

BIBLIOTECA  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Universidade de São Paulo

NÃO LILACS

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Curso de Pós Graduação em Fármaco e Medicamentos  
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**TECNOLOGIA FARMACÊUTICA APLICADA A PRODUTOS NATURAIS**  
**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE**  
**FORMULAÇÕES PARA USO EXTERNO CONTENDO**  
**EXTRATO DE PRÓPOLIS**

**LUIZA HELENA ARAÚJO DO CARMO**

Dissertação para obtenção do grau de  
**MESTRE**

Orientador:  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ida Caramico-Soares

São Paulo

1999  
15985

DEDALUS - Acervo - CQ



30100002246

**Ficha Catalográfica**

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

C287t Carmo, Luiza Helena Araújo do  
Tecnologia farmacêutica aplicada a produtos naturais –  
desenvolvimento e avaliação de formulações para uso externo  
contendo extrato de própolis / Luiza Helena Araújo do Carmo.  
-- São Paulo, 1999.  
152p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.  
Orientador: Caramico Soares, Ida

1. Tecnologia farmacêutica 2. Produtos naturais : Cosméticos :  
Tecnologia 3. Própolis : Produtos naturais : Farmacognosia I. T.  
II. Caramico Soares, Ida, orientador.

615.4 CDD

**LUIZA HELENA ARAÚJO DO CARMO**

**TECNOLOGIA FARMACÊUTICA APLICADA A PRODUTOS NATURAIS  
DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE  
FORMULAÇÕES PARA USO EXTERNO CONTENDO  
EXTRA TO DE PRÓPOLIS**

**Comissão Examinadora**

*PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. IDA CARAMICO-SOARES*

1: Examinador

*PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. VERA LÚCIA ISSAC RANGEL*

2: Examinador

*PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MARIA AMÉLIA BARATA DA SILVEIRA*

3: Examinador

**São Paulo, 09 de agosto de 1999**

*Quem quer ver a Divindade  
Não a verá,  
Porque ela é invisível.*

*Quem quer ouvir a  
Divindade  
Não a ouvirá,  
Porque ela é inaudível.*

*Quem quer tanger a  
Divindade  
Não a tangerá,  
Porque ela não tem forma.*

*Nenhum caminho parcial  
Conduz à meta total.  
Só na visão do todo se  
encontra a Divindade.  
E então a superfície parece  
tenebrosa escuridão,  
Enquanto a profundidade  
parece luminosa superfície*

*Lao-Tsé*

---

## Dedicatória

*Aos meus avós Neuza Valeriana Ribeiro  
Araújo e Eugênio Araújo*

*Aos meus pais Isídia Helena Araújo do Carmo  
e José Luiz do Carmo (in memoriam)*

*Aos meus irmãos Ana Eugênia Araújo do  
Carmo e Rômulo Araújo Vieira dos Santos*

*A Carlos Eduardo Cordeiro*

## **Agradecimento especial**

*À Profa. Dra. Ida Caramico Soares, pela  
orientação e amizade.*

---

## **Agradecimentos**

*A Deus por tornar tudo possível*

*À Breyer pela doação das amostras de própolis*

*À Ana Luíza Perreira Morí e Beatriz Pamplona, pelo fornecimento de referências e experiência no trabalho com a própolis*

*Aos amigos: Cláudio Moreira Lima, Edgar Muniz Jr., Flávia Dabbur, Maria Aparecida Nicoletti, Márcia Archondo e Pety Maída Noriega, pelas sugestões, apoio e agradável convivência no laboratório de farmacotécnica industrial*

*Ao Prof. Dr. Pedro Rocha Filho, do Laboratório de Tecnologia de Cosméticos da FCFRP- USP, pelo uso do equipamento para realização das fotomicrografias das formulações*

*Aos professores Érica Rosa Maria Kedor-Hackmanns, Jorge Luís Serafin e Maria Inês Santoro, pela permissão de utilização dos equipamentos do Laboratório de Controle Físico-químico da FCF-USP*

*Ao amigo Moacyr Dias Theodoro , do Laboratório de Controle Físico-químico da FCF-USP, pelo apoio e ajuda nas dosagens espectrofotométricas*

*Aos professores Dominique Corrinne, Maria Amélia Barata da Silveira, Maria Valéria Robles Velasco e Pedro Rocha Filho pelas sugestões e correções feitas por ocasião do exame de qualificação*

*A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Taqueda, do Departamento de Engenharia Química - Escola Politécnica/ USP pelo tratamento estatístico dos dados*

*À Elizabeth C. Souza Paiva e Lucilene F. Girrardi secretárias da pós-graduação do Departamento de Farmácia pela constante atenção dada a todos os pós-graduandos*

*À Adriana de Almeida Barreiros, bibliotecária do Conjunto das Químicas, pela revisão das referências bibliográficas*

*À CAPES pelo apoio financeiro*

*A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho*

## ÍNDICE

<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
<hr/>	
<b>2. Revisão da Literatura</b>	<b>3</b>
<hr/>	
2.1. Própolis .....	4
2.2. Flavonóides .....	19
- 2.2.1. Flavonóides presentes na própolis .....	22
2.2.1.1. Flavonas e flavonóis .....	22
2.2.1.2. Flavononas .....	24
2.2.1.3. Chalconas e diidrochalconas .....	25
2.2.2. Métodos analíticos.....	26
- 2.3. Formas Farmacêuticas para uso externo.....	27
- 2.3.1. Emulsões .....	28
- 2.3.2. Géis.....	35
<b>3. Objetivos</b>	<b>37</b>
<hr/>	
<b>4. Materiais e métodos</b>	<b>39</b>
<hr/>	
- 4.1. Materiais .....	40
- 4.1.1. Equipamentos e instrumentos .....	40
- 4.1.2. Matérias-primas e reagentes.....	41
- 4.1.2.1. Própolis .....	41
4.1.2.2. Padrões .....	42
- 4.1.2.3. Constituintes das formulações .....	44
4.1.2.4. Formulações estudadas .....	45
4.1.2.5. Solventes e reagentes.....	46

---

4.1.2.6. Outros .....	46
4.2. Métodos .....	47
4.2.1. Caracterização das amostras de própolis bruta .....	47
4.2.1.1. Caracterização física.....	47
4.2.1.2. Análise fitoquímica .....	47
4.2.1.3. Determinação do teor de cinzas.....	50
— 4.2.2. Preparação dos extratos.....	51
4.2.2.1. Caracterização dos extratos glicólicos.....	53
— 4.2.3. Doseamento espectrofotométrico dos flavonóides .....	55
— 4.2.3.1. Padronização e validação do método.....	55
4.2.3.2. Curva de calibração da quercetina .....	55
4.2.3.3. Análise das amostras .....	56
— 4.2.4. Preparação das formulações .....	57
— 4.2.4.1. Preparação das emulsões .....	57
— 4.2.4.2. Preparação dos géis .....	57
— 4.2.4.3. Estudo preliminar de estabilidade .....	58
4.2.5. Extração dos princípios ativos para análise.....	59
4.2.5.1. Extração dos flavonóides a partir das tinturas .....	59
4.2.5.1.1. Extração por coluna.....	59
4.2.5.1.2. Extração por partição em solvente .....	60
4.2.5.2. Extração dos flavonóides a partir das emulsões .....	60
4.2.5.2.1. Extração por coluna .....	60
4.2.5.2.2. Extração por partição em solvente .....	61
4.2.5.3. Extração dos flavonóides a partir dos géis .....	61
4.2.5.3.1. Extração por coluna .....	61
4.2.5.3.2. Extração por partição em solvente .....	62
4.2.5.4. Teste de recuperação da quercetina .....	62
4.2.5.5. Controle do processo extrativo .....	63
— 4.2.6. Estabilidade .....	66
4.2.6.1. Estabelecimento de protocolos para estudo de estabilidade .....	66
— 4.2.6.1.1. Tipo de embalagem .....	66

— 4.2.6.1.2. Temperaturas de armazenamento .....	66
4.2.6.1.3. Tempo de duração de estudo .....	66
4.2.6.1.4. Frequência da amostragem .....	67
4.2.6.2. Padronização dos testes de estabilidade física .....	67
— 4.2.6.2.1. Análise organoléptica .....	67
— 4.2.6.2.2. pH .....	67
4.2.6.2.3. Centrifugação .....	67
4.2.6.2.4. Comportamento reológico e viscosidade .....	68
4.2.6.2.5. Observação microscópica .....	68
— 4.2.6.3. Testes para avaliação da estabilidade química .....	69
— 4.2.6.3.1. Doseamento de princípios ativos .....	69
4.2.7. Cálculo da velocidade de decaimento do teor de flavonóides totais das formulações .....	69
4.2.8. Perfil de liberação “in vitro” dos princípios ativos .....	69
— 4.2.9. Análise estatística .....	70

## **5. Resultados** 71

---

5.1. Caracterização das amostras de própolis bruta .....	72
5.1.1. Análise organoléptica .....	72
5.1.2. Análise fitoquímica .....	73
5.1.3. Teor de cinzas .....	74
5.2. Caracterização dos extratos glicólicos de própolis .....	75
5.3. Doseamento espectrofotométrico dos flavonóides .....	77
5.3.1. Padronização e validação do método .....	77
5.3.2. Curva de calibração da quercetina .....	80
5.3.3. Análise das amostras de própolis .....	81
5.4. Estudo preliminar de estabilidade .....	83
5.5. Avaliação de metodologia extrativa .....	84
5.5.1. Teores percentuais dos processos extrativos .....	84
5.5.2. Interferência dos componentes das formulações (sem princípios ativos) submetidas ao	

doseamento espectrofotométrico .....	85
5.6. Avaliação da estabilidade das formulações .....	86
5.6.1. Análise macroscópica e organoléptica .....	86
5.6.2. Avaliação da separação de fases da formulação .....	92
5.6.3. Avaliação do comportamento reológico .....	94
5.6.4. Viscosidade .....	103
5.6.5. Análise microscópica das emulsões.....	107
5.6.6. Variação de pH .....	111
5.6.7. Avaliação da estabilidade química dos princípios ativos das formulações .....	116
5.7. Cálculo da constante de decaimento .....	120
5.8. Perfil de liberação “in vitro” dos princípios ativos .....	124
<b>6. Discussão</b>	<b>125</b>
<hr/>	
<b>7. Conclusões</b>	<b>137</b>
<hr/>	
<b>8. Resumo</b>	<b>139</b>
<hr/>	
<b>9. Summary</b>	<b>141</b>
<hr/>	
<b>10. Referências bibliográficas</b>	<b>143</b>
<hr/>	

