UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

PRÓPOLIS - IDENTIFICAÇÃO DE
FLAVONÓIDES E ÁCIDOS AROMÁTICOS EM
TINTURA. ESTIMATIVA DE FPS DE EXTRATO
MOLE EM BASE COSMÉTICA

ANA LUIZA PEREIRA MOREIRA MORI

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. JORGE LUIZ SEFERIN MARTINS

São Paulo
1997

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

M854p Mori, Ana Luiza Pereira Moreira
Própolis - identificação de flavonóides e ácidos aromáticos em tintura.
Estimativa de FPS de extrato mole em base cosmética / Ana Luiza Pereira
Moreira Mori. -- São Paulo, 1997.
114p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Martins, Jorge Luiz Seferin

1. Própolis : Filtro solar : Cosmetologia 2. Produtos naturais : Cosméticos :
Tecnologia I. T. II. Martins, Jorge Luiz Seferin. orientador.

668.55 CDD

ANA LUIZA PEREIRA MOREIRA MORI

**PRÓPOLIS - IDENTIFICAÇÃO DE
FLAVONÓIDES E ÁCIDOS AROMÁTICOS EM
TINTURA. ESTIMATIVA DE FPS DE EXTRATO
MOLE EM BASE COSMÉTICA**

COMISSÃO JULGADORA

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE**

**Prof. Dr. Jorge Luiz Seferin Martins
(Orientador / Presidente)**

**Prof. Assoc. Jaim Lichtig
(1º Examinador)**

**Prof. Tit. João Fernandes Magalhães
(2º Examinador)**

SÃO PAULO, 17 DE NOVEMBRO DE 1997

*Este trabalho é dedicado
a meus pais,
Jorge e Margarida
e minhas filhas,
Regiane e Débora.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Jorge Luiz Seferin Martins, pela orientação.

Ao Prof. João Fernandes Magalhães, pelo apoio, incentivo e amizade.

Aos Professores Elfriede Marianne Bacchi, Vicente de Oliveira Ferro, Dominique Corinne H. Fischer, Paulo Chancel Deodato de Freitas, Edna Tomiko M. Kato e colegas Iraci de Oliveira e Regina Maura Rojas, pela colaboração e agradável convivência.

À Maria Inês de Almeida Gonçalves pelo auxílio nas dosagens espectrofotométricas.

À Merck S. A. Indústrias Químicas, pela cessão de um padrão.

Ao Prof. Antonio Salatino pela boa vontade e doação de padrões.

À Beatriz Pamplona, Ricardo do Rio, Elielso Natal e Anderson H. Klier, pela atenção e doação de amostras de própolis.

*Aos amigos: Angélica e Dante pela dedicação e incentivo.
Virgínia, Salete, Geraldo e Eric pelo auxílio técnico.
Humberto, Dena e Nilza pelas sugestões.*

À Celi, pelo apoio gráfico.

À Moema, pela revisão bibliográfica.

Aos colegas da Farmácia Universitária.

A todos que ajudaram e permitiram a realização deste trabalho.

meus sinceros agradecimentos.

Í N D I C E

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Camada de Ozônio.....	1
1.2 - Radiação solar	3
1.3 - Fatores intrínsecos na defesa da pele contra o sol	8
1.4 - A necessidade de proteção solar.....	9

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Própolis	12
2.1.1 - Origem.....	12
2.1.2 - Coleta pelas abelhas.....	12
2.1.3 - Utilização na colméia.....	14
2.1.4 - Coleta pelo homem	15
2.1.5 - Características físico-químicas.....	15
2.1.6 - Breve histórico.....	16
2.1.7 - Composição química.....	16
2.1.7.1 - Compostos identificados em própolis.....	16
2.1.7.1.1 - Flavonóides.....	18
2.1.7.1.2 - Ácidos aromáticos.....	22
2.1.8 - Atividade biológica da própolis.....	25

3 - OBJETIVO - PLANO DE TRABALHO28

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Material	30
4.1.1 - Amostras de própolis	30
4.1.2 - Padrões.....	31
4.1.2.1 - Flavonóides.....	31
4.1.2.2 - Ácidos fenólicos, grau p.a.	32

4.1.2.3 - Salicilato de homomentila (homossalato), Merck, grau p.a.	32
4.1.3 - Matérias primas	32
4.1.4 - Solventes (Merck) grau p.a.	33
4.1.5 - Reagentes grau p.a.	33
4.1.6 - Soluções	33
4.1.7 - Outros materiais.....	33
4.1.8 - Aparelhos	34
4.2 - Métodos.....	35
4.2.1 - Preparação das tinturas, extratos e determinação dos resíduos secos.....	35
4.2.1.1 - Tintura a 10% p/v, (concentração relativa à amostra bruta e ao solvente utilizado).....	35
4.2.1.2 - Resíduo Seco	35
4.2.1.3 - Extrato mole a 65 % (p/p)	35
4.2.2 - Incorporação do extrato a uma base cosmética apropriada.....	36
4.2.2.1 - Testes de estabilidade física em diferentes temperaturas ¹⁰²	38
4.2.3 - Perfil cromatográfico	38
4.2.3.1 - Amostras.....	38
4.2.3.2 - Padrões	39
4.2.3.3 - Fases móveis.....	39
4.2.3.4 - Reveladores	39
4.2.4 - Estimativa dos FPSs por espectrofotometria ^{29, 30, 57, 58, 81}	39
4.2.5 - Dosagem de flavonóides totais ⁷	41
4.2.5.1 - Amostras.....	41
4.2.5.2 - Reta de Calibração	42

5 - RESULTADOS

5.1 - Incorporação de extrato de própolis em base cosmética.....	44
5.1.1 - Classificação de estabilidade física das amostras.....	44
5.2 - Perfil cromatográfico	47
5.3 - Estimativa de FPSs	53
5.4 - Dosagem de flavonóides totais.....	64
5.4.1 - Reta de calibração.....	64

6 - DISCUSSÃO

6.1 - Incorporação do extrato de própolis em base cosmética	76
6.1.1 - Concentração do extrato de própolis.....	76
6.1.2 - Ação alergênica da própolis	77
6.1.3 - Observações gerais	78
6.2 - Perfil cromatográfico	80
6.3 - Determinação do FPS <i>in vitro</i>	83
6.4 - Dosagem de flavonóides totais.....	90

7 - CONCLUSÕES.....	97
---------------------	----

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
--------------------------------------	----

RESUMO	113
--------------	-----

ABSTRACT	114
----------------	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - Corte esquemático de pele normal.	5
FIGURA 2 - Corte esquemático de pele com câncer.	5
FIGURA 3 - Estrutura química básica de flavonas e flavonóis.	19
FIGURA 4 - Estrutura química básica de flavanonas e dihidroflavonóis.	19
FIGURA 5 - Estrutura química básica de chalcona.	20
FIGURA 6 - Estrutura química básica de dihidrochalcona.	20
FIGURA 7 - Ácidos aromáticos encontrados em própolis.	22
FIGURA 8 - Ácidos aromáticos derivados do ácido cinâmico encontrados em própolis.	23
FIGURA 9 - Ésteres do ácido caféico encontrados em própolis.	24
FIGURA 10 - Comparação entre amostras de própolis e identificação de flavonóides.	47
FIGURA 11 - Comparação entre amostras de própolis e identificação de flavonóides.	48
FIGURA 12 - Comparação entre amostras de própolis e identificação de ácidos fenólicos.	50
FIGURA 13 - Comparação entre amostras de própolis e identificação de ácidos fenólicos.	51
FIGURA 14 - Curva do padrão homossalato a 8 % em base cosmética na concentração de 20 µl/100 mL de álcool etílico absoluto.	53

FIGURA 15 -Espectro de absorção da base cosmética com 10 % de extrato de própolis de Bauru - SP, na concentração de 20 µl/100 mL em álcool etílico absoluto.	55
FIGURA 16 -Espectro de absorção da base cosmética com 10 % de extrato de própolis de Bom Despacho - MG, na concentração de 20 µl/100 mL em álcool etílico absoluto.....	56
FIGURA 17 -Espectro de absorção da base cosmética com 10 % de extrato de própolis de Campos Novos - SC, na concentração de 20 µl/100 mL em álcool etílico absoluto.....	57
FIGURA 18 -Espectro de absorção da base cosmética com 10 % de extrato de própolis de Joanópolis - SP, na concentração de 20 µl/100 mL em álcool etílico absoluto.	58
FIGURA 19 -Espectro de absorção da base cosmética com 10 % de extrato de própolis de Lagoa Vermelha - RS, na concentração de 20 µl/100 mL em álcool etílico absoluto.....	59
FIGURA 20 -Espectro de absorção da base cosmética com 10 % de extrato de própolis de Ribeirão Preto - SP, na concentração de 20 µl/100 mL em álcool etílico absoluto.....	60
FIGURA 21 -Espectro de absorção da base cosmética com 10 % de extrato de própolis de Teófilo Otoni - MG, na concentração de 20 µl/100mL em álcool etílico absoluto.....	61
FIGURA 22 -Espectro de absorção da base cosmética com 10 % de extrato de própolis da Pensilvânia, EUA, na concentração de 20 µl/100 mL em álcool etílico absoluto.	62
FIGURA 23 -Reta de calibração da crisina em solução metanólica, obtida através de reação com cloreto de alumínio a 330 nm.	64

FIGURA 24 -Espectro de absorção da tintura de própolis de Bauru - SP - Reação com cloreto de alumínio.	65
FIGURA 25 -Espectro de absorção da tintura de própolis de Bom Despacho - MG - Reação com cloreto de alumínio.	66
FIGURA 26 -Espectro de absorção da tintura de própolis de Campos Novos - SC - Reação com cloreto de alumínio.	67
FIGURA 27 -Espectro de absorção da tintura de própolis de Joanópolis - SP - Reação com cloreto de alumínio	68
FIGURA 28 -Espectro de absorção da tintura de própolis de Lagoa Vermelha - RS - Reação com cloreto de alumínio.	69
FIGURA 29 -Espectro de absorção da tintura de própolis de Ribeirão Preto - SP - Reação com cloreto de alumínio.	70
FIGURA 30 -Espectro de absorção da tintura de própolis de Teófilo Otoni - MG - Reação com cloreto de alumínio.	71
FIGURA 31 -Espectro de absorção da tintura de própolis de Pensilvânia - EUA - Reação com cloreto de alumínio.	72
FIGURA 32 -Esquema de teste para determinação de FPS em seres humanos.	86
FIGURA 33 -Reação de flavonóides com $AlCl_3$ em metanol.	90
FIGURA 34 -Crisina e espectro de absorção.	91
FIGURA 35 -Estrutura flavonoídica e bandas de absorção em espectrofotometria.	95

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - Características das radiações UVB e UVA	7
TABELA 2 - Identificação das amostras de própolis	31
TABELA 3 - Formulação A - teste para incorporação do extrato de própolis	36
TABELA 4 - Formulação B - teste para incorporação do extrato de própolis	37
TABELA 5 - Formulação C - teste para incorporação do extrato de própolis	37
TABELA 6 - Ponderação empregada no cálculo do fator de proteção solar por espectrofotometria ⁵⁸	41
TABELA 7 - A-B - Resultados relativos à estabilidade física das formulações A e B, em diferentes temperaturas	45
TABELA 8 - C - Resultados relativos a estabilidade física da formulação C, em diferentes temperaturas	46
TABELA 9 - Relativa as figuras 10 e 11	49
TABELA 10 - Relativa a figura 12	52
TABELA 11 - Relativa a figura 13	52
TABELA 12 - Valores referentes a Figura 14.....	54
TABELA 13 - Absorbâncias das amostras com própolis (20 µl/100 mL)	63
TABELA 14 - FPSs estimados das amostras de própolis	63

TABELA 15 - Determinação de flavonóides totais, com cloreto de alumínio, expressos em crisina, a 330 nm, em tinturas de própolis a 10 %	73
TABELA 16 - Comparação entre resultados de dosagens de flavonóides totais e determinação de FPS.....	75
TABELA 17 - Fototipos de pele (M. A. Pathak, 1983) ⁷⁴	84
TABELA 18 - Faixa de tempo, em minutos, para causar queimaduras (eritemas) para diferentes índices de UVB	85
TABELA 19 - Comparação de resultados de flavonóides totais entre amostras de própolis analisadas (tintura a 10%).....	92

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - CAMADA DE OZÔNIO

A humanidade, durante milhares de anos, manteve-se protegida de radiações solares nocivas a sua vida devido ao escudo protetor formado pela camada de ozônio, gás, de cheiro forte e característico concentrado na estratosfera, região localizada entre 16 e 50 km da superfície terrestre.

O ozônio é produzido a partir da dissociação do O_2 por radiação UV que resultará em $O + O$ altamente reativos que irão se ligar a moléculas de O_2 formando duas de O_3 . Este ozônio formado, por ser bastante instável sofrerá fotodissociação com radiação UV de comprimento de onda inferior a 310 nm liberando oxigênio atômico.

O processo de formação e dissociação da molécula de ozônio iniciou-se há 600 milhões de anos atrás, quando começou a acumular-se na atmosfera ⁴⁵. Neste processo há um equilíbrio cuja concentração estacionária vem protegendo a vida no planeta, das radiações solares tipo ultravioleta, barrando totalmente os raios UVC, parcialmente os UVB, deixando passar totalmente a radiação UVA.

Na primeira metade do século, foram sintetizadas substâncias nocivas à camada de ozônio como os hidrocarbonetos clorofluorados (CFCs), utilizados como propelentes em aerossóis e para refrigeração em geladeiras e condicionadores de ar.

Nos anos 70 foram registradas quantidades elevadas de CFCs na atmosfera e já se previa um prejuízo significativo na camada de ozônio,

danificada pelo Cl^- que age em cadeia, destruindo, sucessivamente, as moléculas de O_3 ⁴⁵:

Esta constatação chamou atenção ao perigo a que a humanidade se expunha. Medidas legais foram tomadas e campanhas foram feitas para a substituição desses produtos, elevando-se o nível de consciência pela necessidade de uma constante proteção contra os excessos à exposição solar.

1.2 - RADIAÇÃO SOLAR

A radiação solar compreende as seguintes faixas, em ordem crescente, de comprimento de onda ^{24, 45}:

UVC	→	100 - 290 nm
UVB	→	290 - 320 nm
UVA	→	320 - 400 nm
Visível	→	400 - 800 nm
Infravermelho	→	800 - 1700 nm

A radiação solar, em doses moderadas nos é vital, pois fornece luz, calor e desencadeia uma série de reações químicas fundamentais para a vida em geral.

Radiação UVC - localizando-se entre 100 e 290 nm do espectro solar é altamente energética e perigosa à humanidade. Não alcança a superfície da Terra, devido à barreira da camada de ozônio. Assim, essa radiação só constituirá um risco para a população à medida que a camada de ozônio estiver sendo depletada.

Radiação UVB - Possuindo comprimentos de onda entre 290 e 320 nm, penetra parcialmente a camada de ozônio e é responsável pela maioria das reações fotobiológicas cutâneas induzidas pela exposição ao sol. A sensibilidade biológica é inversamente proporcional ao seu comprimento de onda. É maior em 290 nm, decrescendo para a direção de 320 nm ^{21, 45}. Em excesso, induz respostas de eritemas precoces e tardios, que alcançam picos em 24 horas, consideradas queimaduras que se transformam em bronzeamento depois de alguns dias; induzem processos inflamatórios com liberação de histamina, prostaglandinas e enzimas proteolíticas que degradam o colágeno. Gera processos como a degeneração das fibras elásticas em massa amorfa, a elastose, atuando no

envelhecimento ⁵³ precoce da pele, que se caracteriza por rugas, espessamento da pele, comedões solares, anomalias de pigmentação.

