. Site visitado em: 21 de outubro de 2005.

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

RODRIGUES, T.; SANTOS, A. C.; PIGOSO, A. A.; MINGATTO, F. E.; UYEMURA, A. S.; CURTI, C. Thioridazine interacts with the membrana of mitochondria acquiring antioxidant activity toward apoptosis – potentially implicated mechanisms. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 136, n. 1, p. 136-142, 2002.

RONSEIN, G. E.; MIYAMOTO, S.; BECHARA, E.; DI MASCIO, P.; MARTINEZ, G. R. Singlet oxygen-mediated protein oxidation: damage mechanisms, detection techniques and biological implication. **Química Nova**, São Paulo, vol. 29, no. 3, 2006.

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.

ROSSI, A.; LONGO, R.; RUSSO, A.; BORRELLI, F.; SAUTEBIN, L. The role of phenethyl éster of caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis. **Fitoterapia**, Milano, v. 73, p. S30-S37, 2002.

RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl éster and galangin. **Fitoterapia**, Milano, v. 73, n. 1, p. S21-S29, 2002.

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

SÁ-NUNES, A; FACCIOLI, L. H.; SFORCIN, J. M. Própolis: lymphocyte proliferation and IFN- γ production. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 87, p. 93-97, 2003.

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

SEQUEIRA, J. A., Optimization of the skin availability of topical drugs In: ZATZ, J.L. **Skin Permeation – Fundamentals and application**. Wheaton: Allured Publishing Corporation, p. 163-176, 1993.

SIMÕES, L. M. C., GREGÓRIO, L. E., DA SILVA FILHO, A. A., DE SOUZA, M. L., AZZOLINI, A.E.C.S., BASTOS, J.K., LUCISANO-VALIM, Y.M. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 94, p. 59-65, 2004.

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.; MALBACH, H. I.; SURBER, C. Use of emulsions as topical drug delivery systems. In: NIELLOUD, F.; MARTI-MESTRES, G. **Pharmaceutical emulsions and suspensions**, New York: Marcel Dekker, p.259-269, 2000.

SROKA, Z.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 41, p. 753-758, 2003.

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

TEDESCO, A. C.; MARTÍNEZ, L.; GONSÁLEZ, S. Photochemistry and photobiology of actinic erythema: defensive and reparative cutaneous mechanisms. **Brazilian journal of medical and biological research**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 5, p. 561-575, 1997.

THORPE, G. H. G.; KRICKA, L. J. Enhanced chemiluminescent reactions catalized by horseradish peroxidase. **Methods in Enzymology**, New York, v. 133, p. 331-351, 1986.

TIDDY, G. J. T. Surfactant-water liquid crystal phases. **Physics Reports.**, North-Holland, v.57, p. 1-46, 1980.

VIAFARMANET – informe técnico. Disponível em:<<http://viafarmanet.com.br>>. Site visitado em: 21 de outubro de 2005.

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

WOISKY R. G. Métodos de controle químico de amostras de própolis. Tese de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

WRIGHT, T. I.; SPENCER, J. M.; FLOWERS, F. P. Chemoprevention of nonmelanoma skin cancer. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Saint Louis, v. 54, n. 6, p. 933-946, 2006.

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

ZATZ, J.; KUSHLA, G. P. Gels. In: LIEBERMAN, H. A.; RIEGER, M. M.; BANKER, G. S. **Pharmaceutical dosage forms**. New York: Marcel Dekker, p. 399-421, 1996.

-

Apêndice

Apêndice A: Fotomicrografia da F 01 em aumento de 400x, armazenada a 5°C em diferentes períodos de análise.

7 dias

28 dias

15 dias

60 dias

21 dias

90 dias

Apêndice B: Fotomicrografia da P 01 em aumento de 400x, armazenada a 5°C em diferentes períodos de análise.

7 dias

28 dias

15 dias

60 dias

21 dias

90 dias

Apêndice C: Fotomicrografia da F 01 em aumento de 400x, armazenada a 30°C/75% UR em diferentes períodos de análise.

7 dias

28 dias

15 dias

60 dias

21 dias

90 dias

Apêndice D: Fotomicrografia da P 01 em aumento de 400x, armazenada a 30°C/75% UR em diferentes períodos de análise.

7 dias

28 dias

15 dias

60 dias

21 dias

90 dias

Apêndice E: Fotomicrografia da F 01 em aumento de 400x, armazenada a 40°C/75% UR em diferentes períodos de análise.

7 dias

28 dias

15 dias

60 dias

21 dias

90 dias

Apêndice F: Fotomicrografia da P 01 em aumento de 400x, armazenada a 40°C/75% UR em diferentes períodos de análise.

7 dias

28 dias

15 dias

60 dias

21 dias

90 dias

Apêndice G: Fotomicrografia da F 02 em aumento de 200x, armazenada a 5°C em diferentes períodos de análise.

7 dias

28 dias

15 dias

60 dias

21 dias

90 dias

Apêndice H: Fotomicrografia da P 02 em aumento de 200x, armazenada a 5°C em diferentes períodos de análise.

7 dias

28 dias

15 dias

60 dias

21 dias

90 dias

Apêndice I: Fotomicrografia da F 02 em aumento de 200x, armazenada a 30°C/75% UR em diferentes períodos de análise.

7 dias

28 dias

15 dias

60 dias

21 dias

90 dias

Apêndice J: Fotomicrografia da P 02 em aumento de 200x, armazenada a 30°C/75% UR em diferentes períodos de análise.

7 dias

28 dias

15 dias

60 dias

21 dias

90 dias

Apêndice L: Fotomicrografia da F 02 em aumento de 200x, armazenada a 40°C/75% UR em diferentes períodos de análise.

7 dias

28 dias

15 dias

60 dias

21 dias

90 dias

Apêndice M: Fotomicrografia da P 02 em aumento de 200x, armazenada a 40°C/75% UR em diferentes períodos de análise.

7 dias

28 dias

15 dias

60 dias

21 dias

90 dias