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – Esquema de diferenciação dos componentes da colméia .....	5
<b>FIGURA 2</b> – Glândulas presentes nas abelhas operárias .....	6
<b>FIGURA 3</b> – Coleta de resina pela abelha para fabricação de própolis.....	8
<b>FIGURA 4</b> – Esquema de coleta de resinas e utilização da própolis pela abelha.....	9
<b>FIGURA 5</b> – Estrutura básica dos flavonóides.....	19
<b>FIGURA 6</b> – Exemplos de classes de flavonóides.....	20
<b>FIGURA 7</b> – Estrutura química básica de flavonas e flavonóis.....	23
<b>FIGURA 8</b> – Estrutura química básica das flavononas.....	24
<b>FIGURA 9</b> – Estrutura química básica da chalcona.....	25
<b>FIGURA 10</b> – Estrutura química básica da diidrochalcona.....	25
<b>FIGURA 11</b> – Representação esquemática da instabilidade das emulsões.....	31
<b>FIGURA 12</b> – Estrutura química da apigenina.....	42
<b>FIGURA 13</b> – Estrutura química do canferol.....	43
<b>FIGURA 14</b> – Estrutura química da quercetina.....	44
<b>FIGURA 15</b> – Esquema de obtenção do extrato glicólico de própolis.....	52
<b>FIGURA 16</b> – Esquema da extração por coluna das formulações.....	64
<b>FIGURA 17</b> – Esquema da extração por partição das formulações.....	65
<b>FIGURA 18</b> – Determinação do $\lambda$ de máxima absorbância, para leitura do complexo da quercetina após reação com o cloreto de alumínio.....	77
<b>FIGURA 19</b> – Espectro de absorção da solução de metanol e cloreto de alumínio ( $ALCL_3$ ), em diferentes comprimentos de onda.....	78
<b>FIGURA 20</b> – Estabilidade da reação da quercetina padrão com cloreto de alumínio, determinada a 415nm, em função do tempo.....	79
<b>FIGURA 21</b> – Reta de calibração do padrão de quercetina em solução metanólica, obtida pela reação colorimétrica com o cloreto de alumínio, a 415 nm.....	80

<b>FIGURA 22</b> – Espectro de absorção dos extratos glicólicos de própolis, após reação com cloreto de alumínio em solução metanólica a 0,8% .....	82
<b>FIGURA 23</b> – Espectro de absorção dos brancos das formulações, quando submetidas à extração por solvente e reação com $AlCl_3$ .....	85
<b>FIGURA 24</b> – Comportamento reológico das emulsões 48h após o preparo ( $t_0$ ), onde E5% - emulsão a 5%; E10% - emulsão a 10%; E15% - emulsão a 15%.....	95
<b>FIGURA 25</b> – Avaliação do comportamento reológico da emulsão a 5%, após permanência por 90 dias em diversas temperaturas .(-4, 22, 35, 45°C) .....	96
<b>FIGURA 26</b> – Avaliação do comportamento reológico da emulsão a 10%, após permanência por 90 dias em diversas temperaturas .(-4, 22, 35, 45°C).....	97
<b>FIGURA 27</b> – Avaliação do comportamento reológico da emulsão a 15%, após permanência por 90 dias em diversas temperaturas .(-4, 22, 35, 45°C).....	98
<b>FIGURA 28</b> – Comportamento reológico dos géis 48h após o preparo ( $t_0$ ), onde G5% - gel a 5%; G10% - gel a 10%; G15% - gel a 15% .....	99
<b>FIGURA 29</b> – Avaliação do comportamento reológico do gel a 5%, após permanência por 90 dias em diversas temperaturas .(-4, 22, 35, 45°C).....	100
<b>FIGURA 30</b> – Avaliação do comportamento reológico do gel a 10%, após permanência por 90 dias em diversas temperaturas .(-4, 22, 35, 45°C).....	101
<b>FIGURA 31</b> – Avaliação do comportamento reológico da gel a 15%, após permanência por 90 dias em diversas temperaturas .(-4, 22, 35, 45°C).....	102
<b>FIGURA 32</b> – Variação da viscosidade aparente da emulsão a 5%, em função do tempo de permanência nas diferentes temperaturas .....	103
<b>FIGURA 33</b> – Variação da viscosidade aparente da emulsão a 10%, em função do tempo de permanência nas diferentes temperaturas .....	104

<b>FIGURA 34</b> – Variação da viscosidade aparente da emulsão a 15%, em função do tempo de permanência nas diferentes temperaturas .....	104
<b>FIGURA 35</b> – Variação da viscosidade aparente do gel a 5%, em função do tempo de permanência nas diferentes temperaturas .....	105
<b>FIGURA 36</b> – Variação da viscosidade aparente do gel a 10%, em função do tempo de permanência nas diferentes temperaturas .....	105
<b>FIGURA 37</b> – Variação da viscosidade aparente do gel a 15%, em função do tempo de permanência nas diferentes temperaturas .....	106
<b>FIGURA 38</b> – Estrutura microscópica da emulsão com 5% do extrato de própolis, 48h após preparação (aumento 200 vezes) .....	107
<b>FIGURA 39</b> – Estrutura microscópica da emulsão com 10% do extrato de própolis, 48h após preparação (aumento 200 vezes) .....	108
<b>FIGURA 40</b> – Estrutura microscópica da emulsão com 15% do extrato de própolis, 48h após preparação (aumento 200 vezes) .....	108
<b>FIGURA 41</b> – Estruturas de cristais líquidos formados na emulsão contendo 5% de extrato de própolis, 48h após a preparação, observados microscopicamente, com aumento de 200 vezes .....	109
<b>FIGURA 42</b> – Estruturas de cristais líquidos formados na emulsão contendo 10% de extrato de própolis, 48h após a preparação, observados microscopicamente, com aumento de 200 vezes .....	110
<b>FIGURA 43</b> – Estruturas de cristais líquidos formados na emulsão contendo 15% de extrato de própolis, 48h após a preparação, observados microscopicamente, com aumento de 200 vezes .....	110
<b>FIGURA 44</b> – Representação gráfica dos valores de concentração dos flavonóides totais provenientes do extrato de própolis, incorporado à emulsão na concentração de 5%, em função do tempo e diferentes temperaturas.....	116
<b>FIGURA 45</b> – Representação gráfica dos valores de concentração dos flavonóides totais provenientes do extrato de própolis, incorporado à emulsão na concentração de 10%, em função do tempo e diferentes temperaturas.....	117

---

<b>FIGURA 46</b> – Representação gráfica dos valores de concentração dos flavonóides totais provenientes do extrato de própolis, incorporado à emulsão na concentração de 15%, em função do tempo e diferentes temperaturas.....	117
<b>FIGURA 47</b> – Representação gráfica dos valores de concentração dos flavonóides totais provenientes do extrato de própolis, incorporado ao gel na concentração de 5%, em função do tempo e diferentes temperaturas.....	118
<b>FIGURA 48</b> – Representação gráfica dos valores de concentração dos flavonóides totais provenientes do extrato de própolis, incorporado ao gel na concentração de 10%, em função do tempo e diferentes temperaturas.....	118
<b>FIGURA 49</b> – Representação gráfica dos valores de concentração dos flavonóides totais provenientes do extrato de própolis, incorporado ao gel na concentração de 15%, em função do tempo e diferentes temperaturas.....	119
<b>FIGURA 50</b> – Representação gráfica da constante de decaimento do teor de flavonóides totais nas emulsões com 5, 10 e 15% de extrato de própolis em diversas temperaturas .....	123
<b>FIGURA 51</b> – Representação gráfica da constante de decaimento do teor de flavonóides totais nos géis com 5, 10 e 15% de extrato de própolis em diversas temperaturas .....	123
<b>FIGURA 52</b> – Perfil de liberação dos flavonóides a partir e formulações contendo 10% de extrato glicólico de própolis .....	124
<b>FIGURA 53</b> – Exemplo de reação entre flavonóides e cloreto de alumínio, com formação de complexos coloridos .....	129

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – Compostos isolados na própolis.....	15
<b>TABELA 2</b> – Características a serem analisadas para avaliar a qualidade da própolis .....	18
<b>TABELA 3</b> – Identificação das amostras de própolis estudadas .....	41
<b>TABELA 4</b> – Composição das formulações estudadas .....	45
<b>TABELA 5</b> – Avaliação organoléptica e macroscópica das amostras de própolis .....	72
<b>TABELA 6</b> – Grupos químicos identificados pela triagem fitoquímica, nas amostras de própolis de diferentes procedências .....	73
<b>TABELA 7</b> – Teor de cinzas totais das amostras de própolis bruta analisadas.....	74
<b>TABELA 8</b> – Caracterização dos extratos glicólicos de própolis, obtidos a partir de amostras de própolis (I à VII) de diferentes procedências.....	75
<b>TABELA 9</b> – Flavonóides detectados po cromatografia em camda delgada nos extratos glicólicos e respectivos valores de Rf .....	76
<b>TABELA 10</b> – Teor percentual de flavonóides totais, após reação com cloreto de alumínio, expresso em quercetina, a 415 nm, nos extratos glicólicos a 20% .....	81
<b>TABELA 11</b> – Características das formulações no tempo inicial (48h após a produção) e t <sub>1</sub> (30 dias após a preparação), nos estudos preliminares de estabilidade .....	83
<b>TABELA 12</b> – Percentual de recuperação nas técnicas extrativas utilizadas .....	84
<b>TABELA 13</b> – Análise sensorial das formulações no t <sub>0</sub> , 48h após preparação.....	87
<b>TABELA 14</b> – Análise sensorial das formulações quando submetidas à temperatura de -4°C, após períodos de tempo (t) variados .....	88