Considera-se que o envelhecimento precoce da pele ⁵⁶ ocorre devido a um nível incontrolado de peroxidação lipídica, causada pela geração de radicais livres durante a interação entre os fótons UV e os lipídios e proteínas, componentes moleculares da pele. Além disso, causa imunossupressão ^{24, 100}, atacando células de defesa da pele, propiciando infecções por vírus tipo herpes; é mutagênica, podendo inibir a síntese de DNA e RNA.

A radiação UVB é considerada responsável por lesões pré-cancerosas como a queratose actínica, por câncer de pele tipo melanoma ^{8, 82} e o principal estímulo para cânceres de pele dos tipos não melanoma ^{24, 26, 87}, ou seja, os que atacam células da camada basal e escamosa da epiderme.

Todos esses efeitos podem ser evitados com uma janela de vidro, pois os raios UVB não atravessam um vidro razoavelmente espesso ²⁴.

FIGURA 1 - Corte esquemático de pele normal.

FIGURA 2 - Corte esquemático de pele com câncer.

Radiação UVA - com um comprimento de onda mais longo, entre 320 e 400 nm consegue penetrar mais profundamente a derme ³², produzindo um significativo número de efeitos fotobiológicos como elastose de alcance mais profundo na derme, cancer e envelhecimento precoce.

A radiação UVA está presente na radiação solar na proporção de 100 a 500 vezes mais em relação aos raios UVB. Não produz inflamação e causa bronzeamento imediato ⁴⁶. Não provoca espessamento da camada córnea ⁸² como ocorre com a radiação UVB. Produz um bronzeamento pouco durador com pouca ação protetora.

TABELA 1 - Características das radiações UVB e UVA

Radiação	UVB	UVA
Espectro de ação	290-320 nm	320-400 nm
Energia da radiação	mais energético	menos energético
Tamanho do comprimento de onda	menor comprimento de onda	maior comprimento de onda
Penetração na pele	menor alcance na derme	maior alcance na derme
Danos a pele	maior ação mutagênica	menor ação mutagênica
Danos a pele	maior ação carcinogênica	menor ação carcinogênica
Ação eritemogênica	(+) causa eritema com doses relativamente pequenas	(-) pouco eritema somente em doses altíssimas
Ação inflamatória	(+) libera histamina, prostaglandinas e enzimas proteolíticas no processo inflamatório	(-) não há processo inflamatório
Estímulo de defesa	(+) causa espessamento da epiderme - queratinização	(-) não espessa a camada de queratina
Tipo de bronzeamento	(+) produz bronzeamento tardio com maior durabilidade após eritema e dor	(+) produz bronzeamento imediato sem eritema
Penetração em vidro	(-) não atravessa uma janela de vidro razoavelmente espesso ²⁴	(+) atravessa uma janela de vidro razoavelmente espesso ²⁴

1.3 - FATORES INTRÍNSECOS NA DEFESA DA PELE CONTRA O SOL ⁷¹

A pele, para proteger-se naturalmente da radiação solar possui mecanismos de defesa. São eles:

- 1 - Aumento da camada de queratina na epiderme (queratinização) cujos aminoácidos absorvem radiação ultravioleta.
- 2 - Aumento da pigmentação com melanina que absorve e dispersa radiação ultravioleta e age como anti-radical livre.
- 3 - Acúmulo de pigmento carotenóide que age como antioxidante.
- 4 - Produção de ácido urocânico que absorve radiação UV.
- 5 - Aumento da produção de enzimas antioxidantes como superóxido-dismutase e peroxidase-redutase que agem reduzindo espécies de oxigênio reativo impedindo a formação de radicais livres.
- 6 - Reparo e replicação de DNA, minimizando o risco carcinogênico induzido pela radiação UV.

Evidentemente todos esses mecanismos serão insuficientes se a exposição solar for abusiva, necessitando então de fatores de proteção externos.

1.4 - A NECESSIDADE DE PROTEÇÃO SOLAR

O aumento gradual de conscientização da população em relação aos efeitos causados pelo excesso de exposição solar, principalmente a de pele mais clara que sofre muito mais com esses efeitos, fez com que diversos países utilizassem campanhas de educação para mudança de hábitos em relação a exposição solar.

Em países da Europa, da América do Norte e Austrália, há um número muito elevado de câncer de pele e de campanhas de conscientização em relação ao problema.

Na Austrália, onde se registram os mais altos índices de câncer de pele do mundo, a população já não deseja, como antes, o bronzearamento e “tem adotado com extraordinário entusiasmo o Slip ! (on a shirt) Slop ! (on a Sunscreen) Slap ! (on a hat), programa instituído há mais de quinze anos atrás” ⁶². No Reino Unido, onde os casos de melanoma foram dobrados num período de vinte anos, a população também segue a campanha ⁸² e a educação inicia-se desde a tenra idade.

O programa que envolve pais, filhos, educadores e médicos propaga que a proteção solar é a mais importante estratégia que os dermatologistas empregam com seus pacientes e podem recomendar ao público ⁵².

Nos EUA, com grande número de casos diagnosticados como câncer de pele, chegando em 1995 a mais de 800.000 do tipo não melanoma e 34.000 do tipo melanoma ¹⁷, as campanhas de prevenção são uma preocupação constante, principalmente com o comportamento da população infantil, orientando a evitar o sol nos horários de maior incidência de radiação UVB, das 10:00 às 15:00 horas, e a usar roupas, chapéus e protetores solares, condições necessárias para evitar esse sério problema. O uso correto de protetor solar apropriado é comprovadamente eficaz, impedindo danos solares à pele ¹³.

Além do uso diário por pessoas claras, deve ser usado por pessoas que, deliberadamente, se expõem repetidas vezes ao sol, em

férias, no campo, nas praias, evitando, dessa forma, além do envelhecimento precoce, diversos danos de pele causados pelo sol, incluindo câncer de pele, tipo melanoma e não melanoma⁵³.

Embora um protetor solar que contenha filtro UVA não tenha ainda um controle definido na proteção dessa radiação, pois metodologias específicas para este fim ainda encontram-se em pesquisas pela FDA (Food and Drug Administration)²², os benefícios que um protetor solar de FPS (Fator de Proteção Solar) conhecido, anti-irradiação UVB proporciona, são de grande valor na prevenção do envelhecimento precoce, dos diversos danos causados pelo sol e comprovadamente, na redução do risco de câncer de pele tipo melanoma⁸⁷.

Há registros que mostram a correlação entre índices de câncer de pele tipo não melanoma com a alta incidência de radiação UVB. No espectro de ação para efeitos mutagênicos e carcinogênicos da radiação ultra-violeta, a radiação UVB é a mais mutagênica e carcinogênica.

A proteção contra essa radiação deve iniciar-se na infância pois até os dezoito anos de idade, devido ao maior tempo livre e à falta de consciência, nos expomos em geral, aproximadamente a 80 % da radiação solar recebida em vida. Por isso, o início do uso tardio de protetores solares dará pequena proteção contra os malefícios solares⁸⁷, cujos efeitos são cumulativos. Desta maneira, o uso de protetor solar deve ser incorporado como um hábito natural na vida, desde a tenra idade.

No Brasil, ainda não há estatísticas conclusivas sobre a incidência de câncer de pele. Em nosso país, por estarmos localizados na região equatorial, onde a camada de ozônio é mais delgada⁴⁵, temos os mais altos índices de radiação UV do planeta, em condições normais. Por isso, já existe uma proposta de programas de divulgação diária do índice de UVB pelo INPE - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, a exemplo de diversos países, para que a população possa expor-se ao sol de forma cada vez mais cuidadosa e consciente.

Desde o século IV a.C., já era difundido o uso de óleos e pomadas para a proteção da pele contra os efeitos do sol¹. Em 1928^{35, 83},

nos E.U.A., houve a introdução comercial do primeiro produto contendo filtros solares para a proteção da pele.

Várias substâncias de origem natural apresentam, também, propriedades de absorção na região do ultravioleta. Entre estas, como já foi observado em alguns trabalhos ^{11, 76, 81}, a própolis apresenta um potencial de absorção na radiação UVB, motivo pelo qual será estudada em nosso trabalho.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - PRÓPOLIS

2.1.1 - Origem

As abelhas estão presentes na natureza há mais de quarenta milhões de anos e de forma geral ^{16, 101} sem mudar seus hábitos, forma ou biologia, coletam resinas, bálsamos e gomas de plantas, modificam-nas com secreções próprias, ceras, enzimas salivares e pequenas quantidades de açúcar, produzindo a própolis ^{34, 50}.

2.1.2 - Coleta pelas abelhas

Em geral, poucas abelhas da colméia coletam a resina que será transformada em própolis, as quais também trabalham internamente na colméia na distribuição da própolis. Estas, porém, não mudam de atividade, mesmo quando há falta de abelhas para outras funções ¹⁶.

As abelhas envolvidas no processo de produção de própolis são as mais experientes, devido à importância e dificuldade de seu trabalho ¹⁸; colhem a resina de botões de flores, sépalas e pétalas, folhas, caules e cascas de árvore e dirigem-se à colméia, para o local onde se necessita de própolis.

As vezes são recebidas por outras coletoras que as auxiliam na retirada de resina de suas corbículas ¹⁰¹ que são pequenas bolsas, situadas na região superior e exterior de suas patas. Neste ponto a resina já

está modificada pelas suas enzimas salivares, sendo entregue assim, à colméia, a própolis pronta para seu uso ^{16, 66}.

A própolis colhida em regiões com clima e vegetação diferentes terá sua composição química também diferente em qualidade e ou quantidade.

A procedência vegetal, por sua vez, é bastante variável, dependendo do clima, da região geográfica, da época do ano que irá determinar o tipo de florada a ser utilizada e da raça ou sub-raça da abelha ³⁴.

Embora existam cinco espécies de abelhas produtoras de mel e própolis, a mais amplamente espalhada pelo mundo é a *Apis mellifera* a qual é dividida em três raças: a africana, a oriental e a européia que por sua vez são divididas em diversas sub-raças ¹⁰¹.

Entre as raças, nota-se uma preferência por determinada planta na hora de se colher a própolis; como exemplo, a abelha européia possui atração por exsudatos de *Populus spp*, planta inexistente no Brasil, cuja composição química característica varia conforme a espécie ³⁴.

Em nosso país, a preferência vegetal é determinada pela abelha *Apis mellifera* de raça européia, hibridizada com a raça africana, desde 1956, chamada simplesmente por africanizada.

No Brasil devido as suas dimensões e à situação geográfica que compreendem diferentes tipos de clima e vegetação há uma diversidade muito grande de substâncias químicas nas plantas colhidas pelas abelhas.

As abelhas buscam como fonte para a preparação da própolis as regiões da planta mais ricas em resinas como os botões das flores (sépalas e pétalas), as folhas e cascas das árvores como pinheiros, árvores frutíferas e arbustos.

2.1.3 - Utilização na colméia

Própolis é em termo grego que significa pro (ante, defesa) e polis (cidade), ou seja, aquilo que as abelhas utilizam para defender suas colméias.

As abelhas a utilizam para diversas finalidades como:

- diminuir ou fechar aberturas e rachaduras na colméia, protegendo-as contra:
 - a) a entrada de pequenos animais ou insetos;
 - b) ar frio ou calor excessivo, mantendo um clima ideal que é conseguido também com a circulação de ar produzida pelos movimentos das asas das abelhas.
- isolar e mumificar invasores que já foram mortos mas que devido ao seu tamanho não puderam ser retirados da colméia como lagartixas, sapos, camundongos, formigas de maior tamanho, protegendo a colméia da putrefação desses invasores.
- solidificar a construção da colméia.
- revestir com uma fina camada todos os favos da colméia, protegendo-os contra microorganismos como bactérias, vírus, fungos.
- forrar o caminho obrigatório de entrada e saída de todas as abelhas em uma espécie de ritual diário de imunização contra micróbios.

A própolis, portanto, participa da solidificação da construção, da climatização, da limpeza e da antissepsia da colméia, enfim de sua defesa.

Assim, podemos dizer que a produção e uso da própolis é um instinto natural das abelhas, mantido durante milhões de anos para garantir a sobrevivência da espécie ¹⁶.

2.1.4 - Coleta pelo homem

“A coleta tradicional da própolis é feita raspando-se as partes da colméia, o que acarreta a adição de pedaços de madeira, as vezes de tinta e pregos ao produto. Quando são utilizadas telas de plástico, estas são colocadas no *freezer* para, em consistência mais dura, serem retiradas mais facilmente” ⁷⁰.

2.1.5 - Características físico-químicas

É uma substância resinosa, de aspecto heterogêneo, que contém grande número de constituintes e de impurezas, sólida e friável a frio, tornando-se maleável e viscosa acima de 30 °C e fundindo-se entre 60-70 °C ^{18, 50, 51, 64}.

Com grande diversidade de coloração, segundo as origens e o tempo passado dentro da colméia, apresenta-se desde o amarelo claro, passando por tonalidades de castanho amarelado ao esverdeado chegando ao negro.

É insolúvel em água, parcialmente solúvel em álcool e bastante solúvel em clorofórmio e acetona ¹⁸.

Possui odor aromático que varia segundo a procedência vegetal com predominância do odor de cera e mel.

2.1.6 - Breve histórico

A própolis era conhecida por egípcios, que a utilizavam no processo de mumificação. Gregos e romanos já conheciam suas propriedades cicatrizantes.

No século XII teve seus primeiros usos em preparações medicinais destinadas a infecções buco-faríngeas, cáries dentárias e hemoptise. Os incas a utilizavam como remédio eficiente contra inflamações e febre ^{16, 51}.

Em 1908, Helfenbert ⁶⁶, cientista alemão já havia observado que a composição variada da própolis dependia de sua origem vegetal. Mas, somente com o avanço dos métodos analíticos cromatográficos e espectrais (UV, IV, EM e RMN) ¹⁸ teve sua composição química conhecida.

2.1.7 - Composição química

A própolis recolhida das colméias é constituída em média de 50 a 55% de resinas, bálsamos e gomas, 25 a 35% de ceras, 5 a 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e aproximadamente 5% de matérias diversas como partículas de abelha, fragmentos vegetais, minerais etc ^{18, 50, 51, 94}.

A composição química da própolis varia em função de alguns fatores como a origem botânica, a técnica de coleta ^{50, 51}, a parte do vegetal onde é feita a coleta das substâncias (botões, folha, caule, entre outras), a raça da abelha ³⁴ e o período de coleta.

Apesar da complexibilidade e variabilidade desta composição, podemos identificar um certo número de substâncias encontradas sistematicamente que determinam suas diversas propriedades biológicas.

2.1.7.1 - Compostos identificados em própolis

Convém lembrar que não necessariamente os constituintes estarão juntos em uma mesma amostra de própolis, podendo variar em qualidade e quantidade, agindo assim, como um indicador de origem botânica.

A listagem a seguir é formada por alguns exemplos de compostos encontrados em própolis originárias da Europa, EUA, Equador e Brasil^{18, 34, 50, 51, 59, 99}.

Acúcares: d-ribofuranose, d-frutose, d-glucitol, d-gulose, talose, sucrose, d-glucose, β -d-glucopiranosose.

Ácidos alifáticos e seus ésteres: ácido butírico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido cerótico, ácido oléico.

Ácidos aromáticos e seus ésteres: ácido benzóico, ácido cafeico, ácido cinâmico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico, cafeato de cinamila, cafeato de feniletila, benzoato de metila.

Álcoois: álcool benzílico, álcool cinamílico, glicerol, hidroquinona.