---

<b>TABELA 15</b> – Análise sensorial das formulações quando submetidas à temperatura de 22°C, após períodos de tempo (t) variados.....	89
<b>TABELA 16</b> – Análise sensorial das formulações quando submetidas à temperatura de 35°C, após períodos de tempo (t) variados.....	90
<b>TABELA 17</b> – Análise sensorial das formulações quando submetidas à temperatura de 45°C, após períodos de tempo (t) variados.....	91
<b>TABELA 18</b> – Observação da separação de fases das formulações quando submetidas à centrifugação (3000 rpm por 30 minutos), após exposição por diferentes intervalos de tempo e às diversas temperaturas .....	93
<b>TABELA 19</b> – Caracterização de pH das formulações no tempo inicial (t <sub>0</sub> ) e após permanência à temperatura -4°C, por diferentes períodos de tempo.....	112
<b>TABELA 20</b> – Caracterização de pH das formulações no tempo inicial (t <sub>0</sub> ) e após permanência à temperatura 22°C, por diferentes períodos de tempo.....	113
<b>TABELA 21</b> – Caracterização de pH das formulações no tempo inicial (t <sub>0</sub> ) e após permanência à temperatura 35°C, por diferentes períodos de tempo.....	114
<b>TABELA 22</b> – Caracterização de pH das formulações no tempo inicial (t <sub>0</sub> ) e após permanência à temperatura 45°C, por diferentes períodos de tempo.....	115
<b>TABELA 23</b> – Equações lineares, relacionando a concentração de flavonóides totais, com a exposição às varias temperaturas nas emulsões com diferentes concentrações de extrato de própolis .....	121
<b>TABELA 24</b> – Equações lineares, relacionando a concentração de flavonóides totais, com a exposição às varias temperaturas nos géis com diferentes concentrações de extrato de própolis.....	122

---

## **1. INTRODUÇÃO**

Produtos de origem natural vêm sendo utilizados pelo homem há vários séculos. Inicialmente eram tidos como único recurso terapêutico para todos os males, tinham seu uso difundido em todas as populações, contribuindo para promoção e recuperação da saúde das populações ao redor do mundo. Com a revolução industrial e surgimento da indústria farmacêutica, aos poucos esses foram sendo substituídos, pois a utilização de produtos sintéticos e semi-sintéticos tomou grande impulso pela facilidade de produção e eficiência de seu uso, além do rápido retorno financeiro que podem proporcionar.

Nas últimas décadas, notou-se retorno gradual ao interesse pelo uso de produtos naturais. As agressões e efeitos colaterais decorrentes do seu emprego são bem menores se comparados àqueles dos produtos sintéticos, criando-se até o equivocado jargão "*Se é natural não faz mal*". Atualmente, pesquisas com o objetivo de identificar, caracterizar e relacionar efeitos farmacológicos e tóxicos dos constituintes dos produtos de origem natural têm sido realizadas, uma vez que o profundo conhecimento da composição e variabilidades que esses podem apresentar, constituem passos fundamentais para o aproveitamento racional destes produtos.

Entretanto, as pesquisas com o intuito de investigar a melhor forma de veiculação dos produtos naturais são ainda insuficientes. O desenvolvimento de formulações farmacêuticas, adequadas ao efeito desejado no local e intensidade pretendida, constitui avanço na pesquisa sobre utilização de produtos naturais. O conhecimento de características como interação com excipientes, manutenção de estabilidade e capacidade de liberação de princípios ativos pode ampliar as potencialidades e eficácia de uso destes produtos no campo farmacêutico.

A própolis é um apíderivado que tem sido utilizado com diversas finalidades. Suas propriedades antiinflamatória, bactericida e cicatrizante são conhecidas e formulações de uso externo contendo própolis têm ampla aplicabilidade na terapêutica e cosmética.

Nossos estudos foram realizados com a finalidade caracterizar amostras de própolis de estados da região sul e sudeste do Brasil, incorporá-las em preparações para uso tópico, estudar o comportamento físico-químico das formulações elaboradas e avaliar a estabilidade química e liberação dos princípios ativos presentes na própolis, a partir de formulações apresentadas tais como, emulsões e géis.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

## 2.1. Própolis

Como própolis pode-se denominar genericamente o material resinoso coletado, modificado e utilizado pelas abelhas na colméia. Etimologicamente a palavra própolis é de origem grega, *pro* - defesa, *polis* - cidade, ou seja, substância usada em defesa da cidade (colméia) (BURDOCK, 1998; MARCUCCI, 1996). A própolis possui composição complexa, constituída por material gomoso e balsâmico (coletado de brotos e exsudados de árvores), adicionado de secreções salivares das abelhas e cera. Quando nos referimos à abelha, estamos tratando da *Apis mellifera* que é a espécie mais amplamente distribuída e que adaptou-se à grande parte da superfície terrestre (FREE, 1980).

**Organização da Colméia.** A colméia pode ser vista como uma pequena cidade que possui organização social definida em que seus habitantes possuem tarefas e atribuições específicas, e não são vistos como seres isolados. É composta por uma rainha, várias centenas de machos ou zangões e pelas obreiras ou operárias. A rainha tem função reprodutiva, chega a pôr 2000 ovos por dia e é fecundada pelo macho; estes alimentam-se de mel preparado pelas operárias, que estão em maior número na colméia e são responsáveis pela produção de mel, geléia real e própolis, defendem a colméia contra invasões, mantêm a limpeza e fabricam os favos (DONADIEU, 1980; WINTSON, 1987). A origem destes três componentes se define quando da postura dos ovos pela rainha, os quais podem ser fecundados ou não. No primeiro caso, dão origem às rainhas e operárias, as quais irão diferenciar-se pela intensidade e qualidade da alimentação, e no segundo caso, dão origem aos zangões ou machos (Figura 1).

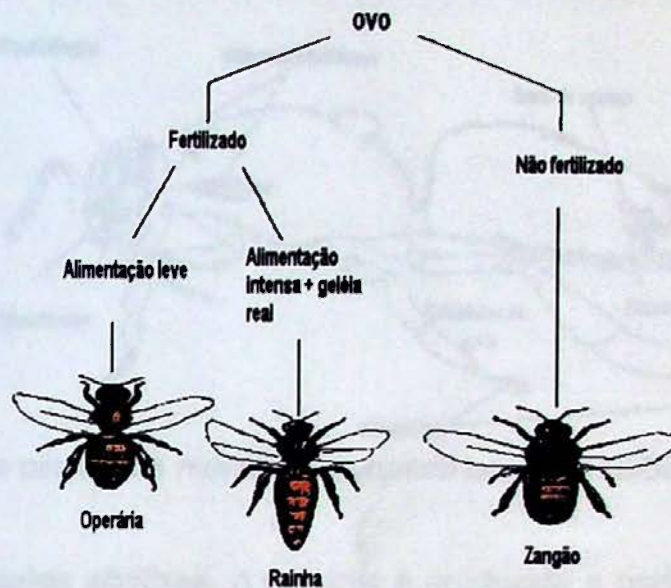


Figura 1 - Esquema de diferenciação dos componentes da colméia (WINTSON, 1987)

Anatomicamente as operárias possuem glândulas com atividades específicas como produção de substâncias de alarme (mandibular), secreções de cera para a construção de favos (glândulas de cera), secreção de substâncias que atraem outras operárias para a realização de atividades específicas (glândula de Nasanov), fornecimento de alimento para a cria, modificação do material recolhido dos vegetais pela adição de secreções próprias para a fabricação de própolis (glândulas hipofaríngeas, salivares e mandibulares) (FREE, 1980; WINTSON, 1987) (Figura 2).

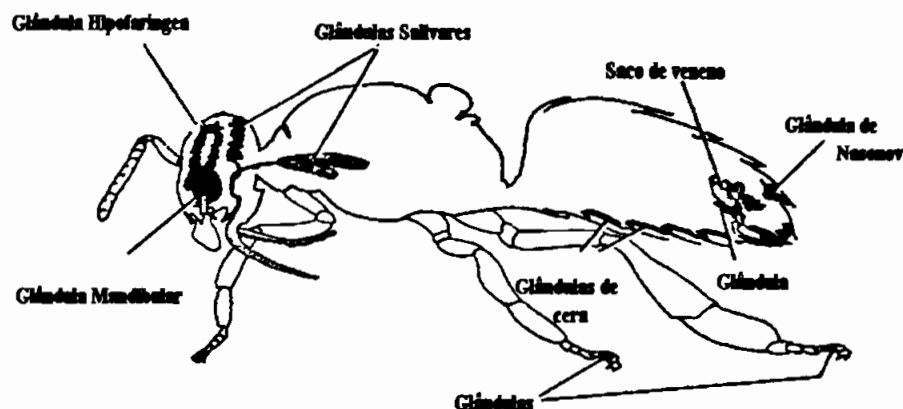


Figura 2 - Glândulas presentes nas abelhas operárias (WINTSON,1987).

**Produção pelas abelhas.** A própolis é produzida a partir da coleta de material resinoso, gomoso ou balsâmico de botões de flores, sépalas e pétalas, folhas, caules e cascas de árvores. Primeiramente as operárias utilizam suas mandíbulas para cortar o material resinoso que é transferido as patas traseiras pelas patas medianas, para compactar e armazenar em espaços denominados corbículas (Figura 3). Esse material é levado para a colméia onde é retirado desses compartimentos por outra operária que retira a resina coletada com a ajuda de suas mandíbulas e a utiliza imediatamente, acrescentando secreções e enzimas (GHISALBERTI, 1979; GONZÁLEZ & ORZAES, 1997). O resumo esquemático da coleta da própolis pode ser visualizado na figura 4.

Podem-se identificar três fontes principais dos componentes da própolis: exsudados de plantas coletados pelas abelhas, substâncias secretadas do metabolismo das abelhas e materiais que são introduzidos durante a elaboração da mesma (MARCUCCI, 1995).

As espécies vegetais utilizadas como fonte de matéria-prima para a produção de própolis já foram identificadas por autores que isolaram, no apiderivado, os mesmos compostos presentes em espécies vegetais visitadas pelas abelhas (BURDOCK, 1998; GARCIA-VIGUERA &

GREENAWAY et al., 1992; TOMÁS-BARBERAN & GARCIA-VIGUERA et al., 1993).

No clima temperado do hemisfério norte espécies, vegetais como *Populus*, *Betula*, *Alnus*, *Pinus*, *Prunus*, *Salix*, *Ulmus*, *Quercus*, e *Aesculus hippocastanum* L. são reconhecidas como as principais fontes de substâncias cerosas e resinosas (VANHAELEN, 1979; MARKMAM & MITCHEL et al., 1996).