Aldeídos: benzaldeído, aldeido capróico, vanilina

Aminoácidos: alanina, arginina, glicina, histidina, hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, triptofano.

Cetonas: acetofenona, metilacetofenona, 6-metilcetona.

Chalconas e dihidrochalconas: chalcona alpinetina, chalcona naringina, chalcona pinobanksina.

Esteróides: acetato de calinasterol, acetato de estigmasterol

Flavanonas: naringenina, pinobanksina, pinocembrina, sakuranetina e seus isômeros pinostrobina e isosakuranetina.

Flavonas: acacetina, apigenina, crisina, tectocrisina, pectolinarigenina.

Flavonóis: galangina, campferide, campferol, quercetina, ramnetina, ramnocitrina, betuleina, izalpinina.

Minerais: Na, K, Mg, Ca, Ba, Sr, Zn, Cd, Al, Si, Sn, Pb, Fe, Ni, Cr, Mn, Ti, Ag, Cu, Co, Mo, V.

Terpenóides: geraniol, guaiol, farnesol, β -bisabolol, α -acetoxibetulenol.

Triterpênicos e sesquiterpenos: β -bourboneno, cariofileno, seleneno, cimeno, limoneno, estireno.

Vitaminas: A, riboflavina, do grupo B, C e E.

Os principais responsáveis pelas atividades farmacológicas da própolis são os flavonóides e ácidos aromáticos.

2.1.7.1.1 - Flavonóides

São substâncias fenólicas amplamente encontradas no reino vegetal que funcionam nas plantas como:

- Protetores contra insetos, fungos, vírus e bactérias.
- Filtros de radiação ultra-violeta, sendo encontrados frequentemente nas superfícies externas das folhas e caules.
- Atraentes de polinizadores, pois são em geral coloridos, de tons azuis, amarelos e vermelhos.

- Antioxidantes, controladores hormonais e inibidores enzimáticos ⁶¹.

Os flavonóides são divididos em diversas classes no reino vegetal ³⁸ porém os mais encontradas em própolis são ^{12, 34, 59, 67, 99} flavonóis, dihidroflavonóis, flavonas, flavanonas, chalconas e dihidrochalconas.

Estruturas químicas básicas de flavonóides encontrados em própolis:

FIGURA 3 - Estrutura química básica de flavonas e flavonóis.

Se R1 = H representará uma flavona

Se R1 = OH representará um flavonol

FIGURA 4 - Estrutura química básica de flavanonas e dihidroflavonóis.

Neste caso, a estrutura traduz uma flavanona ou dihidroflavonol já que a ligação entre os carbonos C2 e C3 é saturada.

Se R1 = H representará uma flavanona (ou dihidroflavona)

Se R1 = OH representará um dihidroflavonol.

FIGURA 5 - Estrutura química básica de chalcona.

FIGURA 6 - Estrutura química básica de dihidrochalcona.

A diferenciação é feita entre os carbonos α e β , pela presença ou ausência de insaturação.

Exemplos:

Flavonas	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Crisina	H	OH	H	OH	H	H
Tectocrisina	H	OH	H	OCH ₃	H	H
Apigenina	H	OH	H	OH	OH	H
Acacetina	H	OH	H	OH	OCH ₃	H
Pectolinarigenina	H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	H

Flavonóis	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Campferide	OH	OH	H	OH	OCH ₃	H
Quercetina	OH	OH	H	OH	OH	OH
Betuleina	OH	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	H
Ramnocitrina	OH	OH	H	OCH ₃	OH	H
Campferol	OH	OH	H	OH	OH	H
Izalpinina	OH	OH	H	OCH ₃	H	H
Galangina	OH	OH	H	OH	H	H

Flavanonas	R1	R2	R3	R4
Pinocembrina	H	OH	OH	H
Pinostrobina	H	OH	OCH ₃	H
Sakuranetina	H	OH	OCH ₃	OH
Pinobanksina	OH	OH	OH	H

2.1.7.1.2 - Ácidos aromáticos

Ácidos aromáticos como flavonóides são substâncias fenólicas amplamente encontradas no reino vegetal e dentro de suas funções nas plantas, também participam da defesa contra fungos e bactérias, pois substâncias fenólicas são incomuns em microorganismos, podendo ser nocivas a eles.

Alguns ácidos fenólicos do tipo hidroxicinâmicos como o cafeico, ferúlico ou cumárico são encontrados nas superfícies de folhas e exsudatos de botões; são frequentemente O-metilados e ocorrem sob a forma de ésteres, como geralmente são encontrados em própolis⁹⁰.

Os principais ácidos aromáticos encontrados em própolis são: ácido cumárico, ácido cafeico, ácido cinâmico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido benzóico, ácido gentísico, ácido vanílico, ácido salicílico que são observados também em forma de ésteres.

Principais estruturas químicas de ácidos aromáticos encontrados em própolis:

	R1	R2	R3	R4
Ácido salicílico	OH	H	H	H
Ácido vanílico	H	OCH ₃	OH	H
Ácido gálico	H	OH	OH	OH
Ácido gentísico	OH	H	H	OH

FIGURA 7 - Ácidos aromáticos encontrados em própolis.

FIGURA 8 - Ácidos aromáticos derivados do ácido cinâmico encontrados em própolis.

São bastante comuns também em forma de ésteres, como:

Cafeato de metila

Cafeato de feniletila

Cafeato de fenildimetiletila

FIGURA 9 - Ésteres do ácido cafeico encontrados em própolis.

2.1.8 - Atividade biológica da própolis

A maior parte dos estudos farmacológicos concernentes a esta substância foram realizados em países do leste europeu, principalmente na ex-URSS e suas atividades antibacterianas e fungistáticas foram comprovadas pela primeira vez na França por Lavie em 1960, com um trabalho que mostra a galangina (trihidroxi-flavona) como responsável por estas atividades. Dez anos mais tarde, foi isolada a pinocembrina, uma dihidroxi-flavona que mostra ter uma atividade bacteriostática similar à galangina, mais efetiva contra bactérias gram positivas^{23, 66, 103}.

Outras pesquisas na antiga Tchecoslovaquia demonstraram atividade da própolis contra microsporum, trichofiton, candida e micobactéria⁶⁶, além das atividades antiblastomices e antiprotozoárias^{48, 66, 92}.

Resultados diferentes foram observados com própolis de origens diferentes.

Com o avanço das pesquisas foram observadas, em própolis, diversas propriedades farmacológicas como: ação antibacteriana^{23, 48, 49, 60, 69, 72, 85, 91, 92, 103}, - fungistática^{23, 66, 85, 92}, - anestésica local^{69, 92}, - cicatrizante de feridas, úlceras⁶⁰ e tuberculose e no tratamento de eczemas em estomatologia^{5, 10, 48, 66, 67}, propriedades imunostimulantes na imunidade celular pelo aumento do número de células formadoras de placas no baço, regeneradora de tecido, devido a presença de aminoácidos livres como arginina que estimula a mitose e aumenta a biossíntese protéica e pela prolina que promove o aumento da formação do colágeno e elastina⁹², - ação antiviral⁶⁰ demonstrado *in vitro* contra virus influenza, virus vaccinia, virus hepatite B, virus tipo herpes simplex, entre outros, atribuída a ácidos aromáticos como o ácido cafeico e a seus ésteres como o cafeato de 3-metil-but-2-enil isolado de *Populus nigra* L. e encontrado em própolis de colméias vizinhas a este tipo de vegetação^{3, 20, 43, 69, 85}.

À própolis é atribuída ainda a propriedade de estimulante de crescimento capilar, através de derivados do ácido fenil-propenóico extraídos de própolis de origem brasileira⁸⁰.

Foram também demonstradas as ações citostática^{36, 48, 69, 89} e citotóxica preferencial por células tumorais³⁶ de outro éster do ácido cafeico, o cafeato de feniletila e ainda, ações antiinflamatória, imunoestimulante, antifúngica, antibacteriana e antioxidante do ácido cafeico e seus ésteres e de outros ácidos aromáticos encontrados em própolis^{77, 88}.

Os flavonóides e ácidos aromáticos são, portanto, os principais responsáveis pelas atividades antibacteriana, antiviral e antifúngica⁵⁰, antiinflamatória²⁸ e anticarcinogênica⁴².

Chegam os flavonóides em determinadas amostras de própolis a alcançar 25 a 30% do peso de seu extrato seco⁴⁷ e a eles são ainda atribuídas atividades antiinflamatória, analgésica, anestésica local, antialérgica, antiaterosclerótica e antimetastática⁶⁹.

Numerosos trabalhos mostram propriedades farmacológicas dos flavonóides como as da quercetina, que fixa a histamina, indicada no tratamento de herpes⁶⁶ e associada a vitamina C atua como antiinflamatório sobre os capilares no tratamento de doenças caracterizadas pelo aumento de fragilidade capilar. A quercetina e a crisina, as quais ocorrem comumente em plantas medicinais⁶⁹, possuem atividades fisiológicas como espasmolítica, antiinflamatória, citostática e antiviral. A campferide e pectolinarigenina possuem propriedades espasmolíticas, a luteolina e a apigenina anti-úlceras, a pinocembrina e galangina determinam a atividade antibacteriana da própolis; a pinocembina possui, também, propriedades fungicida e anestésica local¹⁰, a naringenina mostrou-se ativa contra alguns tipos de fungos testados e a taxifolina mostrou atividade antiinflamatória similar à hidrocortisona³³.

Os flavonóides, na natureza, podem ser encontrados em suas formas glicosídios ou agliconas, ou seja, ligados ou não a moléculas de açúcar.

Em própolis, pela literatura, tem sido encontrados somente flavonóides agliconas^{33, 69}, fato este interessante, pois sabe-se que a glicosilação diminui a atividade antimicrobiana dos flavonóides³³.

Encontram-se, em própolis, somente flavonóides agliconas, provavelmente devido ao fato de serem encontrados em superfícies de folhas e em exsudatos de botões e são estruturalmente diferentes dos existentes no interior da planta ⁶¹. Os flavonóides encontrados na superfície são metilados ou acilados mas sem substituições por açúcares e ocorrem principalmente nas células de superfície da camada epidérmica provavelmente para a proteção contra os raios ultra violeta ³⁸.

Isso nos leva a crer que a própolis possa, de certa forma, nos estender também esta proteção, sob a forma de cosmético, ao lado de xampús e loções anti-caspa, devido a sua propriedade anti-fúngica ⁵¹, em anti-sépticos bucais e formulações anti-acneicas por suas ações anti-bacteriana e cicatrizante ^{5, 50, 73}.

Pois apesar dos inúmeros trabalhos feitos e descobertas realizadas, a própolis não têm seu potencial farmacológico totalmente desvendado, dando margens a contínuas pesquisas que certamente nos levarão a um maior desfrute de seus inúmeros benefícios.

3 - OBJETIVO - PLANO DE TRABALHO

Com o aumento da conscientização dos efeitos causados pela exposição abusiva à radiação solar e a crescente busca por produtos que minimizem tais malefícios através de pesquisas de substâncias que proporcionem esta proteção, propomos o estudo de um produto de origem bio-vegetal, a própolis, com conhecido potencial anti-solar ^{11, 76, 81} devido à sua composição química rica em compostos fenólicos.

O objetivo do nosso trabalho é estudar o potencial de proteção solar, contra a radiação ultra-violeta B de amostras de própolis de origens geográficas e botânicas diversificadas, incorporadas em base dermatológica apropriada, através de método espectrofotométrico, que nos dará os resultados em FPS (fator de proteção solar). Trabalharemos com amostras de origem diversas que serão utilizadas como tinturas e extratos.

A escolha da base cosmética será feita pela observação da compatibilidade física com as amostras e através de testes de estabilidade em diferentes temperaturas.

As amostras serão incorporadas sob a forma de extrato mole para retirarmos o álcool etílico, substância indesejável em nossa formulação e obtermos uma melhor concentração de sua composição química.

Sabemos que em grande parte os responsáveis pela propriedade anti-solar da própolis são substâncias fenólicas como ácidos aromáticos e flavonóides ⁷⁶.

Será feita uma avaliação qualitativa destas substâncias utilizando-se cromatografia em camada delgada e quantitativa de

flavonóides totais através de dosagem espectrofotométrica com cloreto de alumínio em metanol.

Serão analisados em paralelo os resultados das dosagens de flavonóides totais e os FPSs de suas respectivas amostras.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - MATERIAL

4.1.1 - Amostras de própolis

Trabalhamos com oito amostras de própolis bruta coletadas em diferentes regiões geográficas com diferentes tipos de vegetação e duas amostras de própolis sob a forma de extrato seco, originárias de Alsácia e Israel, como mostra a Tabela 2.

A origem obedeceu aos critérios de diversificação desejada e disponibilidade de obtenção das amostras.

TABELA 2 - Identificação das amostras de própolis

Nº	Procedência	Produtor	Vegetação
1	Bauru - SP	Chácara das Abelhas	barbatimão, jurubeba, goiabeira
2	Bom Despacho - MG	Apiário Embú	eucalipto
3	Campos Novos - SC	Fazenda do Alegre	araucária, angico, cambarazinho
4	Joanópolis - SP	Eliélcio Natal	capixingui, jacarandá, açoita-cavalo, embauva, jacaré, chimbeva
5	Lagoa Vermelha - RS	Sítio Mel do Sul	arueira, canela, angico
6	Ribeirão Preto - SP	Antonio Carlos Meda	eucalipto, soja, café, arroz, feijão
7	Teófilo Otoni - MG	Anderson	cipó de São João, vassourinha, com predominância de açá-peixe
8	Pensilvânia - EUA	Sigma	não revelado
9	Alsácia - França	Sigma	não revelado
10	Israel	Sigma	não revelado

4.1.2 - Padrões

4.1.2.1 - Flavonóides

- miricetina
- crisina
- naringerina
- quercetina
- apigenina
- crisoeriol
- campferol

Com exceção do campferol, sintetizado no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, os flavonóides foram de procedência Sigma.

4.1.2.2 - Ácidos fenólicos, grau p.a.

- ácido benzóico
- ácido gálico
- ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico
- ácido ferúlico
- ácido ortocinâmico
- ácido sinápico
- ácido cafeico
- ácido cumárico

Com exceção dos ácidos cafeico e cumárico, da Merck, os demais foram de procedência Sigma.

4.1.2.3 - Salicilato de homomentila (homossalato), Merck, grau p.a.

4.1.3 - Matérias primas

- álcool cetoestearílico sulfatado, Aquatec
- éster decílico do ácido oléico, Henkel
- monoestearato de glicerila, Henkel
- oleato de glicerila etoxilado ⁶, Henkel
- oleato de sorbitan etoxilado, Henkel
- cera crodabase CR-2, Croda
- vaselina líquida, nacional
- glicerina, nacional
- óleo de silicone 200/350 cs, GAF
- polietilenoglicol 400, nacional

4.1.4 - Solventes (Merck) grau p.a.

- etanol absoluto
- metanol
- tolueno
- acetato de etila
- ácido fórmico
- acetona

4.1.5 - Reagentes grau p.a.

- difenilboriloxietilamina, Roth
- vapores de amônia, Merck
- cloreto de alumínio, Merck

4.1.6 - Soluções

- soluções de ácidos fenólicos e flavonóides, vide 4.1.2, a 0,05% em etanol absoluto ⁹⁸
- solução de AlCl_3 a 2% em metanol ⁷
- solução de difenilboriloxietilamina a 1% em metanol ⁹⁸
- solução de crisina a 0,02% em metanol ⁷⁹
- álcool 70% v/v

4.1.7 - Outros materiais

- placas de sílica gel 60 F₂₅₄ 20 x 20, Merck
- papel de filtro qualitativo, nacional
- papel de pH 0-14, Universal, Merck
- microcapilares de vidro
- cubas de vidro próprias para as placas utilizadas

4.1.8 - Aparelhos

- balança eletrônica BG 4000
- balança analítica Sartorius
- estufas Fanen, modelo 315 SE
- dessecador
- banho-maria
- liquidificador Walita
- agitador mecânico Walita mix
- freezer
- congelador
- lâmpada UV 366 nm
- micropipetador automático Gilson
- espectrofotômetro Beckmann, modelo DU-70
- capela de exaustão

4.2 - MÉTODOS

4.2.1 - Preparação das tinturas, extratos e determinação dos resíduos secos

As amostras foram trituradas em liquidificador com velocidade alta por aproximadamente três minutos ou até obtenção de pó finíssimo.

4.2.1.1 - Tintura a 10% p/v, (concentração relativa à amostra bruta e ao solvente utilizado)

Cada amostra assim triturada foi macerada em álcool a 70% na proporção de 1:3 p/p por dez dias, com agitação manual esporádica sendo decantado e trocado o líquido extrator de três em três dias, na mesma proporção, até quando o terceiro e último líquido decantado mostrou-se quase límpido. O volume decantado total foi filtrado em papel de filtro qualitativo, completando-se o volume final para que fosse obtida uma tintura a 10%.

4.2.1.2 - Resíduo Seco

As determinações de resíduo seco foram feitas em triplicata.

As cápsulas de porcelana foram secas, em estufa a 105 °C ²⁵ por três horas, resfriadas e mantidas em dessecador até peso constante. Repetiu-se o processo pesando-se 1 g de tintura. Com a obtenção final dos pesos dos resíduos, calculou-se a porcentagem de resíduo seco de cada amostra.

4.2.1.3 - Extrato mole a 65 % (p/p)

Este extrato foi obtido a partir da tintura a 10 % que foi pesada em cápsula de porcelana e levada ao banho maria a 40 °C ⁶, sendo evaporada até consistência pastosa cerca de 65 % p/p de resíduo seco ²⁵.

Este extrato foi utilizado na incorporação em base cosmética da qual foi estimada a absorção de radiação UVB *in vitro*, por espectrofotometria.

4.2.2 - Incorporação do extrato a uma base cosmética apropriada

Foram estudadas três formulações:

TABELA 3 - Formulação A - teste para incorporação do extrato de própolis

Fases da Emulsão	Constituintes	Concentração	Estudo Crítico
Óleo	Extrato mole de própolis	10%	Princípio ativo
Óleo	Álcool cetosteárilico sulfatado	12%	Agente de consistência auto emulsivo
Óleo	Vaselina líquida	5%	Emoliente
Óleo	Éster decílico do ácido oleico	5%	Emoliente emulsionante
Água	Glicerina	5%	Umectante
Água	Água destilada	qsp 100 g	Veículo

TABELA 4 - Formulação B - teste para incorporação do extrato de própolis

Fases da Emulsão	Constituintes	Concentração	Estudo Crítico
Óleo	Extrato de própolis	10 %	Princípio ativo
Óleo	Monoestearato de glicerila	5 %	Agente de consistência e emulsionante
Óleo	Álcool cetosteárilico sulfatado	5 %	Agente de consistência auto emulsivo
Óleo	Óleo de silicone 200/350 cs	1 %	Emoliente/protetor
Óleo	Vaselina líquida	2 %	Emoliente
Óleo	Oleato de glicerila etoxilado ⁶	6 %	Emulsionante
Água	Polietilenoglicol 400	3 %	Umectante
Água	Oleato de sorbitan etoxilado	3 %	Emulsionante
Água	Água destilada	qsp 100 g	veículo

TABELA 5 - Formulação C - teste para incorporação do extrato de própolis

Fases da Emulsão	Constituintes	Concentração	Estudo Crítico
Óleo	Extrato de própolis	10 %	Princípio ativo
Óleo	Cera Crodabase CR-2	20 %	Agente de consistência, emoliente, emulsionante
Água	Propilenoglicol	5 %	Umectante
Água	Água destilada	qsp 100 g	Veículo

A cera Crodabase CR-2 contém ceras etoxiladas misturadas a emulsificantes e emolientes.

As formulações foram feitas da seguinte forma:

A fase aquosa foi separada da fase oleosa e os recipientes foram levados a aquecimento até 70 °C. A fase aquosa foi adicionada à oleosa sob agitação com agitador mecânico, por 4 a 5 minutos até formação de emulsão estável com o aumento de consistência.

4.2.2.1 - Testes de estabilidade física em diferentes temperaturas ¹⁰²

Foram realizados nas seguintes condições:

	Freezer	Congelador	T.A.	Estufa	Estufa
Temperatura	-20 °C	-5 °C	T.A	40 e 45 °	50 °C
Tempo de exposição 24 h		7 dias	4 meses	3 meses	7 dias

Foram testadas as bases cosméticas com extratos incorporados e seus respectivos brancos em frascos-ampola transparentes. As observações foram feitas desde o momento da confecção até o término do teste.

O pH foi medido com fita de papel de pH da Merck.

4.2.3 - Perfil cromatográfico

4.2.3.1 - Amostras

Com exceção das amostras de Alsacia e Israel da Sigma, adquiridas sob forma de extrato, que diluimos a 0,05 % em etanol absoluto, as amostras utilizadas foram tinturas de própolis a 10%.

4.2.3.2 - Padrões

Foram preparados na concentração de 0,05 % em etanol absoluto⁹⁸.

As amostras e padrões foram aplicados nas cromatoplasacas de sílica gel 60 F₂₅₄, com 20X20 cm, através de microcapilares.

4.2.3.3 - Fases móveis

Foram utilizados:

- Tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (36:12:5)⁹⁶
- Tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (40:10:5)^{51, 96}
- Tolueno: acetona (8:2)⁶⁷

A distância percorrida pela fase móvel do *start* ao *front* foi de 10 cm em todas as placas.

4.2.3.4 - Reveladores

- Radiação ultra-violeta a 366 nm³⁹
- Solução metanólica a 1% de difenilboriloxietilamina⁹⁸
- Vapores de amônia³⁹

4.2.4 - Estimativa dos FPSs por espectrofotometria^{29, 30, 57, 58, 81}

Para a avaliação quantitativa de absorção de radiação UVB das amostras cosméticas contendo extrato de própolis, utilizamos o método de Mansur⁵⁸. As amostras utilizadas para as leituras resultaram da diluição

de 20 µl das bases cosméticas em álcool etílico absoluto, quantidade suficiente para 100 mL em balão volumétrico.

Foi traçado o espectro de absorção na região do UV entre 200 e 400 nm. Dentro da faixa de UVB, ou seja, de 290 a 320 nm medimos os valores de absorbâncias de 5 em 5 nm.

A fórmula⁵⁸ utilizada para a estimativa dos FPSs espectrofotométricos foi a seguinte:

$$\text{FPS espectrofotométrico} = \text{FC} \cdot \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot \text{abs}(\lambda), \text{ onde:}$$

FC = Fator de correção (= 10), determinado de acordo com dois filtros solares de FPS (Fator de Proteção Solar) já conhecidos através de metodologia *in vivo*. Um deles é o homossalato a 8 % em creme, cujo FPS é igual a 4, também utilizado em nosso trabalho.

EE (λ) = efeito eritemogênico da radiação de comprimento de onda (λ).

I (λ) = intensidade do sol no comprimento de onda (λ).

abs = leitura espectrofotométrica da absorbância da solução do filtro solar no comprimento de onda (λ).

No espectro de radiação UVB da energia solar, cada comprimento de onda tem um efeito eritemogênico característico cujo pico máximo encontra-se ao redor de 305 nm. Existe também, uma variação na radiação UVB em relação à sua intensidade que aumenta de 290 a 320 nm.

De forma geral, para a utilização da fórmula de estimativa de FPS por método espectrofotométrico, foram encontrados valores relacionados às variações de intensidade e efeito eritemogênico, como mostra a Tabela 6.

TABELA 6 - Ponderação empregada no cálculo do fator de proteção solar por espectrofotometria⁵⁸

Comprimento de onda	EExI (valores relativos)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180

As amostras foram lidas em triplicata contra um branco contendo a base cosmética sem extrato de própolis, diluída a 20 µl/100 mL em álcool etílico absoluto.

Em nossa base cosmética o padrão utilizado foi homossalato a 8 %, padrão de referência pela FDA (Food and Drug Administration) e SAA (Standards Association of Australia) e Colipa (Countries Trade Association) utilizado em testes biológicos.

4.2.5 - Dosagem de flavonóides totais ⁷

4.2.5.1 - Amostras

Foram utilizados 1 g de cada tintura de própolis a 10 %, evaporadas a 40 °C em banho-maria até total secura, quando então foram diluídas com metanol para um volume em mL, igual ao peso de seu resíduo seco em mg. Foi retirado então 1 mL dessa solução e completado o volume para 50 mL com metanol em balão volumétrico.

Dessa última diluição foram retirados 5 mL e adicionados 5 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio a 2 % (p/v). As leituras de absorvâncias foram feitas após 10 minutos de reação, contra brancos contendo amostras diluídas em metanol em partes iguais ⁷.

4.2.5.2 - Reta de Calibração

As leituras foram feitas a 330 nm e seus resultados foram baseados em uma reta de calibração elaborada a partir de uma solução metanólica de crisina com concentração de 2 mg por 100 mL ⁷⁹.

Partindo desta solução fizemos diluições em metanol obtendo as seguintes concentrações:

Solução de crisina a 2 mg/100mL		Total da solução		Concentrações
(mL)		(mL)		(mL)
2	:	10	-	4
3	:	10	-	6
4	:	10	-	8
5	:	10	-	10
6	:	10	-	12
7	:	10	-	14
8	:	10	-	16
9	:	10	-	18

Os pontos da reta foram obtidos mediante os valores de absorvâncias da reação das soluções diluídas de crisina com a solução metanólica de AlCl_3 a 2 % p/v em partes iguais.

As leituras foram feitas contra um branco contendo metanol e solução metanólica de AlCl_3 a 2 % nas mesmas proporções.

Por motivo de praticidade, tanto na confecção da reta de calibração como no cálculo das concentrações nas amostras, a diluição final com o reagente de cor não foi considerada.

5 - RESULTADOS

5.1 - INCORPORAÇÃO DE EXTRATO DE PRÓPOLIS EM BASE COSMÉTICA

As tinturas e extratos moles obtidos apresentaram odor e coloração que variaram de acordo com a procedência das amostras, passando a coloração entre tons de marrom esverdeado ao marrom escuro.

Os odores característicos da própolis apresentaram variação, sendo os mais evidentes com fundo de eucalipto e semelhante a baunilha, respectivamente de Bom Despacho e Ribeirão Preto que possuíam eucalipto em sua vegetação de origem e da Pensilvânia - EUA, cuja flora não fora identificada.

O extrato mole a 65 % mostrou consistência de resina pastosa.

Os resultados dos testes de estabilidade física em temperatura das bases cosméticas incorporadas com os extratos moles de própolis obedeceram a seguinte classificação e seus resultados encontram-se nas tabelas A-B e C.

5.1.1 - Classificação de estabilidade física das amostras

1. Estável
2. Fases levemente separadas
3. Início de separação de fases
4. Notória separação de fases
5. Fases totalmente separadas

As formulações testadas foram identificadas como A, B e C (vide material e métodos), identificação esta, estendida às tabelas que mostram seus respectivos resultados.

TABELA 7 - A-B - Resultados relativos à estabilidade física das formulações A e B, em diferentes temperaturas

Temperatura Tempo de Exposição						
	- 20 °C	-5 °C	T.A.	40 °C	45 °C	50 °C
Resultados	24 horas 1	7 dias 1	1 mês 1	3 dias 1	3 dias 1	1 dia 1
			2 meses 1	7 dias 1	7 dias 1	3 dias 1
			3 meses 1	14 dias 1	14 dias 1	7 dias 2
			4 meses 1	21 dias 1	21 dias 1	
				1 mês 1	1 mês 1	
				2 meses 1	2 meses 1	
				3 meses 1	3 meses 1	

Obs: As formulações A e B apresentaram o mesmo resultado, com exceção de um amolecimento mais acentuado da formulação A a 50 °C.

TABELA 8 - C - Resultados relativos a estabilidade física da formulação C, em diferentes temperaturas

Temperatura Tempo de Exposição	- 20 °C	-5 °C	T.A.	40 °C	45 °C	50 °C
Resultados	24 horas 1	7 dias 1	1 mês 1	3 dias 1	3 dias 3	1 dia 3
			2 meses 1	7 dias 1	7 dias 4	3 dias 4
			3 meses 1	14 dias 1	14 dias 4	7 dias 4
			4 meses 1	21 dias 1	21 dias 4	
				1 mês 1	1 mês 4	
				2 meses 1	2 meses 4	
				3 meses 1	3 meses 4	

Baseados nestes resultados, fizemos a escolha de formulação B para ser utilizada em nossas determinações de FPSs.

Esse teste de estabilidade também mostrou que houve compatibilidade entre os extratos e a base, resultando uma formulação homogênea de coloração doada pelo extrato, diferindo em tonalidades que foram do amarelo esverdeado até o marrom e de odor característico da própolis, variando de acordo com a amostra.

O pH final das formulações medidos no momento da confecção e quatro meses depois mostrou-se igual a 4.

As formulações mostraram bom espalhamento sobre a pele.

5.2 - PERFIL CROMATOGRÁFICO

Os resultados obtidos do perfil cromatográfico através de CCD (cromatografia em camada delgada) foram os seguintes:

FIGURA 10 - Comparação entre amostras de própolis e identificação de flavonóides.

Fase estacionária - Placa silica gel 60 F₂₅₄, 20 X 20 cm

Fase móvel - Tolueno: acetona (8:2) ⁶⁷

Reveladores - Radiação ultravioleta a 366 nm e solução metanólica a 1% de difenilboriloxietilamina ⁹⁸ (Vide Tabela 9 - página 49).

FIGURA 11 -Comparação entre amostras de própolis e identificação de flavonóides.

Fase estacionária - Placa de silicagel 60 F₂₅₄, 20 X 20 cm

Fase móvel - Tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (36:12:5) ⁹⁶

Reveladores - Radiação ultravioleta a 366 nm e solução metanólica a 1% de difenilboriloxietilamina ⁹⁸ (Vide Tabela 9 - página 49).

TABELA 9 - Relativa as figuras 10 e 11

Amostras de própolis	Padrões de flavonóides
A - Bauru - SP	a - Campferol
B - Bom Despacho - MG	b - Miricetina
C - Campos Novos - SC	c - Crisina
D - Joanópolis - SP	d - Naringenina
E - Lagoa Vermelha - RS	e - Quercetina
F - Ribeirão Preto - SP	f - Apigenina
G - Teófilo Otoni - MG	g - Crisoeriol
H - Pensilvânia - EUA	
I - Alsacia - França	
J - Israel

FIGURA 12 - Comparação entre amostras de própolis e identificação de ácidos fenólicos.

Fase estacionária - Placa de silicagel 60 F₂₅₄, 20 X 20 cm

Fase móvel - Tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (40:10:5) ^{51, 95}

Reveladores: Radiação ultra violeta a 366 nm e vapores de amônia ³⁹ (Vide Tabela 10 - página 52).

FIGURA 13 - Comparação entre amostras de própolis e identificação de ácidos fenólicos

Fase estacionária - Placa de silicagel 60 F₂₅₄, 20 X 20 cm

Fase móvel - Tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (36:12:5) ⁹⁶

Reveladores: Solução metanólica a 1% de difenilboriloxietilamina ⁹⁸ (Vide Tabela 11 - página 52).