Como principais fatores que desencadeiam o estímulo para a coleta dessas substâncias podem ser citados os sazonais, climáticos e geográficos. DONADIEU (1980) observou que a coleta é mais intensa no início das estações, principalmente no inverno, quando a colméia prepara-se para enfrentar temperaturas mais baixas. Entre os fatores geográficos destaca-se principalmente a altitude, pois colméias localizadas em regiões de maiores altitudes produzem maior quantidade de própolis. As abelhas dedicam-se ao recolhimento dessas substâncias em dias mais quentes, com temperatura superior a 20°C, geralmente entre as 10:00 e 15:30h, o que facilita a coleta das substâncias resinosas, que em baixas temperaturas seriam muito duras.

---

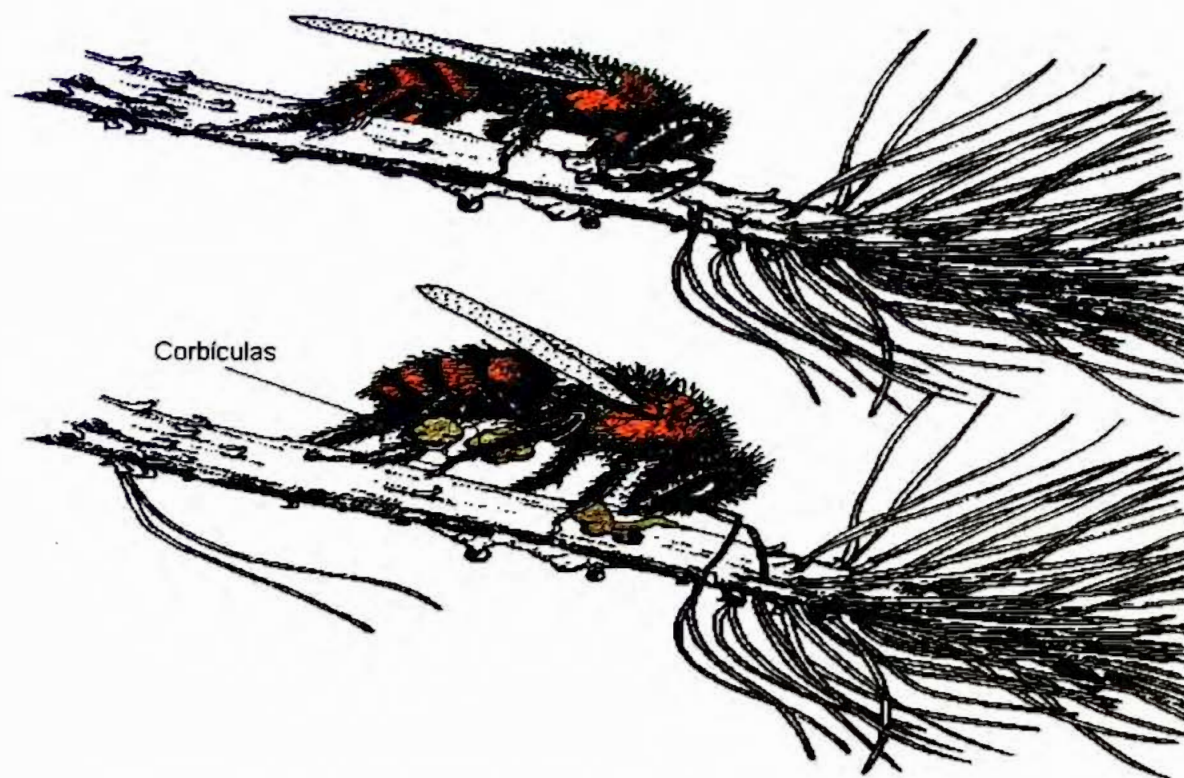


Figura 3 - Coleta de resina pela abelha para fabricação de própolis (WINTSON, 1987).

As abelhas utilizam o produto final com diversas finalidades, como vedar a entrada da colméia, tapar ranhuras e fissuras, permitindo o isolamento térmico da mesma, recuperar os favos em mau estado (servindo como espécie de cimento), recobrir com fina película os novos favos, realizando desinfecção prévia, evitar a decomposição de insetos mortos e que não podem ser retirados de dentro da colméia, através do seu recobrimento com a própolis, agir como biocida contra bactérias, fungos e larvas invasivas (DONADIEU, 1980; MARCUCCI, 1995; VANHAELEN, 1979; WINTSON, 1987).

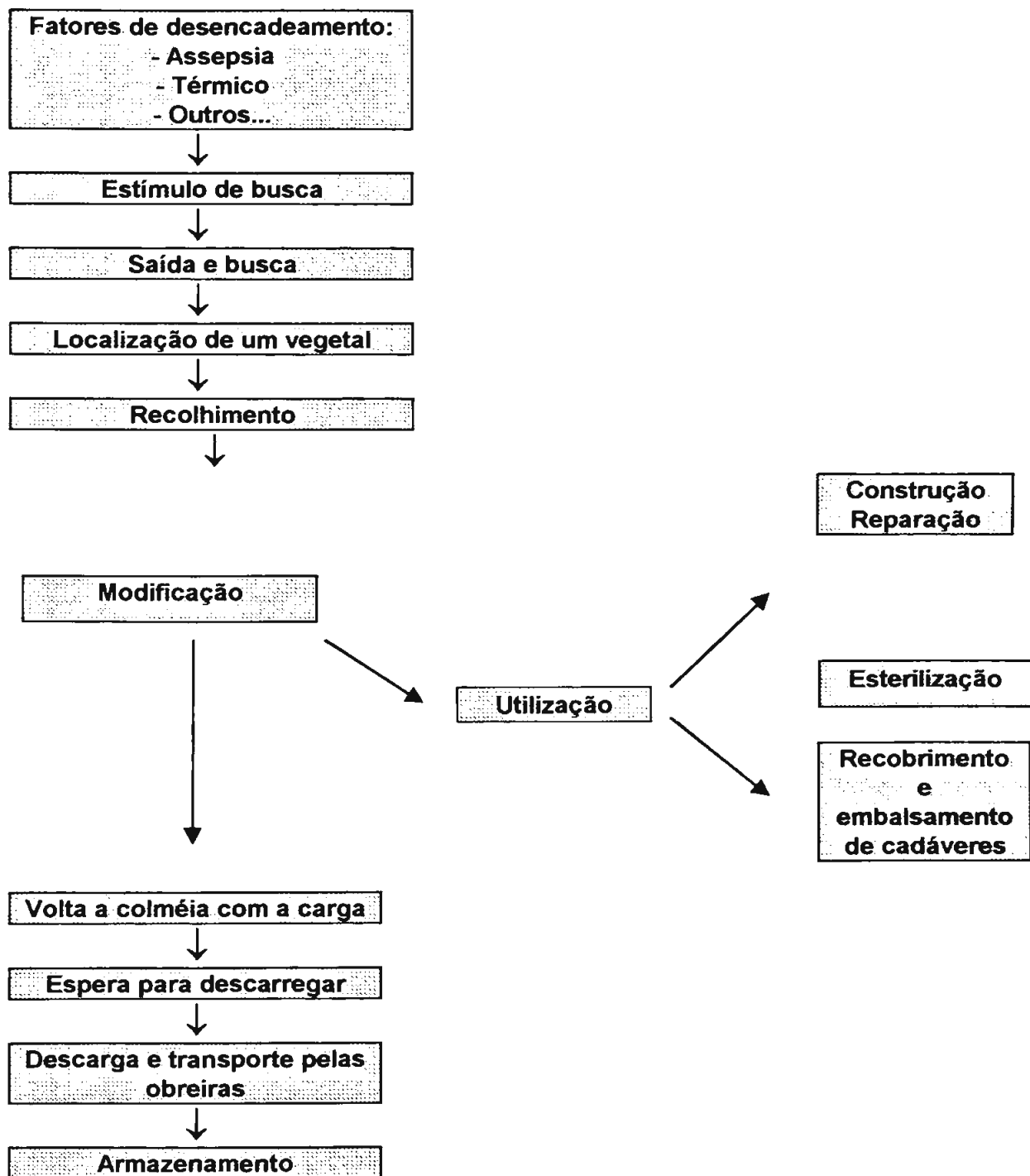


Figura 4 - Esquema de coleta de resinas e utilização da própolis pela abelha (DONADIEU, 1980).

**Histórico da utilização pelos homens.** Relata-se na literatura o conhecimento e uso da própolis desde 300 a.C. (BANKOVA & POPOV et al., 1983). Era conhecida e usada pelos sacerdotes do Egito como auxiliar na mumificação de cadáveres. Os gregos também a utilizavam e foram os responsáveis pelo nome da resina, quando observaram que esta era depositada na entrada da colméia. Aristoteles cita em *História dos Animais* como “remédio para os males da pele, chagas e supurações”. No século II Galeno também cita a resina nos seus tratados. Nas Américas, os Incas a utilizavam no tratamento de infecções febris. São encontrados a partir do século XII relatos de uso nos livros de medicina da Geórgia. Na era moderna, o uso da própolis chegou ao seu auge sendo utilizado como desinfetante e cicatrizante, na guerra dos Boers na África do Sul e também no começo do século XIX no tratamento de chagas na França (DONADIEU, 1980; PAMPLONA, 1997).

Apesar do uso intenso no passado, este não foi contínuo durante os séculos. Após o início do século XIX, pouco relatou-se sobre seu uso, embora este continuasse intenso na medicina popular. Nos últimos anos, percebe-se crescente interesse no estudo detalhado da composição da própolis, relacionando-a à sua atividade (MARCUCCI, 1996).

**Propriedades.** O interesse crescente pela própolis, durante os últimos anos deve-se a sua comprovada atividade terapêutica (GALLO & SAVI, 1995). A ação antibacteriana tem sido estudada por vários autores como ANTUNES & CATÃO, et al. (1996), DOBROWOLSKI & VOHORA et al. (1991), KUJUMGIEV & BANKOVA et al. (1993), MERESTA & MERESTA (1980), PEPEJNJAK & JALSENJAK et al. (1985).

MERESTA & MERESTA (1980) estudaram a sensibilidade de 75 cepas de bactérias frente aos extratos de própolis. Dentre estas, 69 eram pertencentes a *Staphylococcus* spp e *Streptococcus* spp e todas exibiram

---

alta sensibilidade. Frente ao *Staphylococcus aureus* 209P a própolis apresentou concentração mínima inibitória (CMI) e concentração bactericida mínima (CBM) de 10 e 120 mg/ml respectivamente.