TABELA 10 - Relativa a figura 12

Amostras de própolis	Padrões de ácidos fenólicos
A - Bauru - SP	a - Ácido benzóico
B - Bom Despacho - MG	b - Ácido gálico
C - Campos Novos - SC	c - Ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico
D - Joanópolis - SP	d - Ácido ferúlico
E - Lagoa Vermelha - RS	e - Ácido orto-cumárico
F - Ribeirão Preto - SP	f - Ácido sinápico
G - Teófilo Otoni - MG	g - Ácido cafeico
H - Pensilvânia - EUA	h - Ácido cinâmico
I - Alsacia	
J - Israel	

TABELA 11 - Relativa a figura 13

Amostras de própolis	Padrões de ácidos fenólicos
A - Bauru - SP	a - Ácido gálico
B - Bom Despacho - MG	b - Ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico
C - Campos Novos - SC	c - Ácido ferúlico
D - Joanópolis - SP	d - Ácido orto-cumárico
E - Lagoa Vermelha - RS	e - Ácido sinápico
F - Ribeirão Preto - SP	f - Ácido cafeico
G - Teófilo Otoni - MG	
H - Pensilvânia - EUA	
I - Alsacia - França	
J - Israel	

5.3 - ESTIMATIVA DE FPSs

FIGURA 14 - Curva do padrão homossalato a 8 % em base cosmética na concentração de 20 μ l/100 mL de álcool etílico absoluto.

Os cálculos foram feitos utilizando-se a média de três leituras de absorbância e a seguinte fórmula:

$$\text{FPS espectrofotométrico} = \text{FC} \times \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \times l(\lambda) \times \text{abs.}(\lambda).$$

TABELA 12 - Valores referentes a Figura 14

Comprimento de onda	Absorbância	EE (λ) x l (λ)	Somatória para cálculo do FPS
290	0,2667	0,0150	0,0040005
295	0,3513	0,0817	0,0287012
300	0,4266	0,2874	0,1226048
305	0,4720	0,3278	0,1547216
310	0,4615	0,1864	0,0860236
315	0,4050	0,0839	0,0339795
320	0,3056	0,0180	0,0055008
			0,435532

Com a somatória dos produtos das absorbâncias e das constantes relativas obtidas de EE x l solares em cada comprimento de onda, obtivemos um valor que multiplicado ao fator de correção (10) expressa o FPS estimado do produto. Portanto, continuando teremos $0,435532 \times \text{FC} (10) = 4,35532$ ou seja, um FPS estimado em 4,35. Como o FPS é um número inteiro será aproximado para 4.

FIGURA 15 - Espectro de absorção da base cosmética com 10 % de extrato de própolis de Bauru - SP, na concentração de 20 μ l/100 mL em álcool etílico absoluto.

FIGURA 16 - Espectro de absorção da base cosmética com 10 % de extrato de própolis de Bom Despacho - MG, na concentração de 20 μ l/100 mL em álcool etílico absoluto.

FIGURA 17 - Espectro de absorção da base cosmética com 10 % de extrato de própolis de Campos Novos - SC, na concentração de 20 μ l/100 mL em álcool etílico absoluto.

FIGURA 18 - Espectro de absorção da base cosmética com 10 % de extrato de própolis de Joanópolis - SP, na concentração de 20 μ l/100 mL em álcool etílico absoluto.

FIGURA 19 - Espectro de absorção da base cosmética com 10 % de extrato de própolis de Lagoa Vermelha - RS, na concentração de 20 μ l/100 mL em álcool etílico absoluto.

FIGURA 20 - Espectro de absorção da base cosmética com 10 % de extrato de própolis de Ribeirão Preto - SP, na concentração de 20 μ l/100 mL em álcool etílico absoluto.

FIGURA 21 - Espectro de absorção da base cosmética com 10 % de extrato de própolis de Teófilo Otoni - MG, na concentração de 20 μ l/100mL em álcool etílico absoluto.

FIGURA 22 - Espectro de absorção da base cosmética com 10 % de extrato de própolis da Pensilvânia, EUA, na concentração de 20 μ l/100 mL em álcool etílico absoluto.

Para as amostras, os cálculos foram procedidos da mesma forma, tendo como valores variáveis as absorvâncias e os FPSs, que constam das seguintes Tabelas 13 e 14, respectivamente.

TABELA 13 - Absorvâncias das amostras com própolis (20 µl/100 mL)

	Absorvâncias						
Comprimento de onda → Procedência ↓	290	295	300	305	310	315	320
Bauru - SP	0,4502	0,4717	0,4811	0,4816	0,4790	0,4750	0,4597
Bom Despacho - MG	0,4404	0,4610	0,4697	0,4688	0,4656	0,4614	0,4462
Campos Novos - SC	0,3131	0,2880	0,2787	0,2681	0,2478	0,2258	0,1952
Joanópolis - SP	0,4592	0,4776	0,4855	0,4839	0,4800	0,4745	0,4574
Lagoa Vermelha - RS	0,1465	0,1290	0,1189	0,1097	0,0996	0,0921	0,0851
Ribeirão Preto - SP	0,4642	0,4837	0,4932	0,4937	0,4908	0,4849	0,4676
Teófilo Otoni - MG	0,4203	0,4080	0,3792	0,3519	0,3335	0,3242	0,3146
Pensilvânia - EUA	0,8628	0,8392	0,8055	0,7757	0,7644	0,7666	0,7789

TABELA 14 - FPSs estimados das amostras de própolis

Procedência das amostras	FPS
Bauru - SP	4,78
Bom Despacho - MG	4,66
Campos Novos - SC	2,65
Joanópolis - SP	4,82
Lagoa Vermelha - RS	1,10
Ribeirão Preto - SP	4,90
Teófilo Otoni - MG	3,59
Pensilvânia - EUA	7,88

5.4 - DOSAGEM DE FLAVONÓIDES TOTAIS

5.4.1 - Reta de calibração

Os resultados de flavonóides totais dosados por método espectrofotométrico com cloreto de alumínio em tinturas a 10 % de amostras de própolis foram baseados na seguinte reta de calibração:

FIGURA 23 - Reta de calibração da crisina em solução metanólica, obtida através de reação com cloreto de alumínio a 330 nm.

FIGURA 24 - Espectro de absorção da tintura de própolis de Bauru - SP
- Reação com cloreto de alumínio.

FIGURA 25 - Espectro de absorção da tintura de própolis de Bom Despacho - MG - Reação com cloreto de alumínio.

FIGURA 26 - Espectro de absorção da tintura de própolis de Campos Novos - SC - Reação com cloreto de alumínio.

**FIGURA 27 - Espectro de absorção da tintura de própolis de Joanópolis
- SP - Reação com cloreto de alumínio .**

FIGURA 28 - Espectro de absorção da tintura de própolis de Lagoa Vermelha - RS - Reação com cloreto de alumínio.

FIGURA 29 - Espectro de absorção da tintura de própolis de Ribeirão Preto - SP - Reação com cloreto de alumínio.

FIGURA 30 - Espectro de absorção da tintura de própolis de Teófilo Otoni - MG - Reação com cloreto de alumínio.

FIGURA 31 - Espectro de absorção da tintura de própolis de Pensilvânia - EUA - Reação com cloreto de alumínio.

5.4.2 - Amostras

TABELA 15 - Determinação de flavonóides totais, com cloreto de alumínio, expressos em crisina, a 330 nm, em tinturas de própolis a 10 %

Amostras de própolis	Absorbâncias	Resíduo seco (mg) em 1 g de amostra	Fator de diluição	Resultados g % p/p
Bauru - SP	0,126	44,7	2235	1,02 ± 0,09*
Bom Despacho - MG	0,108	49,5	2475	0,98 ± 0,06
Campos Novos - SC	0,040	48,1	2405	0,35 ± 0,04
Joanópolis - SP	0,132	49,5	2475	1,19 ± 0,09
Lagoa Vermelha - RS	0,018	40,2	2010	0,13 ± 0,01
Ribeirão Preto - SP	0,081	45,6	2280	0,67 ± 0,02
Teófilo Otoni - MG	0,034	67,4	3370	0,78 ± 0,03
Pensilvânia - EUA	0,151	52,0	2600	1,44 ± 0,10

* Desvio padrão

Os resultados foram calculados segundo a Lei de Lambert-Beer na qual,

$$C = \frac{A}{K} \text{ onde:}$$

C = concentração de flavonóides totais

A = absorbância da amostra

K = Slope $\Rightarrow$ inclinação da reta = 0,0274

Tomaremos como exemplo a amostra de Bauru.

$$C = \frac{0,1260}{0,0274} = 4,5985 \mu\text{g/mL}$$

Multiplicando-se pelo fator de diluição 2.235, valor obtido pela multiplicação da 1ª diluição (44,7) correspondente ao valor do resíduo seco, pela 2ª diluição (50), teremos 10.277,65 $\mu\text{g/mL}$; convertendo-se esse valor em g %, obteremos 1,02 g % p/p ⁷.

TABELA 16 - Comparação entre resultados de dosagens de flavonóides totais e determinação de FPS

Origem geográfica	Produtor	Origem botânica	Flavonóides totais g % p/p em tinturas a 10 %	Determinação de FPS em base cosmética com 10 % de extrato mole de própolis
Bauru – SP	Chácara da Abelhas	Barbatimão, Jurubeba, Goiabeira	1,02	4,78 (5) *
Bom Despacho - MG	Apiário Embu	Eucalipto	0,98	4,67 (5)
Campos Novos - SC	Fazenda do Alegre	Araucária, Angico, Cambarazinho	0,35	2,65 (3)
Joanópolis – SP	Sítio do Natal	Capixingui, Jacarandá, Açaita- cavalo, Embauva, Jacaré, Chimbeva	1,19	4,83 (5)
Lagoa Vermelha - RS	Sítio Mel do Sul	Arueira, Canela, Angico	0,13	1,10 (1)
Ribeirão Preto - SP	Antonio Carlos Meda	Soja, Café, Arroz, Feijão, Eucalipto	0,67	4,90 (5)
Teófilo Otoni - MG	Anderson H. Klier	Cipó-de-São João, Vassourinha, com predominância de Açá-Peixe	0,78	3,60 (4)
Pensivânia – EUA	Não revelado	Não revelado	1,44	7,88 (8)

* Os valores de FPS são arredondados em número inteiro, para uso comercial.

6 - DISCUSSÃO

6.1 - INCORPORAÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS EM BASE COSMÉTICA

6.1.1 - Concentração do extrato de própolis

A escolha do tipo de extrato e de sua concentração em nossa formulação visou o melhor aproveitamento da capacidade de absorção de raios UVB da própolis. A tintura foi concentrada até a formação do extrato mole por dois motivos:

- 1 - Para evaporar a quase totalidade de álcool etílico indesejável pela sua ação desidratante, principalmente numa formulação que se propõe a ser utilizada sob o sol.
- 2 - Para concentrar seus princípios ativos e assim aumentar sua capacidade de absorção no UVB.

Durante ensaios preliminares para determinação de FPSs *in vitro*, utilizamos esse extrato mole também a 5 % em nossa base cosmética⁶, concentração que, devido ao tipo de extrato já concentrado, esperavamos que permitisse uma boa absorção no ultra violeta B, porém, como isso não se confirmou, resultando FPSs abaixo de 4, passamos a utilizar então, a concentração de 10 % que nos foi relativamente satisfatória, elevando os FPSs (vide Tabela 14).

Essa concentração, padronizada em nossa formulação esbarra na legislação pertinente à Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Cosméticos referente à uma portaria ¹⁴ de fevereiro de 1985, que permite o uso do extrato de própolis na concentração limite máxima de 2,5 % em cosméticos ¹⁵.

Entretanto a portaria não esclarece o tipo de extrato a que se refere e os motivos de tal limitação já que, dependendo da origem botânica da própolis os seus componentes variam em quantidade e qualidade.

É interessante notar que, em paralelo, a própria legislação brasileira tem aceito a concentração limite máxima de 15 % para uma substância química pura, notoriamente alergênica como o PABA (ácido p-aminobenzóico) para uso em filtros solares ⁸⁶.

6.1.2 - Ação alergênica da própolis

Considerando nosso objetivo de utilização da própolis em base cosmética como protetor solar, embora não seja tóxica ou irritante ⁴, não podemos ignorar os diversos trabalhos publicados em revistas especializadas, que chamam a atenção para a ação alergênica de alguns de seus componentes.

Em diversos trabalhos atribue-se a ésteres do ácido cafeico ^{31, 34, 37, 40} e do ácido cinâmico ⁹², muitas vezes presentes em própolis, a causa de alergia em pessoas sensíveis. A presença ou ausência e a concentração dessas substâncias dependerá da espécie vegetal encontrada próxima à colméia. Assim, a extensão da reação alérgica poderá variar de acordo com a sensibilidade de pessoas suscetíveis e as espécies de plantas circundantes à colméia.

Alguns autores mais radicais afirmam que própolis não deveria ser utilizado em medicamentos tópicos ou cosméticos ⁵⁵.

Embora nos faltem dados para a afirmação, o grupo de pessoas sensíveis, mesmo se grande, ao que se deduz não é a maioria,

havendo estudos que afirmem ser a alergia à própolis, em grande parte, ocupacional^{68, 78}.

De toda forma, para aumentar a segurança do uso de produtos contendo própolis, deve ser tomado o cuidado pelo fabricante de advertir claramente no rótulo sobre a ação alergênica a consumidores sensíveis.

Contudo, o produto contendo própolis usado com a finalidade de proteção solar não seria o único a conter substâncias potencialmente alergênicas, já que são encontrados em literatura, diversos casos de alergia provocada por filtros solares²⁷ com marca reconhecida mundialmente⁴⁴.

6.1.3 - Observações gerais

O branco da base cosmética apresentou pH = 6,0 e as formulações apresentaram pH = 4,0 devido à presença dos extratos de própolis.

Embora baixo, este pH é considerado o limite inferior permitido para uso de cosméticos que contenham princípios ativos ácidos. A queratina, que é a camada situada logo abaixo da camada superficial da pele (manto sudoral e lipídico emulsionados), tem pH = 4,1 “O pH normal da superfície cutânea é muito próximo ou pouco maior ao da queratina (pH 5,5 e 4,1 respectivamente) que é o estado ideal de ionização protéica no referente à função protetora”⁷⁵. Por isso, o pH final de nossas formulações é considerado aceitável, não interferindo nas condições fisiológicas da pele.

As formulações apresentaram odor e coloração característicos de suas respectivas própolis, que variaram de acordo com sua origem vegetal.

O odor e a coloração das formulações, por serem fortes, não caracterizaram um cosmético e sim um medicamento. O uso de uma essência para mascarar o odor teria de ser feito em grande quantidade e isso não seria apropriado já que essências são, em potencial, fotossensibilizantes.

A coloração poderia ser clareada, diminuindo-se a concentração do extrato, o que implicaria em um prejuízo na ação desejada, de proteção solar.

Possivelmente uma associação com outro filtro solar exigirá menos concentração do extrato de própolis, mantendo uma proteção satisfatória e diminuindo condições desagradáveis em seu aspecto final.

A ausência de conservantes na formulação é devida à presença de própolis que possui ação antimicrobiana comprovada^{84, 91, 103}.

6.2 - PERFIL CROMATOGRÁFICO

Utilizamos cromatografia em camada delgada e fizemos uma comparação qualitativa entre as amostras, com a presença de alguns padrões de flavonóides e ácidos fenólicos.

Como fases móveis na cromatografia em camada delgada para pesquisa de flavonóides foram usadas tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (36:12:5)⁹⁶, mais polar e Tolueno:acetona (8:2) menos polar.