DOBROWOLSKI & VOHORA et al. (1991) detectaram que além do efeito contra microrganismos Gram-positivos, a própolis também possui atividade contra bactérias Gram-negativas (*Escherchia coli*, *Shigella flexeneri*). A atividade antibacteriana é atribuída à ação dos flavonóides, ácidos aromáticos e seus ésteres presentes na resina (MERESTA & MERESTA, 1980). O ácido cafêico demonstrou atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas vulgaris* e o ácido ferúlico contra algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (GHISALBERTI, 1979). Galangina, pinocembrina e pinostrombina têm sido reconhecidos como os flavonóides de maior atividade antibacteriana (PEPEJNJAK & JALSENJAK et al., 1985).

Foi relatada atividade antifúngica contra espécies do gênero *Trichophyton* e *Mycrosporium*, sendo que efeitos sinérgicos do extrato etanólico de própolis associado a drogas antifúngicas contra *Candida albicans*, também foram comprovados (MARCUCCI, 1995).

As substâncias ativas da própolis exibem clara atividade antiviral. O ferrulato de isopentila inibe a atividade infecciosa do vírus da influenza A. Diversos flavonóides provenientes da própolis (acacetina, canferol, crisina, quercetina e galangina) foram testados contra um grupo de vírus. Crisina e canferol demonstraram alta atividade na inibição da replicação de muitos vírus da herpes, adenovírus e rotavírus. Acacetina e galangina mostraram atividade bem menor, enquanto a quercetina mostrou-se a menos eficaz de todos os flavonóides estudados (BURDOCK, 1998).

As atividades imunoestimulantes da própolis vêm sendo comprovadas por estudos de avaliação do potencial de ação no sistema imunológico (GHISALBERTI, 1979). KIVALINA & BUDARKOVA (1975) comprovaram que o extrato etanólico de própolis quando injetado simultaneamente com anatoxina tetânica estimula os fatores imunológicos específicos e não específicos.

A atividade cicatrizante estudada detalhadamente por ARVOUET-GRAND & LEJUNE et al. (1993) mostrou que o extrato de própolis incorporado a 5% a uma pomada, quando comparado a um produto de referência (bálsamo do peru), melhora consideravelmente o processo de cicatrização, além de originar cicatrizes de melhor qualidade, mais planas e homogêneas. Também pode-se associar a estas vantagens o baixo custo do produto, a facilidade do manuseio, a ação antibiótica e também o fato da própolis constituir um produto de origem natural (BERNARDO & SOUZA, 1996).

Outras atividades farmacológicas como ação anestésica (GHISALBERTI, 1979), protetor de radiação solar (MORI, 1997; VOLPERT & ELSTNER, 1993), antiúlcera (KEDZIA & IWASZKIWCZ, 1990), antioxidante (VOLPERT & ELSTNER, 1993) e antiinflamatória (DOBROWOLSKI & VOHORA et al., 1991; KHAYAL & EL-GHAZALV et al., 1993) têm sido descritas.

**Características físico-químicas e composição.** As características macroscópicas, organolépticas e composição química diferem conforme a origem e a técnica de coleta pelo homem.

Apresenta natureza lipofílica e diferente consistência conforme a temperatura, sendo dura e quebradiça quando em temperaturas baixas, mas macia, friável e muito pegajosa quando em temperaturas morna ou quente.

Possui odor aromático, característico, com semelhança ao mel e à cera de abelha, e coloração variando entre amarelo claro a castanho escuro (VANHAELEN, 1979).

Apresenta composição complexa. Alguns autores (DONADIEU, 1980; GALLO & SAVI, 1995; GONZÁLEZ & ORZAES, 1997; GHISALBERTI, 1979; MARCUCCI, 1995) dividem estes constituintes nos seguintes grupos:

- \* 50 - 55% de resinas, bálsamos, e gomas
- \* 25 - 35% de cera
- \* 5 - 10% de substâncias voláteis
- \* 5% de pólen
- \* 5% de diversas matérias orgânicas e minerais.

Quimicamente, estas frações são compostas por diversas classes de compostos. A fração resinóide é composta, principalmente, pelas agliconas flavonoídicas e ácidos aromáticos (BANKOVA & CHRISTOV et al., 1992). As ceras têm como componentes principais os hidrocarbonetos com número ímpar de átomos de carbono, com cadeia normal e saturada, ésteres de cadeia longa e saturada, álcoois e ácidos livres, como ácido esteárico (WOISKY, 1996).

Esta composição pode variar de acordo com alguns fatores, como a flora em que a abelha coletou os exsudados, a época da coleta e a raça da abelha (GHISALBERTI, 1979; MARCUCCI, 1995; KULEVANOVA & STAFILOV et al., 1995).

Além disso, a composição da própolis também pode variar de acordo com as necessidades da colméia, pois a resina usada para o conserto dos favos geralmente contém uma quantidade suplementar de cera para proporcionar maior consistência a estes. Já a própolis usada para o recobrimento dos favos contém pouca ou nenhuma cera. As abelhas

também podem incorporar mais cera na própolis quando as fontes de exsudado estão escassas ou difíceis de coletar (BURDOCK, 1998).

Apesar dessas variações, numerosas substâncias encontram-se de modo relativamente constante, sendo responsáveis pelas ações farmacológicas da própolis (GHISALBERTI, 1979).

Outros componentes, como derivados do benzaldeído (vanilina, isovanilina, álcoois, cetonas), compostos hetero - aromáticos (BANKOVA & POPOV et al., 1982), compostos terpênicos (GREENAWAY & SCAYSBOOK et al., 1989), minerais e aminoácidos (KULEVANOVA & STAFILOV et al., 1995; MOREIRA, 1986; GONZÁLEZ & ORZAES, 1997) estão presentes em menor quantidade. Alguns exemplos de compostos já isolados na própolis podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1 - Compostos isolados na própolis (WALKER & CRANE, 1987; MARCUCCI, 1995).

Estrutura básica	Composto
Álcoois	Álcool cinâmico, glicerol, hidroquinona, isobutanol
Aldeídos	Benzaldeído, isovanilina, vanilina.
Ácidos alifáticos e ésteres alifáticos	Ácido acético, ácido butírico, ácido fumárico
Aminoácidos	Alanina, ácido glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, tirosina
Ésteres aromáticos	Acetato de benzila, benzoato de benzila, cafeato de benzila, isoferrulato de benzila
Chalconas	Chalcona alpinetina, chalcona narigenina, chalcona pinobanskina
Flavononas	Narigenina, pinobanskina, pinocembrina, pinostrobina
Flavonas e flavonóis	Acacetina, apigenina, crisina, galangina, canferol, quercetina, ramnetina
Terpenóides	$\beta$ -bisabolol, geraniol, guaiol, farnesol
Açúcares	Frutofuranose, $\alpha$ -D-glicopiranose, $\beta$ -D-glicopiranose
Minerais	Mg, Ca, Zn, Cd, Al, Pb, Fe, Mn

**Toxicidade.** Estudos para garantir o uso seguro de própolis têm sido realizados, em decorrência do desenvolvimento de dermatites de contato com o manuseio da própolis em criadores de abelha (HAUSEN & WOLLENWEBER et al., 1987).

A LD<sub>50</sub> em ratos após de 19h de uso de extratos alcóolicos de própolis foi de 0,7mg/g de peso corporal. A causa da morte foi aparentemente paralisia respiratória. Gatos toleraram 0,1mg/g de peso corporal do extrato administrado por via subcutânea (GHISALBERTI, 1979).

Do ponto de vista alergênico, as substâncias tidas como maiores responsáveis por este efeito são os ésteres dos ácidos aromáticos. Esta ação é consequência da presença de grupos hidroxilas livres no anel aromático. A substituição de um destes grupos, como no 3-metil-2-butenil isopentilferrulato, reduz a capacidade sensibilizante do composto. Substâncias como o ácido 1,1-dimetilalilcaféico foram responsáveis por alergia em animais de laboratório. Os flavonóides não exibem acentuado poder sensibilizante (HAUSEN & EVERS et al., 1992).

Usada oralmente é absorvida por via intestinal e tem sido responsabilizada pela pré sensibilização de pacientes, o que sugere que a limitação do seu uso oral pode prevenir a alergia a própolis (HAUSEN & WOLLENWEBER et al., 1987).

**Farmacocinética.** Devido ao grande número de componentes que a própolis contém, deve-se considerar que sua absorção ocorre como se estes estivessem em qualquer outro alimento. Um dos seus principais grupos componentes, os flavonóides, exibem solubilidade variada e, embora possam ser consumidos como glicosídeos no seu estado natural, enzimas bacterianas (glicosidases), são capazes de degradá-los e permitir a absorção (BURDOCK, 1998).

Não existem estudos conclusivos a respeito do metabolismo da própolis, entretanto, a biotransformação de muitos dos seus componentes é conhecida. A fração mais biologicamente ativa, os flavonóides, são metabolizados sem o acúmulo de resíduos no organismo (BURDOCK, 1998).

**Controle de Qualidade.** Para assegurar que um produto com qualidade chegue às mãos do consumidor, devem ser estabelecidas normas específicas para todas as fases da produção da própolis e obtenção de seus derivados.

Aspectos importantes no momento da coleta como a época, situação e manejo das colméias, linhagem ou raça das abelhas, densidade populacional das colméias e localização do apiário podem influenciar na qualidade da própolis (BREYER, 1995).

Após a coleta, controles específicos devem ser realizados na própolis bruta. A análise de aspectos físicos (cor, odor, sabor, estrutura, consistência) possibilita a avaliação inicial da qualidade do material analisado. Os aspectos químicos do material bruto devem ser realizados utilizando-se técnicas específicas. A determinação do pH, do teor de umidade e percentual de cera são parâmetros essenciais para caracterização e padronização das amostras (Normas para la calidad del propoleos, 1989).

Nas formas farmacêuticas primárias (tinturas e extratos), os principais testes que devem ser realizados visam assegurar a qualidade do produto no que diz respeito à presença de princípios ativos. A realização de triagem fitoquímica assegura a presença das substâncias relatadas como responsáveis pelos efeitos farmacológicos. A determinação de um patamar

mínimo de teor de princípios ativos presentes asseguraria a utilização de produto com comprovado efeito farmacológico. A Tabela 2 descreve outros parâmetros que devem ser avaliados para certificação de um produto com qualidade [Curso de análise de própolis, 1992].