Com tolueno:acetona (8:2)⁶⁷, observamos uma boa separação de manchas nas amostras porém, os padrões quercetina e miricetina tiveram Rfs muito baixos, respectivamente 0.1 e *start* (vide Figura 10).

É bom lembrar que:

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pela substância, desde o ponto de partida (start)}}{\text{distância percorrida pelo solvente do start ao front (chegada)}}$$

O Rf, fluxo relativo é influenciado por grande número de fatores incluindo temperatura, composição do solvente, tempo de corrida, tamanho da cuba¹⁹ etc, e isto pode explicar diferenças de Rfs encontradas em diferentes trabalhos utilizando-se semelhantes condições, porém não idênticas.

Aumentamos a polaridade com o meio tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (36:12:5) e obtivemos Rfs mais visíveis em relação aos padrões anteriores como o aumento de miricetina para 0,2 e de quercetina para 0,4, embora muitos componentes de amostras com Rfs baixos não tenham mostrado nítida separação (vide Figura 11).

Para a pesquisa de ácidos fenólicos utilizamos como fases móveis tolueno:acetato de etila:ácido fórmico em duas proporções: a 36:12:5 que determinou Rfs mais altos dos padrões e boa separação de componentes das amostras (vide Figura 13) e a 40:10:5 que além de

apresentar boa separação dos componentes, mostrou a presença do ácido cafeico com R_f 0,25 em todas elas (Vide Figura 12).

Para a diluição dos padrões, utilizamos etanol, solvente presente nas tinturas de própolis, em lugar de metanol conforme preconizado na literatura^{54, 98}.

A revelação usada para flavonóides, com radiação ultravioleta a 366 nm e difenilboriloxietilamina (solução metanólica a 1 %) é clássica e apresenta manchas com fluorescência em tons amarelados. Revela também, ácidos fenólicos com manchas em tons azulados.

A presença de vapores de amônio junto à radiação UV 366 nm intensifica manchas azuis características de grande parte dos ácidos fenólicos. Os ácidos benzóico e cinâmico não se revelam dessa forma e sim com solução etanólica de cloreto férrico a 3 % em luz visível³⁹. Como este último procedimento empobreceu as características visuais da placa, decidimos não seguí-lo.

Os resultados cromatográficos mostraram grande diferença de constituição entre algumas amostras brasileiras e entre as amostras estrangeiras⁸⁴.

Houve grande semelhança entre as amostras de São Paulo (Bauru, Joanópolis, Ribeirão Preto) incluindo uma de Bom Despacho - MG. Já a amostra mineira de Teófilo Otoni, região noroeste de Minas Gerais diferiu-se das demais. O mesmo aconteceu com as amostras do sul (Campos Novos - SC e Lagoa Vermelha - RS) que se diferiram das demais regiões e também entre si.

A amostra de Lagoa Vermelha - RS, diferiu-se por apresentar manchas apagadas, comportamento sugestivo de uma baixa concentração de componentes pesquisados, o que foi confirmado, pelos resultados das dosagens de flavonóides totais e pela avaliação dos FPSs.

As amostras estrangeiras, embora sendo uma norte-americana e duas européias mostraram-se semelhantes entre si e diferentes das nacionais.

Entramos em contacto com o serviço técnico da Sigma, pedindo maiores informações sobre as origens geográficas e botânicas das amostras de lá adquiridas, mas não conseguimos os dados solicitados, com a resposta alegando desconhecimento dos mesmos.

A cromatografia em camada delgada para pesquisa de flavonóides, ainda que não conclusiva em relação aos padrões, deu-nos uma idéia comparativa da constituição das amostras.

Aparentemente o crisoeriol foi encontrado em amostra da Alsacia com Rf 0,29 (Figura 10) e a apigenina em amostra de Teófilo Otoni com Rf 0,41 (Figura 11).

Embora tenhamos dosado flavonóides totais com resultados expressos em crisina não nos foi possível identificá-la claramente em nossas amostras, o mesmo acontecendo em relação aos demais flavonóides e ácidos fenólicos, com exceção do ácido cafeico, encontrado em todas as amostras (vide Figura 12).

O fato de não termos encontrado os padrões de flavonóides e ácidos fenólicos nas amostras não significa necessariamente que estas não os contenham mas que nas condições da cromatografia, não estavam claramente visíveis.

Apesar disso, nos foi dada uma idéia de diversificação de constituintes das amostras, o que comprova a importância da origem botânica na composição da própolis.

6.3 - DETERMINAÇÃO DO FPS *in vitro*

Desde o surgimento dos primeiros filtros solares, no começo do século, já existia a preocupação em medir-se o valor da proteção solar que esses produtos proporcionavam sobre a pele. Com o avanço das pesquisas, foram desenvolvidos métodos biológicos em três países: EUA, Alemanha e Austrália, normatizados respectivamente pela FDA (Food and Drug Administration), DIN (Deutsches Institut fuer normung) e SAA (Standards Association of Australia), únicos aceitos oficialmente e utilizados até hoje pelos fabricantes de produtos que contenham filtros solares, para que estes possam ser comercializados com segurança.

O fator de proteção solar (FPS) é um valor representado por números inteiros e, portanto, muitas vezes aproximado e é definido como a energia UV necessária para produzir a dose eritematosa mínima (DEM) na pele protegida, expressa em tempo de exposição, sobre a energia UV necessária para produzir a DEM sobre a pele desprotegida, também expressa em tempo de exposição.

$$\text{Portanto, FPS} = \frac{\text{DEM da pele protegida}}{\text{DEM da pele desprotegida}}$$

Sendo que Dose é uma quantidade de energia a que o indivíduo foi exposto num processo de radiação e Dose Eritematosa Mínima é a quantidade mínima de energia radiante solar ou artificial (espectro UV) que produz um início de eritema na pele humana branca, aproximadamente 24 horas após a irradiação.

Essa DEM é determinada para cada voluntário em testes biológicos e é representada em diferentes fototipos na Tabela 17.

TABELA 17 - Fototipos de pele (M. A. Pathak, 1983) ⁷⁴

Tipo de pele	Cor da pele não exposta	DEM/UVB MJ/cm²	Histórico de Queimadura e bronzeamento
I	Branca	15-30	Sempre se queima facilmente, nunca se bronzeia
II	Branca	25-35	Sempre se queima facilmente, bronzeia-se ao mínimo
III	Branca	30-50	Queima-se moderadamente, bronzeia-se gradualmente, bronzeado leve
IV	Marrom clara	45-60	Queima-se ao mínimo, sempre bronzeia-se, bronzeado moderado
V	Marrom	60-100	Raramente se queima, bronzeia-se intensamente, bronzeado intenso
VI	Marrom chocolate, negro	100-200	Nunca se queima, pele profundamente pigmentada, negro

Os testes biológicos são feitos com lâmpadas artificiais com radiação contínua para determinação da DEM e FPS do voluntário que, sob exposição solar em diferentes índices de UVB, terá sua DEM modificada como mostra a Tabela 18.

TABELA 18 - Faixa de tempo, em minutos, para causar queimaduras (eritemas) para diferentes índices de UVB⁴⁵

Valor do Índice	Minutos para queimar, Caso mais sensível	Minutos para queimar, Caso menos sensível
Mínimo, 0-2	30	Mais do que 120
Baixo, 3	20	90
4	15	75
Moderado, 5	12	60
6	10	50
Alto, 7	8,5	40
8	7,5	35
9	7	33
Muito alto, 10	6	30
11	5,5	27
12	5	25
13	Menos que 5	23
14	4	21
15	Menos que 4	20

Numa escala de índices de UVB, o 15 corresponde ao mais intenso, ou seja, o nível correspondente ao meio dia no pico do verão.

Existem algumas pequenas diferenças nas metodologias exercidas pelos três países citados e devido a isso, na tentativa de unificar resultados foi criada a COLIPA (Countries Trade Association), por membros dos países da Comunidade Económica Europeia, que regulamenta a indústria de filtros solares ⁸³.

Basicamente, os métodos biológicos utilizam seres humanos em número aproximado a 20 voluntários de ambos os sexos, de pele clara tipo I a III sob previa autorização (vide Tabela 17).

Estas pessoas devem gozar de boa saúde, não apresentar manchas, cicatrizes, bronzamento ou reações alérgicas no local do teste, nem estar tomando medicamentos fotossensibilizantes.

Os testes devem ser realizados preferencialmente por um dermatologista. A região corporal utilizada para o teste é a dorsal, abrangendo uma área de 30 a 900 cm² dividida em sítios individuais de 0,4 a 1,0 cm², separados por faixas opacas ao UV com 1 cm de largura. A quantidade de produto a ser aplicada é de aproximadamente 2 mg/cm², embora segundo alguns estudos, costuma-se espalhar produtos dermatológicos em quantidade aproximada a 1 mg/cm² ⁷⁴.

Os sítios individuais são divididos em faixas que se dispõem paralelamente e contém o produto a ser testado, padrões de FPS conhecidos e uma área controle não irradiada, como mostra a Figura 32.

Superfície de Teste com uma Preparação Padrão e Duas Preparações-Teste

(DIN 67 501, 1984)

FIGURA 32 - Esquema de teste para determinação de FPS em seres humanos.

A irradiação é feita em geral com fonte de luz artificial, na faixa de 290 a 320 nm - FDA e 290 a 400 nm - SAA e o aumento relativo no tempo de exposição à irradiação é de 25 a 40 % (FDA, SAA e DIN respectivamente).

Em geral, a DEM de voluntários para determinação de FPSs de produtos com filtros solares é determinada 1 dia antes do teste, tempo necessário para a verificação de início de um eritema.

Mesmo sendo a metodologia *in vivo* a única aceitável pelos órgãos normativos, seus resultados podem na prática sofrer algumas alterações de acordo com fatores como:

- a quantidade do produto a ser espalhada pela pele.
- a uniformidade do espalhamento sobre as áreas expostas
- a viscosidade do produto que, se baixa, poderá escorrer oferecendo como proteção uma camada mais fina.
- a presença de suor que, se em grande quantidade, poderá diluir o produto
- o índice de UVB que pode variar com as horas do dia, a estação do ano, a latitude, a altitude.
- fatores individuais de sensibilidade de pele já que os testes são feitos com voluntários de fototipos I a III e o FPS do produto testado é calculado pela média aritmética ponderal dos valores individuais.

Percebemos, assim, que a metodologia *in vivo* apesar de ser oficialmente aceita e utilizada para a determinação de FPSs não oferece um fator de proteção solar totalmente seguro e para a sua realização é necessário ter-se uma idéia do FPS do produto testado, para se reduzirem os riscos de queimadura durante o teste.

A metodologia *in vitro*, por análise espectrofotométrica, é bastante útil, pois, fornece uma avaliação prévia do produto em teste através do valor de proteção encontrado.

Os testes *in vitro*, baseados em análises espectrofotométricas envolvem medidas de transmissão ótica na região ultravioleta mas não medem fatores de integração do filtro com a pele do indivíduo ⁶³.

Alguns métodos espectrofotométricos que tentam minorar esta falha, testam o produto espalhado sobre um substrato semelhante à pele humana que pode ser a epiderme de camundongo e mede a luz transmitida e espalhada com um espectrofotômetro equipado com esfera de refletância difusa. Seus resultados de FPS comparados aos obtidos *in vivo* são considerados satisfatórios ².

Ainda para a determinação de FPSs existem vários outros testes ⁶⁵, inclusive com cobaias.

Pelas dificuldades práticas encontradas para o procedimento de outras metodologias, preferimos utilizar o método espectrofotométrico de fácil execução e viável em qualquer laboratório.

Embora não tenhamos utilizado a metodologia *in vivo* em paralelo para uma comparação de resultados, podemos afirmar que são muito próximos, a nos basear em trabalhos comparativos ⁵⁷ previamente realizados e em nosso resultado do padrão homossalato a 8 % com FPS = 4,35, que nessa mesma concentração, adotado como padrão de referência pela FDA para utilização na metodologia *in vivo* apresenta em média o FPS = 4,24.

Em nosso trabalho, obedecendo-se a uma única metodologia de obtenção de tintura e extrato de própolis e de incorporação da mesma concentração deste extrato na base dermatológica observou-se variação entre os resultados de FPSs obtidos nas amostras analisadas desde FPS = 1 a FPS = 8, possivelmente devido às diferentes origens botânicas.

A própolis, sendo uma substância rica em compostos fenólicos, pode apresentar hidroquinona em sua composição. É conhecida a ação fotossensibilizante da hidroquinona, podendo causar pigmentação à pele se exposta ao sol, porém, é comum o atendimento, em farmácias de manipulação, de receitas médicas com formulações que associam a hidroquinona (que é um despigmentante de uso noturno) a um filtro solar,

para que possa ser usada também durante o dia. Não sabemos até que ponto este procedimento é seguro, mas supomos que a presença de hidroquinona em própolis não alcance as altas concentrações encontradas nas referidas formulações médicas, pois, não há dados sobre dosagens específicas de hidroquinona em literatura referente à própolis.

De qualquer modo, este possível efeito colateral terá que ser melhor estudado para utilização da própolis como protetor solar.

Os resultados de FPS (1 a 8) e teor de flavonóides (0,35 a 1,44%) mostraram grande variação e correlação entre si, que em sua maioria foram diretamente proporcionais. A diferença de resultados pode ser atribuída às diferentes origens das amostras de própolis.

Devido aos resultados relativamente baixos de FPSs (inferiores a 8) os produtos contendo apenas própolis somente poderão ser usados como protetores solares de baixa proteção ⁴¹. Pessoas com maiores problemas com relação ao sol não deverão utilizá-los com essa finalidade.

6.4 - DOSAGEM DE FLAVONÓIDES TOTAIS

O método utilizado foi baseado na reação que ocorre entre flavonóides e cloreto de alumínio ⁵⁴, já que o alumínio forma quelatos estáveis com flavonóides em metanol, mudando e intensificando sua absorção em análise espectrofotométrica ⁹⁷, vide a reação na Figura 33.

FIGURA 33 - Reação de flavonóides com AlCl_3 em metanol.

FIGURA 34 - Crisina e espectro de absorção.⁵⁴

O método baseou-se em trabalho de Arvouet-Grand *et al* ⁷, sofrendo duas modificações. Na falta de galangina, flavonóide padrão usado na curva de calibração do referido trabalho, utilizamos crisina.

Observamos que as nossas amostras, seguindo a metodologia citada com AlCl_3 , exibiam em seus espectro de absorção entre 200 e 600 nm, picos de absorção em torno de 330 nm e analisando flavonóides disponíveis, constatamos que a crisina possui em reação metanólica com cloreto de alumínio, um pico de absorção em 330 nm (Banda I) de acordo com a figura 34, além de ter sido identificada em amostras de própolis em diversos trabalhos ^{10, 34, 59, 69, 99}. Decidimos então, usá-la como padrão. As dosagens feitas a 330 nm tiveram a útil peculiaridade de quantificar flavonóides que absorvam *in natura* na faixa do UVB, pois o pico neste comprimento de onda resulta de efeito batocrômico causado pela reação com cloreto de alumínio ⁹⁷. Foi substituído então, o comprimento de onda de 415 nm utilizado para a dosagem de flavonóides ⁷, para 330 nm.

Em nossas dosagens de flavonóides totais, houve variação entre os resultados, como mostra a Tabela 19.

TABELA 19 - Comparação de resultados de flavonóides totais entre amostras de própolis analisadas (tintura a 10%)

	Origem	Concentração de flavonóides totais (g % p/p)
Maiores concentrações	Pensilvânia-EUA	1,44
	Joanópolis (SP)	1,19
	Bauru (SP)	1,02
	Bom Despacho (MG)	0,98
Concentrações médias	Teófilo Otoni (MG)	0,78
	Ribeirão Preto (SP)	0,67
Menores concentrações	Campos Novos (SC)	0,35
	Lagoa Vermelha (RS)	0,13

As menores concentrações foram encontradas em amostras da região sul, Lagoa Vermelha (RS) e Campos Novos (SC). Em ordem crescente seguiram Ribeirão Preto (SP) e Teófilo Otoni (MG) e ainda com concentrações maiores e próximas entre si, encontramos Bom Despacho (MG), Bauru (SP) e Joanópolis (SP).

A amostra da Pensilvânia, EUA, apresentou a maior concentração de flavonóides totais, confirmando afirmações de trabalhos anteriores, nas quais as amostras brasileiras, de clima tropical, possuem concentrações de flavonóides inferiores^{9, 79} às amostras oriundas de clima temperado, como América do Norte e Europa.

A própolis é um material biológico de composição química bastante rica e diversificada, nem sempre possuindo em seus resultados analíticos, um comportamento tão reprodutivo como acontece com substâncias puras.

A concentração de flavonóides na própolis está ligada a diversos fatores, dentre eles fatores naturais como clima, origem vegetal, raça ou sub-raça da abelha que pode lhe direcionar uma preferência de espécie vegetal³⁴ de onde será retirada a resina, a parte da planta de onde a abelha irá coletá-la relacionada a época do ano que irá oferecer ou não flores e folhas para o seu trabalho de coleta.

Em relação ao apicultor, a técnica utilizada para a obtenção e coleta da própolis poderá interferir em sua qualidade final.

A própolis obtida da raspagem das caixas e retirada das telas tem baixo valor comercial⁹³, pois não saem tão limpas e livres de oxidação e são pulverizadas ao serem recolhidas. A própolis de melhor qualidade apresenta-se em pedaços inteiros, sem corpos estranhos como madeira, tinta etc.

Além dos fatores citados que podem interferir nas concentrações naturais de flavonóides em própolis, existem outros como diferentes métodos de extração de própolis bruta e de dosagens de flavonóides que podem interferir nos resultados. Também dentro de uma mesma metodologia como a dosagem feita por espectrofotometria com

cloreto de alumínio, fatores como o comprimento de onda e o flavonoide utilizado como padrão numa curva de calibração, também podem alterar os resultados.

O comportamento espectral em UV/visível de flavonóides é determinado pela sua estrutura química sendo que favonas e flavonóis, em presença de metanol, apresentam dois picos principais de absorção entre 240 e 400 nm que são chamados de banda I entre 300 e 380 nm e banda II entre 240 e 280 nm ⁵⁴.

A banda I num flavonol tem sempre seu comprimento de onda aumentado de 20 a 30 nm em relação a banda I na equivalente flavona ⁶¹, efeito batocrômico causado pela oxigenação, porém, ambos possuem uma forte banda I no espectro de UV/visível.

Já flavanonas, dihidroflavonois e dihidrochalconas exibem um pico máximo forte entre 270 e 295 nm, banda II e um pequeno pico ou inflexão entre 300 e 360 nm, banda I ³³.

A reação entre flavonóides e cloreto de alumínio em metanol, com formação de quelatos, causa efeito batocrômico e intensifica a absorção de flavonóides, facilitando a análise ⁹⁷.

Atribui-se a banda I ao anel B do sistema cinamoila e a banda II ao anel A do sistema benzoíla da estrutura flavonoídica, como mostra a Figura 35.

FIGURA 35 - Estrutura flavonoídica e bandas de absorção em espectrofotometria.

Para flavanonas ou dihidroflavonois a saturação entre C2 e C3 do sistema cinamoila diminui a capacidade de absorção do cromóforo, produzindo pequenos picos ou inflexões na banda I.

A dosagem clássica de flavonóides através de reação com cloreto de alumínio em metanol processa-se a 425 nm, com variação para 420 nm^{79, 97} e 415 nm^{7, 67}. Porém, flavanonas e dihidroflavonois não criam complexos estáveis com cloreto de alumínio como flavonas e flavonois e as absorbâncias máximas desses complexos em própolis se dão entre 310 e 320 nm⁶⁷.

Levando-se em consideração o efeito batocrômico causado pela reação do flavonóide com cloreto de alumínio, estaremos, possivelmente dosando aqueles que absorvam naturalmente na região do UVB (290-320 nm), interesse maior do nosso trabalho, além de que, os valores encontrados de flavonóides totais, foram em sua maioria, diretamente proporcionais aos respectivos valores obtidos nas dosagens de FPS³⁹, como mostrou a Tabela 16.

É difícil afirmar que uma metodologia espectrofotométrica possa dosar flavonóides totais em um único comprimento de onda, devido ao comportamento característico de absorção no UV/VIS de cada classe de flavonóide.

Os resultados são, portanto, relativos e não podemos ainda negar a possibilidade de que, no comprimento de onda escolhido para dosarmos flavonóides em nossas amostras - 330 nm, haja absorção por outros compostos fenólicos com radicais ortofenólicos.

Porém, este fato não invalida nossa tentativa de quantificação de substâncias que absorvam no ultra-violeta para melhor embasarmos os resultados de FPS das amostras de própolis analisadas.

7 - CONCLUSÕES

- 1 - A concentração de flavonóides em própolis é variável e dependente de diversos fatores como clima, procedência vegetal, época do ano, técnica de coleta de própolis pelo produtor.
- 2 - Dentro de nossa metodologia, algumas amostras de própolis apresentaram o teor de flavonóides semelhante aos encontrados em amostras européias, enquanto outras se mostraram com quantidades bem inferiores.
- 3 - O fator de proteção solar (FPS) de um produto contendo como único princípio ativo o extrato de própolis, pode variar de acordo com sua composição química.
- 4 - Dependendo de sua origem, a própolis não poderá ser utilizada como princípio ativo para protetores solares já que, encontramos FPS igual a 1 em uma de nossas amostras, ou seja, com absorção quase nula em relação à radiação UVB.
- 5 - O uso de protetor solar que contenha apenas o extrato de própolis como princípio ativo, deve ser utilizado para pessoas que necessitem de baixa proteção, pois o maior FPS obtido em nossos resultados foi 8.

- 6 - O FPS, na maioria dos casos, foi diretamente proporcional ao teor de flavonóides, confirmando a ação de absorção de raios ultra-violeta que possuem estes compostos.
- 7 - Todas as amostras de própolis estudadas, através do perfil cromatográfico, apresentaram ácido cafeico ou derivados, podendo ser alergênicas a pessoas suscetíveis.
- 8 - A base cosmética escolhida apresentou boa estabilidade para incorporação do extrato de própolis utilizado.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGRA, M. F., SILVA, M. G. Plantas medicinais usadas como cosméticos na Paraíba (Brasil) e na literatura. *Rev. Bras. Farm.*, Rio de Janeiro, v. 74, p. 42-4, 1993.
2. ALVES, L. M., AEGERTER, M. A., HATA, K. Determinação *in vitro* do fator de proteção solar (FPS) de modeladores solares. *Aerosol Cosmét.*, v.10, n. 58, p. 2-9, 1988.
3. AMOROS, M., LURTON, E., BOUSTIE, J., GIRRE, L. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v. 57, p. 644-7, 1994.
4. ARVOUET-GRAND, A., LEJEUNE, B., BASTIDE, P., POURRAT, A., PRIVAT, A.M., LEGRET, P. Extrait de propolis: I. Etude de la toxicité aiguë et détermination de l'indice d'irritation primaire cutanée. *J. Pharm. Belg.*, Brussels, v. 48, n. 3, p. 165-70, 1993.
5. ARVOUET-GRAND, A., LEJEUNE, B., BASTIDE, P., PRIVAT, A. M., LEGRET, P. Extrait de propolis: II. Etude de la cicatrisation de plaies chez le lapin et chez le rat. *J. Pharm. Belg.*, Brussels, v. 48, n. 3, p. 171-8, 1993.
6. ARVOUET-GRAND, A., VENNAT, B., LEJEUNE, B., POURRAT, A. Formulation of propolis extract emulsions. I. OW Creams based on non-ionic surfactants and various consistency agents. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, New York, v. 21, 1907-15, 1995.

7. ARVOUET-GRAND, A., VENNAT, B., POURRAT, A., LEGRET, P. Standardisation d'un extrait de propolis et edentification des principaux constituants. *J. Pharm. Belg.*, Brussels, v. 49, n. 6, p. 462-8, 1994.
8. AZZELLINI, S. C. Agentes potencializantes de fotoprotetores. *Cosmet. Toiletries*, São Paulo, v. 7, jul/ago, p. 34-7, 1995.
9. BANKOVA, V., CHRISTOV, R., KUJUMGIEV, A., MARCUCCI, M. C., POPOV, S. Chemical composition and antibacterial activity of brazilian propolis. *Z. Naturforsch. (c)*, Wiesbaden, v. 50, p. 167-72, 1995.
10. BANKOVA, V. S., POPOV, S. S., MAREKOV, N. L. A study on flavonoids of propolis. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v. 46, n. 4, p. 471-4, 1983.
11. BOBIN, M. F., RAYMOND, M., MARTINI, M. C. Propriedades de Absorção UVA/UVB de Produtos Naturais. *Cosmet. Toiletries*, São Paulo, v. 7, mar/abr, p. 44-50, 1995.
12. BOHM, B. A. Chalcones and aurones. In: DEY, P. M., HARBORNE, J. B., eds. *Methods in plant biochemistry*. London: Academic Press, 1989. p. 237-8.
13. BOYD, A. S., NAYLOR, M., CAMERON, G. S., PEARSE, A. D., GASKELL, S. A., NELDNER, K. H. The effects of chronic sunscreen use on the histologic changes of dermatoheliosis. *J. Am. Acad. Dermatol.*, St. Louis, v. 33, n. 6, p. 941-6, 1995.
14. BRASIL. Leis, Decretos, etc. Portaria n. 5, de 25 de fevereiro de 1985, da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Cosméticos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 4 mar 1985. Seção 1, p. 3536.

15. BRASIL. Leis, Decretos, etc.. Decreto n. 79094, 5 jan. 1977. In: OLIVEIRA FILHO, J. C. de S. *Legislação federal do setor saúde*. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde/Consultoria Jurídica, 1977. p. 958-9, 969-70.
16. BREYER, E. U. *Abelhas e saúde*. 4. ed. Porto União: Uniporto, 1984. 78 p. [Coleção Vale do Iguaçu, n. 40].
17. BULLER, D. B., CALLISTER, M. A., REICHERT, T. Skin cancer prevention by parents of young children: health information sources, skin cancer knowledge, and sun-protection practices. *Oncol. Nurs. Forum*, Pittsburgh, v. 22, p. 1559-66, 1995.
18. CLAIR, G. Sur un produit de la ruche: la propolis et son intérêt actuel. *Parf. Cosmét. Arômes*, Paris, v. 26, p. 99-105, 1979.
19. CLARKE, E. G. C. *Isolation and identification of drugs*, London: The Pharmaceutical Press, 1974. v. 1, p. 32.
20. COSTA, I. S., D'ALMEIDA, V., LICHTIG, J., JUNQUEIRA, V. B. C. Propriedades antioxidantes do extrato alcoólico da própolis. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL. 14., Florianópolis, 1996. *Programa e Resumos*. Florianópolis, EDEME, 1996. p. 154 [resumo M-024].
21. CRIPPS, D. J., HEGEDUS, S. Protection factor of sunscreens to monochromatic radiation. *Arch. Dermatol.*, Chicago, v. 109, p. 202-4, 1974.
22. DANBY, F. W. Cumulative effects of UVA in human skin. *J. Am. Acad. Dermatol.*, St. Louis, v. 33, p. 691, 1995.

23. DOBROWOLSKI, J. W., VOHORA, S. B., SHARMA, K., SHAH, S. A., NAQVI, S. A. H., DANDIYA, P. C. Antibacterial, antifungal, antiamoebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne, v. 35, p. 77-82, 1991.
24. EPSTEIN, J. H. Biological Effect of Sunlight. In: LOWE, N. J., SHAATH, N. A., eds. *Sunscreens*. development, evaluation, and regulatory aspects. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 43-5.
25. FARMACOPEIA dos Estados Unidos do Brasil, 2. ed. São Paulo: Siqueira, 1959. p. 447.
26. FOLEY, P., NIXON, R., MARKS, R., FROWEN, K., THOMPSON, S. The frequency of reactions to sunscreens: results of a longitudinal population - based study on the regular use of sunscreens in Australia. *Br. J. Dermatol.*, Oxford, v. 128, p. 512-8, 1993.
27. FOTIADES, J., SOTER, N. A., LIM, H. W. Results of evaluation of 203 patients for photosensitivity in a 7.3-year period. *J. Am. Acad. Dermatol.*, St. Louis, v. 33, p. 597-602, 1995.
28. FREITAS, P. C., MARTINS, J. L., CORAZZA, S. Aplicação de extratos vegetais como protetores solares. *Aerosol Cosmét.*, São Paulo, n. 80, p. 26-31, 1992.
29. GARCIA, S., SANTOS, E. P., LIMA, M. T., RAMOS, M. F. Avaliação do fator de proteção solar por método "in vitro". *Rev. Bras. Farm.*, Rio de Janeiro, v. 72, n. 2, p. 39-41, 1991.
30. GARCIA, S., SANTOS, E. P., SILVA, A. J., GIACOMO, C. G., SOARES, H. C. Aplicação do extrato vegetal de alecrim em preparações antisolares. *Rev. O.F.I.L.*, Madrid, v. 2, n. 5, p. 309-11, 1992.

31. GINANNESCHI, M., ACCIAI, M. C., SERTOLI, A., BRACCI, S. Propolis allergy: synthesis and patch testing of δ , δ - dimethylallyl caffeic acid ester and its o-methyl derivatives. *Contact Dermatitis*, Copenhagen, v. 21, p. 267-9, 1989.
32. GORDON, V. C., KELLY, C. P., ACEVEDO, J. Previsão de fotoirritação e determinação do FPS por método *in vitro*. *Cosmet. Toiletries*, São Paulo, v. 3, mai/jun, p. 35-9, 1991.
33. GRAYER, R. J. Flavanoids. In: DEY, P. M., HARBORNE, J. B., eds. *Methods in plant biochemistry*. London: Academic Press, 1989. p. 288-303.
34. GREENAWAY, W., SCAYSBROOK, T., WHATLEY, F. R. The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. *Bee World*, Benson, v. 71, p. 107-118, 1990.
35. GROVES, G. A. The selection and evaluation of ultraviolet absorbers. *Aust. J. Dermatol.*, Sydney, v. 14, p. 21-34, 1973.
36. GRUNBERGER, D., BANERJEE, R., EISINGER, K., OLTZ, E. M., EFROS, L., CALDWELL, M., ESTEVEZ, V., NAKANISHI, K. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia*, Basel, v. 44, p. 230-2, 1988.
37. HANSSON, C., EZZELARAB, M., STERNER, O. Oxidative activation of the propolis hapten isoprenyl caffeate. *Acta Dermato-Venereol.*, Stockholm, v. 75, n. 1, p. 34-6, 1995.
38. HARBORNE, J. B. General procedures and measurement of total phenolics. In: DEY, P. M., HARBORNE, J. B., eds. *Methods in plant biochemistry*. London: Academic Press, 1989. p. 7-9.