Tabela 2 - Características a serem analisadas para avaliar a qualidade da própolis (Normas para la calidad del propoleos, 1989; 1ºCurso de análise de própolis, 1992).

<b>Características</b>	<b>Especificações</b>
Aspecto Externo	Bolas, grãos ou farpas
Cor	Verde escuro → Castanho escuro
Odor	Característico, resinoso, aromático
Sabor	Amargo
Estrutura	Espessa com formações heterogêneas
Teor de cera	>30%
Reação p/ os flavonóides	Positiva
Misturas mecânicas	>20%
Compostos fenólicos	<30%

## 2.2. Flavonóides

Os flavonóides podem ser quimicamente definidos como compostos que possuem em comum o núcleo benzopirano ou cromano, e são pigmentos responsáveis pela coloração de flores e frutos. Ocorrem freqüentemente no reino vegetal, aparecem nas briófitas, gimnospermas e angiospermas e são praticamente ausentes nas algas. Mais de 500 derivados de flavonóides são conhecidos. Através da alimentação, todo o reino animal é influenciado por estes compostos e durante muitos anos várias preparações contendo flavonóides como substâncias ativas principais foram utilizadas no tratamento de doenças humanas (COSTA, 1977; BRUNETON, 1991; HARBORNE, 1991; HAVSTEEN, 1983).

**Estrutura Química.** Os flavonóides podem ocorrer como glicosídeos (ligados a uma molécula de açúcar), agliconas e derivados metilados (HARBORNE, 1991). As agliconas possuem estrutura básica que é constituída do núcleo benzopirano (anel A e C) ligado a um grupo fenílico na posição 2 (Figura 5) (HAVSTEEN, 1983).

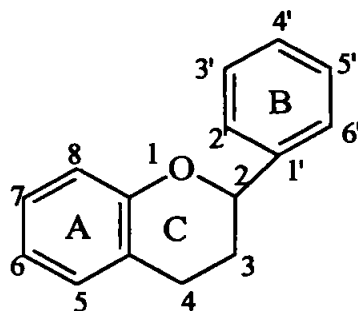


Figura 5 – Estrutura básica dos flavonóides.

A variação de substituintes no anel C origina várias classes de flavonóides conforme a Figura 6 (ROBISON, 1991):

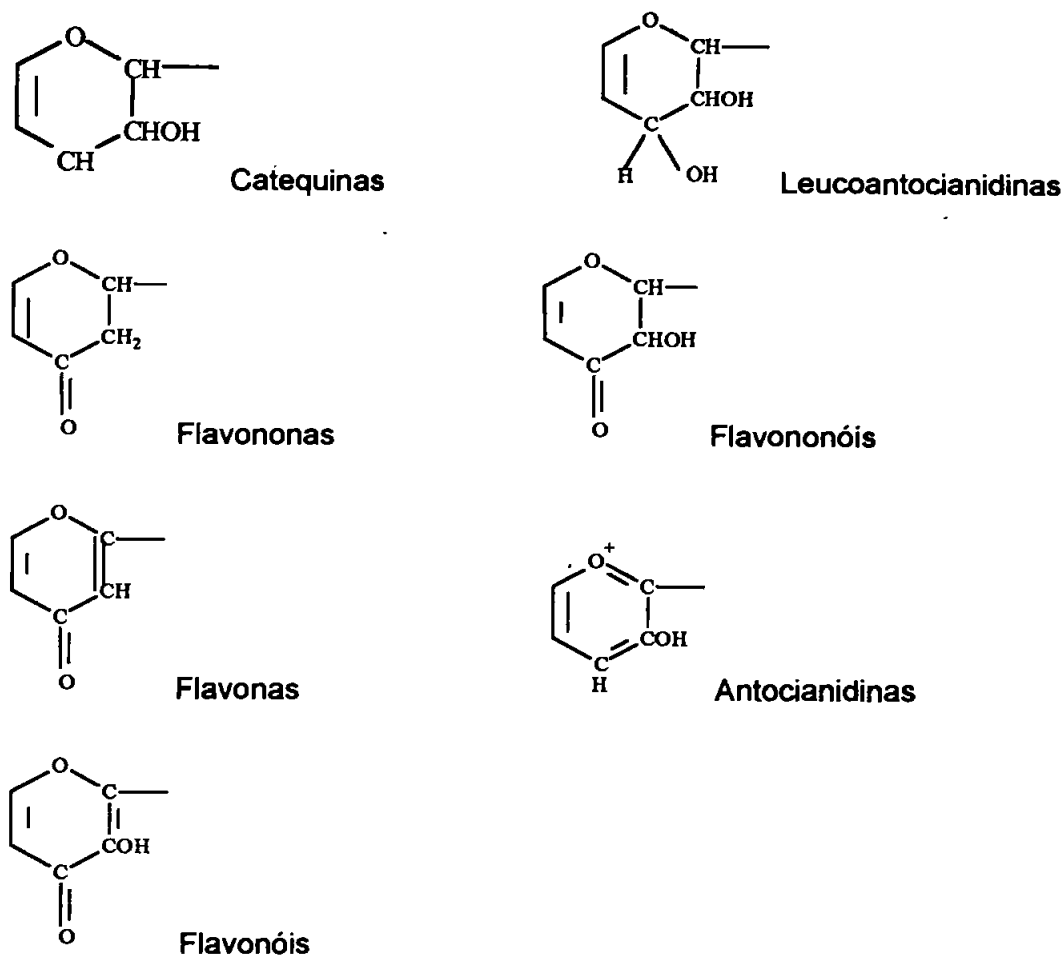


Figura 6 – Exemplos de classes de flavonóides.

**Origem e função fisiológica na planta.** Os flavonóides são provavelmente sintetizados nos plastídios citoplasmáticos e acumulam-se no líquido vacuolar. São encontrados no mesófilo, na epiderme das folhas e na cutícula epidérmica dos frutos, podendo estar presentes também em outros órgãos (BRUNETON, 1991).

Provavelmente participam da fotossíntese como catalizadores do elétron transportador e/ou como regulador do íon envolvido na fosforilação. Foi descrita sua interação com prótons e com a bomba de Na<sup>+</sup> / K (HAVSTEEN, 1983). Atuam na atração de insetos e animais polinizadores,

filtros de radiação ultravioleta, antioxidantes e controladores hormonais (NIGG & SEIGLER, 1992).

**Características físico-químicas.** Os flavonóides possuem grande número de hidroxilas, sendo assim compostos que se solubilizam em solventes polares como etanol, metanol, butanol, acetona e outros (BRUNETON, 1991; MARKHAM, 1982; ROBINSON, 1991). Os correspondentes heterosídeos possuem maior solubilidade na água e nos álcoois diluídos mas são insolúveis nos solventes orgânicos usuais imiscíveis em água. Aparecem sob a forma de cristais coloridos ou excepcionalmente incolores, como as flavonas. Possuem espectros de absorção característicos, devido ao núcleo benzopirano. A presença de hidroxilas no núcleo aumenta o efeito batocrômico, deslocando os espectros de absorção no sentido de comprimentos de onda maiores (COSTA, 1977).

**Ações dos flavonóides no organismo.** As ações dos flavonóides no organismo devem-se à alta reatividade destes compostos. Podem agir ligando-se a enzimas através de diferentes sítios da molécula, inibindo-as. Têm sido relatados exemplos de inibição de enzimas como hidrolases, hialuronidase, fosfatase alcalina e Na<sup>+</sup>/K<sup>-</sup> ATPase da membrana plasmática, envolvidas nos processos de divisão e proliferação celular, processos inflamatórios e respostas imunológicas (HAVSTEEN, 1983; HOLLMAN & HERTOOG et al., 1996).

Descreve-se também sua ação sobre os capilares, diminuindo sua permeabilidade e aumentando a resistência. Sugere-se que um dos mecanismos envolvidos nesta ação seria a inibição da oxidação da adrenalina, fator importante à resistência normal dos capilares (BRUNETON, 1991; COSTA, 1977). São citados ainda como estimulantes cardíacos (STRUCKMANN & NICOLAIDES, 1994; HOLLMAN & HERTOOG

et al., 1996) e antioxidantes (HOLLMAN & HERTOOG et al., 1996; NIGG & SEIGLER, 1992).

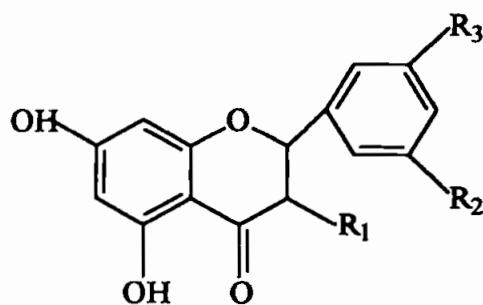
### **2.2.1. Flavonóides presentes na própolis**

As classes de flavonóides mais freqüentemente encontradas na própolis são representadas pelas flavonas, flavonóis, diidroflavonóis, flavononas, chalconas e diidrochalconas (MARCUCCI, 1995; NAGY & GRANCAI, 1996; WALKER & CRANE, 1987). Estes compostos encontram-se na forma de agliconas, pois no momento da coleta são hidrolizados pela enzima  $\beta$ -glucosidase secretadas pelas abelhas (PARK & KOO et al., 1997).

#### **2.2.1.1. Flavonas e flavonóis**

As flavonas mais freqüentes são a apigenina e a luteolina, diferindo dos flavonóis pela ligação 3-hidroxil. Os flavonóis são compostos amplamente distribuídos no reino vegetal. Ocorrem freqüentemente como glicosídeos, e cerca de 200 a 300 agliconas são conhecidas (ROBINSON, 1991). Pode-se visualizar sua estrutura básica na Figura 7 e exemplos obtidos pela substituição dos radicais no Quadro 1. Três são amplamente encontradas na própolis, o canferol, a quercetina e a miricetina. O heterosídeo mais comum é a quercetina-3 rutinosídeo, conhecido como rutina, que tem grande interesse farmacêutico devido à ação sobre a fragilidade capilar (HARBORNE, 1991).

---



$R_1 = H$ : flavona

$R_1 = OH$ : flavonol

Figura 7 - Estrutura química básica de flavonas e flavonóis

Substituindo-se os grupos  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$ , pode-se exemplificar os compostos mais conhecidos (Quadro 1) (VANHAELEN & VANHAELEN-FASTRE, 1979):

Quadro 1 - Exemplos de flavonas e flavonóis presentes na própolis.