39. HARBORNE, J. B. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. 2. ed., London: Chapman and Hall, 1991, p. 37-76.
40. HAUSEN, B. M., WOLLENWEBER, E. Propolis allergy (III). Sensitization studies with minor constituents. *Contact Dermatitis*, Copenhagen, v. 19, p. 296-303, 1988.
41. HAWK, J. L., CHALLONER, A. V., CHADDOCK, L. The efficacy of sunscreens agents: protection factors and transmission spectra. *Clin. Exp. Dermatol.*, Oxford, v. 7, p. 21-31, 1982.
42. IIO, M., MORIYAMA, A., MATSUMOTO, Y., TAKAKI, N., FUKUMOTO, M. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Agric. Biol. Chem.*, Tokyo, v. 49, p. 2173-6, 1985.
43. IOIRISH, N. *Las abejas, farmacéuticas aladas*. Moscow: Mir, 1985. p. 124.
44. KIMURA, K., KATOH, T. Photoallergic contact dermatitis from the sunscreen ethylhexyl-p-methoxycinnamate. *Contact Dermatitis*, Copenhagen, v. 32, n. 5, p. 304-5, 1995.
45. KIRCHHOFF, V. W. J. H. *Ozônio e radiação UVB*, São José dos Campos: Transtec, 1995. 66 p.
46. KLIGMAN, L. H., KLIGMAN, A. M. Ultraviolet Radiation - Induced Skin Aging. In: LOWE, N. J., SHAATH, N. A., eds. *Sunscreens: development, evaluation, and regulatory aspects*. New York: Marcel Dekker, 1990, p. 61-6.

47. KROL, W., CZUBA, Z., SCHELLER, S., GABRYS, J., GRABIEC, S., SHANI, J. Anti-oxidant property of ethanolic extract of propolis (EEP) as evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of luminol. *Biochem. Int.*, North Ryde, v. 21, n. 4, p. 593-7, 1990.
48. KROL, W., SCHELLER, S., SHANI, J., PIETSZ, G., CZUBA, Z. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Arzneim. Forsch.*, Aulendorf, v. 43, n. 1, p. 607-9, 1993.
49. KUJUMGIEV, A., BANKOVA, V., IGNATOVA, A., POPOV, S. Antibacterial activity of propolis, some of its components and their analogs. *Pharmazie*, Berlin, v. 48, p. 785-6, 1993.
50. LEJEUNE, B., POURRAT, A. DEHMOUCHE, H. Propolis utilisation en dermocosmétologie. *Parf. Cosmét. Arômes*, Paris, v. 82, p. 73-7, 1988.
51. LEJEUNE, B., VENNAT, B., REGERAT, F., GARDELLE, D., FOUCHER, D., POURRAT, A. Propolis - extraits et utilisations dans des shampooings et lotions. *Parf. Cosmét. Arômes*, Paris, v. 56, p. 65-8, 1984.
52. LEVY, S. B. How high the SPF ?. *Arch. Dermatol.*, Chicago, v. 131, p. 1463-4, 1995.
53. LOWE, N. J. The need for photoprotection. In: LOWE, N. J., SHAATH, N. A., eds. *Sunscreens: development, evaluation, and regulatory aspects*. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 37-9.
54. MABRY, T. J., MARKHAN, K. R., THOMAS, M. B. The systematic identification of flavonoids. Berlin: Springer Verlag, 1970, p. 41-52.

55. MACHÁCKOVÁ, J. The incidence of allergy to propolis in 605 consecutive patients patch tested in Prague. *Contact Dermatitis*, Copenhagen, v. 18, p. 210-2, 1988.
56. MAES, D., MARENUS, K., SMITH, W. P. Novos avanços na fotoproteção. *Cosmet. Toiletries*, São Paulo, v. 4, set/out., p. 40-4, 1992.
57. MANSUR, J. S., BREDER, M. N., MANSUR, M. C., AZULAY, R. D. Correlação entre a determinação do fator de proteção solar em seres humanos e por espectrofotometria. *An. Bras. Dermatol.*, Rio de Janeiro, v. 61, n. 4, p.167-72, 1986.
58. MANSUR, J. S., BREDER, M. N., MANSUR, M. C., AZULAY, R. D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An. Bras. Dermatol.*, Rio de Janeiro , v. 61, n. 3, p. 121-4, 1986.
59. MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, Paris, v. 26, p. 83-99, 1995.
60. MARCUCCI, M. C., CAMARGO, F. A., LOPES, C. M. A. Identification of amino acids in brazilian propolis. *Z. Naturforsch.* (c), Wiesbaden, v. 51C, p. 11-4, 1996.
61. MARKHAM, K. R. Flavones, flavonols and their glycosides. In: DEY, P. M., HARBORNE, J. B., eds. *Methods in plant biochemistry*. London: Academic Press, 1989, p. 200.
62. MARKS, R. Summer in Australia: skin cancer and the great SPF debate. *Arch. Dermatol.*, Chicago. v. 131, p. 462-4, 1995.

63. MEADOWS, T. The effect of various sunscreen combinations on a product's SPF values. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 41, p. 141-6, 1990.
64. MERCK index. 12. ed. Whitehouse Station, 1996. p. 1347.
65. MEYBECK, A. Objective methods for the evaluation of sunscreens. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 98, n. 3, p. 51-60, 1983.
66. MORALLE, J., LANZANNE, E. Que peuvent nous apporter les extraits végétaux: l'ail, la propolis. *Parf. Cosmét. Arômes*, Paris, n. 95, oct-nov, p. 80-6, 1990.
67. NAGY, M., GRANCAI, D. Colorimetric determination of flavanones in propolis. *Pharmazie*, Berlin, v. 51, p. 100-1, 1996.
68. NAKAMURA, T. Sensitivity to propolis in Japan. *Contact Dermatitis*, Copenhagen, v. 18, n. 5, p. 313, 1988.
69. NIKOLOVSKA-COLESKA, Z., KLISAROVA, L. J., SUTURKOVA, L. J., DOREVSKI, K. First and second derivative spectrophotometric determination of flavonoids chrysin and quercetin. *Anal. Lett.*, New York, v. 29, p. 97-115, 1996.
70. PAMPLONA, B. Própolis: composição e atividades terapêuticas. *Rev. Racine*, São Paulo, v. 12, n. 37, p. 49-53, 1997.
71. PATHAK, M. A. Intrinsic photo protection in human skin. In: LOWE, N. J., SHAAT, N. A., eds. *Sunscreens: development, evaluation and regulatory aspects*. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 73-6.

72. PEPELJNJAK, S., JALSENJAK, I., MAYSINGER, D. Flavonoid content in propolis extracts and growth inhibition of *Bacillus subtilis*. *Pharmazie*, Berlin, v. 40, p. 122-3, 1985.
73. PETRES, J. E. Utilização dos produtos das abelhas: nova concepção na cosmetologia moderna. *Aerosol Cosmet.*, São Paulo, n. 38, p. 12-5, 1985.
74. PITTET, G. H. FPS: Comparação entre os métodos de determinação in vivo humano. *Cosmet. Toiletries*, São Paulo, v. 2, jan/fev, p. 41-51, 1990.
75. QUIROGA, M. I., GUILLOT, C. F. *Cosmética dermatológica prática*. Buenos Aires: Atheneo, 1986. p. 5-27.
76. RAMOS, M. F. S., SANTOS, E. P., ORTIZ, G. M. D. Estudo do potencial anti-solar dos extratos de própolis, *Hamamelis virginiana* e *Aloe vera*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL. 14., Florianópolis, 1996. *Programa e Resumos*. Florianópolis, EDEME, 1996. p. 163 [resumo m. 056].
77. RAO, C. V., DESAI, D., KAUL, B., AMIN, S., REDDY, B. S. Effect of caffeic acid esters on carcinogen-induced mutagenicity and human color adenocarcinoma cell growth. *Chem. Biol. Interact.*, Shannon, v. 84, p. 277-290, 1992.
78. RATÓN, J. A., AGUIRRE, A., DÍAZ-PÉREZ, J. L. Contact dermatitis from propolis. *Contact Dermatitis*, Copenhagen, v. 22, p. 183-4, 1990.
79. RIO, R. G. W. *Métodos de controle químico de amostras de própolis*. São Paulo, 1996. 74 p. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP].

80. ROCHA FILHO, P. A. Tratamento dos cabelos. *Cosmet. Toiletries*, São Paulo, v. 8, mar/abr, p. 24-7, 1996.
81. SANTOS, E. P., RAMOS, M. F., BIZARRI, C. H. Avaliação da utilização do extrato de própolis em preparações antisolares. *Rev. O.F.I.L.*, Madrid, v. 2, n. 3, p. 160-4, 1992.
82. SEYMOR FANE. Skin Care. Sun Protection *Nurs. Times*, New York, v. 91, n. 25, p. 61-3, 1995.
83. SHAAT, N. A. Evolution of modern sunscreen chemicals. In: LOWE, N. J., SHAAT, N. A., eds. *Sunscreens: development, evaluation and regulatory aspects*. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 3-4.
84. SIGMA CHEMICAL COMPANY. *Biochemicals organic compounds and diagnostic reagents*. 1996. p. 884. [Catálogo].
85. SIMÚTH, J., TRNOVSKÝ, J. JELOKOVÁ, J. Inhibition of bacterial DNA-dependent RNA polymerases and restriction endonuclease by UV-absorbing components of propolis. *Pharmazie*, Berlin, v. 41, p. 131-21, 1986.
86. STEINBERG, D. C. Sunscreens - Part I *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 110, p. 29-30, 1995.
87. STERN, R. S. Sunscreen. Use and nonmelanona skin cancer. In: LOWE, N. J., SHAAT, N. A. eds. *Sunscreens: development, evaluation and regulatory aspects*. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 85-9.

88. SU, Z.-Z., LIN, J., GRUNBERGER, D., FISHER, P. B. Growth suppression and toxicity induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in type 5 adenovirus-transformed rat embryo cells correlate directly with transformation progression. *Cancer Res.*, Philadelphia, v. 54, p. 1865-70, 1994.
89. SUD'INA, G. F., MIRZOEVA, O. K., PUSHKAREVA, M. A., KORSHUNOVA, G. A., SUMBATYAN, N. V., VARFOLOMEEV, S. D. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett.*, Amsterdam, v. 329, n. 1,2, p. 21-4, 1993.
90. SUMERE, C. F. V. Phenols and phenolic acids. In: DEY, P. M. HARBORNE, J. B., eds. *Methods in plant biochemistry*. London: Academic Press, 1989, p. 30-8.
91. SZEWEZAK, E. H. GODOY, G. F., CHOCIAI, J. G. Estudo comparativo entre a sensibilidade de staphylococcus aureus à própolis e antibióticos. *Aerosol Cosmét.*, São Paulo, n. 36, p 12-3, 1984.
92. TAKAISI-KIKUNI, N. B., SCHILCHER, H. Eletron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med.*, Stuttgart, v. 60, p. 222-7, 1994.
93. TOLEDO, L. R. *Extrato saudável: apicultura. Globo Rural*, Rio de Janeiro, v. 11, n. 140, p. 33-38, 1997.
94. VANHAELEN, M., VANHAELEN-FASTRÉ, R. Propolis. – I. Origine, micrographie, composition chimique et activité thérapeutique. *J. Pharm. Belg.*, Brussels, v. 34, n. 5, p. 253-9, 1979.

95. VANHAELEN, M., VANHAELEN-FASTRÉ, R. Propolis. – II. Identification par chromatographies haute-performance (liquide, gaz-liquide et sur couches minces) des constituants. Bioautographie des chromatogrammes des composés antibactériens. *J. Pharm. Belg.*, Brussels, v. 34, n. 6, p. 317-28, 1979.
96. VENNAT, B., ARVOUET-GRAND, A., GROSS, D., POURRAT, A. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids and identification of phenolic acids from a propolis extract. *J. Pharm. Belg.*, Brussels, v. 50, n. 5, p. 438-44, 1995.
97. VENNAT, B., GROSS, D., POURRAT, A. POURRAT, H. Hamamelis virginiana: identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extracts. *Pharm. Acta Helv.*, Zurich, v. 67, n. 1, p. 11-4, 1992.
98. WAGNER, H., BLADT, S. Plant drug analysis. a thin layer chromatography atlas. 2. ed. Berlin: Springer-Verlag, Flavonoids, 1996, p. 195-7, 362.
99. WALKER, P., CRANE, E. Constituents of propolis. *Apidologie*, Paris, v. 18, p. 327-34, 1987.
100. WHITEMORE, S. E., MORISON, W. L. Prevention of UVB - Induced immunosuppression in humans by a high sun protection factor sunscreen. *Arch. Dermatol.*, Chicago, v. 131, n. 10, p. 1128-33, 1995.
101. WINSTON, M. L. *The biology of the honey bee*. Harvard, University Press, New York, 1987, p. 1-12.

102. WITTERN, K.-P., ANSMANN, A., HÜTTINGER, R., BILLEK, D., CHARLET, E., HOENEN, L., KUCZERA, K., MOTITSCHKE, L., QUACK, J., SEIB, K., UMBACH, I., WOLFF, G. Stability testing of cosmetic emulsions. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park , v. 100, n. 10, p. 33-9, 1985.
103. WOISKY, R. G., GIESBRECHT, A. M., SALATINO, A. Atividade antibacteriana de uma formulação preparada a partir de própolis de *Apis mellifera* L.. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo*, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 19-21, 1994.

RESUMO

A realização deste trabalho objetivou a avaliação quantitativa da absorção da radiação UVB (290-320 nm) em oito amostras de própolis, incorporadas em base cosmética apropriada, sob a forma de extrato mole, originárias de diversas regiões com diferentes origens botânicas sendo duas de Minas Gerais, três de São Paulo, uma de Santa Catarina, uma do Rio Grande do Sul e outra da Pensilvânia - EUA.

A estimativa de absorção foi feita através de método espectrofotométrico com medidas de absorbâncias na faixa entre 290 a 320 nm, tomadas de 5 em 5 nm.

Cada medida de absorbância foi relacionada à intensidade e ao efeito eritemogênico da radiação em seu respectivo comprimento de onda.

Os resultados tiveram como parâmetro o padrão de referência salicilato de homomentila, aprovado pela FDA para determinação de FPS *in vivo*.

Foi obtido um perfil cromatográfico através de cromatografia em camada delgada para avaliação qualitativa de nossas amostras em relação a alguns flavonóides e ácidos aromáticos, o que nos permitiu constatar a presença de ácido cafeico em todas as amostras analisadas. Foram dosados flavonóides totais por método colorimétrico com cloreto de alumínio, expressos em crisina a 330 nm.

Foi feita a comparação entre os resultados de FPS e flavonóides totais e observamos proporcionalidade direta entre a maioria das amostras, o que confirma a ação de absorção de radiação ultra-violeta por flavonóides colhidos pelas abelhas em plantas.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate quantitatively the UVB absorption (290-320 nm) of propolis, contained in eight cosmetic samples as soft extract, from different botanical origins and several regions, such as Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul and Pennsylvania (USA).

A spectrophotometric method using absorbance measurements in a range of 290-320 nm, taken at 5 nm intervals, was used to assess the absorbance.

Each absorbance measurement was related to both intensity and erythral effect of the radiation at its respective wavelength.

Homosalate, which is approved by the FDA as reference standard, was used for the determination of SPF *in vivo*.

Chromatograms of the samples were obtained by thin-layer chromatography to evaluate the presence of some flavonoids and aromatic acids in the samples. This technique allowed the detection of caffeic acid in all the analyzed samples. The total flavonoids content was assayed by the colorimetric method using aluminum chloride, and the results were expressed in chrysin at 330 nm.

A comparison between the SPF results and the total flavonoids content was done and a direct relationship between most of the samples was observed, confirming the absorbing ultraviolet radiation property of the flavonoids collected by bees.