Composto	Grupo substituinte		
	$R_1$	$R_2$	$R_3$
Crisina	H	H	H
Apigenina	H	H	OH
Acacetina	H	H	OCH <sub>3</sub>
Canferol	OH	H	OCH <sub>3</sub>
Quercetina	OH	OH	OH
Raminazina	OH	OCH <sub>3</sub>	OH

### 2.2.1.2. Flavononas

Compostos que não possuem coloração ou são fracamente amarelos. São provavelmente os flavonóides mais recentemente conhecidos e sua estrutura básica pode ser visualizada na Figura 8. Quando degradados podem originar chalconas (BRUNETON, 1991; ROBINSON, 1991).

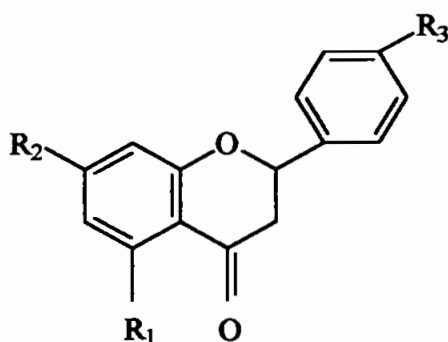


Figura 8 - Estrutura química básica das flavononas

Substituindo-se os grupos, pode-se exemplificar os compostos mais conhecidos (Quadro 2) (VANHAELEN & VANHAELEN-FASTRE, 1979):

Quadro 2 - Exemplos de flavononas presentes na própolis.

Composto	Grupo substituinte		
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Pinocembrina	OH	OH	H
Pinostrobina	H	OCH <sub>3</sub>	H
Sakuranetina	OH	OCH <sub>3</sub>	OH

### 2.2.1.3. Chalconas e Diidrochalconas

Poucos representantes naturais deste grupo são conhecidos, sendo as informações restritas. A estrutura química pode ser visualizada nas Figuras 9 e 10. A conversão de chalconas em flavononas ocorre facilmente em soluções ácidas e pode ser revertida em meio básico (COSTA, 1977; BRUNETON, 1991; ROBINSON, 1991).

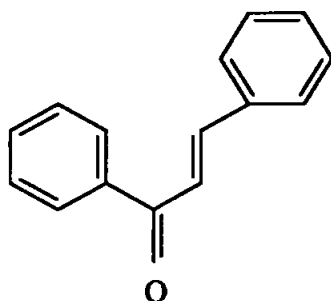


Figura 9 - Estrutura básica da chalcona

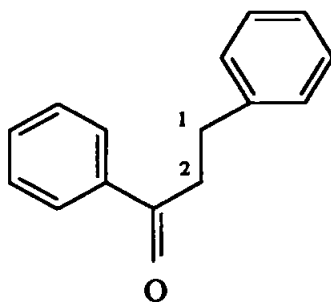


Figura 10 - Estrutura básica da diidrochalcona

A diferenciação ocorre entre os carbonos 1 e 2 pela presença ou não de insaturação (ROBINSON, 1991).

### **2.2.2. Métodos analíticos**

Os métodos analíticos quali e quantitativos propostos para determinação dos flavonóides encontrados na própolis utilizam diversas técnicas, cromatografia em camada delgada, espectrofotometria, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa têm sido descritas para análise destes princípios ativos (ARVOUET-GRAND & VENNAT et al., 1994; 1995; BANKOVA & POPOV et al., 1982, 1983, 1992; FRANCO & KUREBAYASHI 1986; KOO & PARK, 1997; VANHAELEN & VANHAELEN-FASTRÉ, 1979; WOISKY, 1996).

## 2.3. Formas farmacêuticas para uso externo

As formas farmacêuticas semi-sólidas destinadas ao uso externo possuem propriedades plásticas (moldáveis) e mediante esforço mecânico mínimo modificam de sua forma, adaptando-se às superfícies da pele ou às mucosas nas quais são aplicadas. Podem ser empregadas com as finalidades de proteção, lubrificação ou ação terapêutica (IDSON & LAZARUS, 1986).

**Vantagens.** Dentre as vantagens de seu uso, podem ser destacadas a facilidade de aplicação, a possibilidade de obter-se ação local sem absorção sistêmica, como no caso de antiinflamatórios; a possibilidade de obter-se ação sistêmica sem interferência de outras vias metabólicas, como no caso de alguns hormônios, ou ainda, a opção de uso como via alternativa quando outras vias de absorção estão comprometidas (PRISTA, 1981).

**Classificação.** Pode-se classificar as formas farmacêuticas semi-sólidas quanto à sua consistência e composição da formulação, em pomadas (possuem excipientes gordurosos), cremes (preparações com excipientes emulsificados), ceratos (alto teor de ceras), unguentos (presença de resinas), geléias (géis minerais e orgânicos) e pastas (20-50% de sólidos insólúveis) (RIEGER, 1986; PRISTA, 1981).

Quanto à penetração na pele podem ser classificadas em epidérmicas, quando apresentam fraco ou nenhum poder de penetração (como as formulações hidrodispersíveis ou lipofóbicas), endodérmicas quando atuam nas camadas tissulares mais profundas (como as emulsões tipo Água/Óleo) e as diadérmicas, que proporcionam a passagem dos

fármacos para corrente sanguínea (representadas pelas emulsões tipo Óleo/Água) (WILKINSON & MOORE, 1990).

### 2.3.1. Emulsões

São dispersões termodinamicamente instáveis de dois líquidos imiscíveis, formando sistema heterogêneo, no qual existem gotículas de um líquido dispersas em outro líquido, estabilizadas pela ação de agentes tensoativos (RIEGER, 1986; PRISTA, 1981; USP XXIII, 1995).

**Características.** Quando dois líquidos imiscíveis são agitados mecanicamente, tendem a formar gotículas. Quando a agitação é interrompida, essas gotículas tendem a se reagrupar e os dois líquidos a se separarem. Entretanto, se um *agente emulsificante* for adicionado à mistura, o tempo de vida das gotículas é aumentado. Quando se adiciona o emulsificante uma das fases permanece em forma de gotículas, essa fase é denominada *interna (dispersa ou descontínua)*, envolta pela fase *externa (contínua ou dispersante)*, que retorna a sua estado inicial (RIEGER, 1986).

Em geral um dos líquidos formadores da emulsão tem a natureza aquosa (fase aquosa), enquanto o outro é de natureza lípidica ou gordurosa (fase oleosa). Se as gotículas de óleo estão dispersas na fase externa aquosa a emulsão é chamada de óleo em água (O/A). Quando se deseja este tipo de emulsão, deve-se escolher um emulsificante que seja mais solúvel na fase aquosa. A porção lipofílica da molécula será adsorvida pela fase dispersa (oleosa), e a porção hidrofílica ficará na interface óleo-água. A carga presente na interface não permite o reagrupamento da fase interna, devido à repulsa de partículas com a mesma carga (FOX, 1974). Atualmente esse tipo de emulsão corresponde ao maior número de emulsões disponíveis ao uso, devido ao mais fácil espalhamento, maior hidratação da

pele e menor sensação de engorduramento da pele (WILKINSON & MOORE, 1990).

Se o óleo constitui a fase externa será uma emulsão água em óleo (A/O), e também neste caso o emulsificante exerce papel fundamental para manutenção das características do sistema. O tipo de emulsão pode mudar em função do fenômeno denominado inversão de fases (FOX, 1974).

Os agentes emulsificantes são substâncias que reduzem a tensão superficial e interfacial dos líquidos imiscíveis. A seleção do emulsificante correto, além de estabilizar o sistema, não deve interferir na atividade da formulação e seguridade do produto (FOX, 1974; PRISTA, 1981).

Os agentes emulsificantes podem ser classificados em função de vários aspectos, como origem (naturais e sintéticos), atividade emulsionante (principais ou secundários) (WILKINSON & MOORE, 1990; PRISTA, 1981), ou, quanto ao seu comportamento no meio aquoso, como iônicos (aniônicos, catiônicos e anfotéricos) ou não iônicos (WILKINSON & MOORE, 1990; SILVA, 1994).

O tamanho das partículas internas das emulsões pode variar de 0,1 a 10 $\mu$ . O sistema será considerado termodinamicamente mais estável se estas partículas não apresentarem tendência a aglomerar-se ou separar-se, formando uma segunda fase contínua (FOX, 1974).

Outros componentes importantes podem ser encontrados nas formulações com a finalidade de aumentar sua estabilidade. Os conservantes visam impedir o crescimento de microrganismos, que reunidos na interface das emulsões O/A podem alterar a eficiência do emulsificante, o valor do pH e a carga elétrica das gotículas de óleo (MENDONÇA, 1997).

**Estabilidade.** A instabilidade física das emulsões pode ser evidenciada pela separação de fases características da cremação, floculação e coalescência, conforme ilustrado na Figura 11. A cremação é o fenômeno em que os glóbulos da fase dispersa ou interna se reúnem e tendem ou a sedimentar-se ou a subir à superfície da emulsão, dependendo da diferença de densidades entre as fases (IDSON, 1988; SILVA, 1994). A floculação é a adesão reversível das gotículas que permanecem com o filme interfacial e formam uma rede bidimensional sem coalescer (RIEGER, 1986). As alterações acarretam a perda de homogeneidade da formulação, alterando a aparência e podendo ocasionar a concentração de princípios ativos nesta camada.

Os fatores que influenciam na cremação de uma emulsão podem ser traduzidos pelas variáveis presentes na Lei de Stokes (IDSON, 1988; QUACK, 1976):

$$V = \frac{2r^2(d_1 - d_2)g}{9\eta}$$

V - velocidade de sedimentação

r - raio da gotícula da fase dispersa

d<sub>1</sub> - densidade da fase dispersa

d<sub>2</sub> - densidade da fase externa ou contínua

g - aceleração da gravidade

η - viscosidade da fase externa ou contínua

A coalescência ocorre quando as partículas da fase dispersa se aproximam com energia suficiente para se fundir. Esse fenômeno pode continuar até a separação total de fases. É processo irreversível, que não permite a recomposição da emulsão, que só será recuperada com alteração da formulação (IDSON, 1988; MENDONÇA, 1998; QUACK, 1976).

A relação entre o volume de fases também tem papel fundamental na estabilidade das emulsões. A quantidade, o tipo de agente emulsionante e a técnica de preparação são ainda responsáveis pela estabilidade das emulsões (FOX, 1974; WILKINSON & MOORE, 1990).

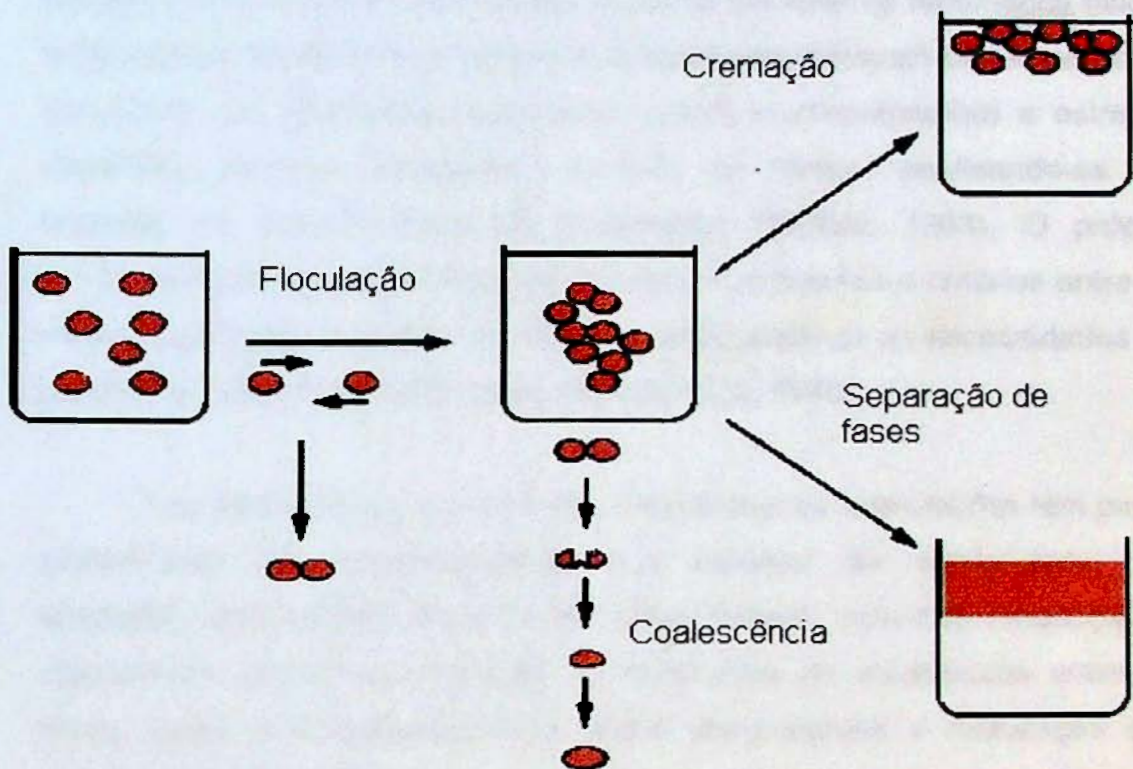


Figura 11 – Representação esquemática da instabilidade das emulsões (LOCHHEAD, 1994)

**Avaliação.** Os testes para avaliação da estabilidade das emulsões visam determinar o tempo durante o qual o sistema manterá suas características originais, sem a ocorrência de degradação, separação, descoloração, aparecimento de odores estranhos ou crescimento bacteriano (KLEIN, 1994; SCHUELLER, 1993). Pode-se acelerar os fenômenos físicos e químicos submetendo-se o sistema a condições extremas de temperatura, gravidade, luz (radiações ultravioleta, visível e infravermelho) e estresse mecânico, durante determinado período de tempo, analisando-se em seguida, as características da preparação (IDSON, 1988). O próprio formulador procura estabelecer seus próprios protocolos e critérios entre as várias sugestões propostas da literatura adequando-os às necessidades do produto em estudo (IDSON, 1988; MENDONÇA, 1998).

As temperaturas às quais são submetidas as formulações têm papel fundamental no desenvolvimento dos estudos de estabilidade das emulsões, pois podem afetá-las de várias formas, incluindo mudança de viscosidade das fases, alteração do coeficiente de solubilidade entre as fases, fusão e congelamento de vários componentes e hidratação dos polímeros (IDSON, 1993).

Não se aconselha o uso de altas temperaturas (>55°C), sendo as temperaturas moderadas mais indicadas, pois são mais próximas das condições reais de estocagem (IDSON, 1993). Estudos realizados em temperaturas abaixo de zero podem fornecer informações importantes sobre destruição do filme interfacial pelo aumento de volume da fase aquosa resultante da formação de gelo (IDSON, 1993; QUACK, 1976).

A instabilidade física da emulsão pode ser avaliada por vários parâmetros. O tamanho das partículas é um dos fatores essenciais para a avaliação da instabilidade. A distribuição irregular ou tamanho não uniforme

são fatores que indicam a desestruturação do sistema. A melhor forma para realizar-se esta avaliação é através da observação microscópica (IDSON, 1988, 1993; RIEGER, 1991).

A tendência à cremação ou sedimentação pode ser acelerada pela alteração da força gravitacional que age sobre as partículas. A utilização de técnicas de centrifugação, que podem ser adaptadas de acordo com as condições do laboratório, simulam esta força (QUACK, 1976). Forças moderadas, entre 2000-5000 rpm, durante curtos períodos de até 30 minutos, em variadas temperaturas, têm sido utilizadas para avaliar emulsões cosméticas (RIEGER, 1991).

O pH é parâmetro importante quando se investiga a estabilidade física de emulsões O/A, já que a fase externa aquosa vai possibilitar a quantificação de íons H<sup>+</sup>. A formulação em estudo deve apresentar pH compatível com a região do corpo em que será aplicada para evitar-se problemas de irritabilidade do local em contato com o produto (PRISTA, 1981).

As características reológicas das formas farmacêuticas semi-sólidas definem como este sistema irá comportar-se ao ser exposto a uma força externa. Podem ser avaliadas através de viscosímetros ou reômetros, os quais fornecerão reogramas capazes de caracterizar as formulações não Newtonianas (plásticas, pseudo plásticas ou dilatantes) (MINER, 1993; QUACK, 1976).

Os fluídos não Newtonianos são aqueles que não apresentam reação linear entre a força aplicada e a velocidade de escoamento. Os materiais plásticos são denominados fluidos de Bingham e caracterizam-se por apresentarem reogramas em que a curva não passa pela origem, o que significa que deve haver uma força inicial para que fluam – valor de

cedência. Os plásticos não apresentam esta propriedade, caracterizando-se por possuírem gráficos que aproximam-se da origem. Os fluidos dilatantes apresentam crescente resistência ao fluxo, que aumenta com o incremento da força de cisalhamento (IDSON, 1978).

O tempo que uma formulação leva para se reorganizar quando é submetida à desorganização do sistema pela ação da força pode ser definido como tixotropia (NAÉ, 1993; RENG, 1979). O valor de cedência é a força mínima necessária para iniciar o fluxo do material, característica determinante dos fluidos pseudoplásticos (IDSON, 1978).

Através das propriedades reológicas pode-se avaliar a variação de viscosidade, fator que determina a resistência da formulação à fluidez, parâmetro importante para se caracterizar as formas semi-sólidas (ROA, 1979).

Geralmente a viscosidade da formulação tem relação linear com a viscosidade da fase externa, mas também influenciam o método de produção, distribuição das gotículas da fase dispersa, estrutura química do agente emulsificante e propriedades do filme interfacial óleo-água (FOX, 1974).

A avaliação visual das formulações constitui importante meio para detecção de separação de fases, cremação ou sedimentação (RIEGER, 1991; QUACK, 1976).

A investigação da presença de estruturas denominadas cristais líquidos é outro fator importante para investigar a estabilidade das emulsões. Estas moléculas agem como pontes entre as partículas da fase interna e a fase externa, agindo como barreira para a coalescência. A presença de cristais líquidos é investigada microscopicamente, e sendo

anisótropicos, exibem birefringência e podem ser observados sob luz polarizada (KLEIN, 1984; LOCHHEAD, 1994).

### **2.3.2. Géis**

Os géis são formas farmacêuticas semi-sólidas constituídas pela dispersão de partículas pequenas (entre 0,001-0,01 $\mu$ ) em veículo líquido, com características coloidais e aspecto gelatinoso. São obtidos a partir de substâncias denominadas geleificantes (IDSON, 1986).

Possuem propriedades coloidais e permitem a incorporação de outras substâncias em suas malhas (PRISTA, 1981). Os géis podem ser considerados suspensões, pois são sistemas heterogêneos que apresentam uma fase externa (contínua) líquida e outra semisólida (interna) ou dispersa, constituída por partículas sólidas insolúveis no meio utilizado.

**Classificação.** Podem ser classificados como hidrófobos ou oleogéis quando apresentam excipientes gordurosos (óleos, parafina) e hidrófilos ou hidrogéis, formados por gomas (adraganta, caraia), amido, derivados da celulose e outros polímeros, dispersos em água ou glicóis (como glicerina e propilenoglicol) para geleificação (PRISTA, 1981).

**Estabilidade.** São formulações bastantes estáveis. Os géis de carboximetilcelulose (CMC) conservam a viscosidade por longos períodos, mas podem ser afetados por reações de oxidação, hidrólise ácida ou ação de microrganismos. Os carbômeros (polímeros carboxivinílicos do ácido acrílico) são sensíveis à oxidação sob ação da luz e de metais pesados, devido à polimerização da resina, com diminuição da viscosidade. A viscosidade entretanto mantém-se estável frente à variação de temperatura (VELASCO, 1993).

**Avaliação.** Os métodos utilizados para avaliar as propriedades e estabilidade dos géis podem ser semelhantes aos utilizados para emulsões. A avaliação de pH, das características reológicas e as características visuais ou macroscópicas fornecem dados importantes sobre o tempo durante o qual o sistema manterá suas características originais (IDSON, 1986; PRISTA, 1981).

### **3. OBJETIVOS**

O principal objetivo do trabalho foi o desenvolvimento e avaliação de formulações para uso externo contendo extrato de própolis. Para tanto, foram realizadas algumas etapas experimentais como:

- \* Caracterização do perfil físico-químico de amostras de própolis de estados da região sul e sudeste do Brasil.

- \* Padronização de método espectrofotométrico para análise dos flavonóides totais da própolis.

- \* Preparação de cremes e géis.

- \* Estudo das características físicas das preparações.

- \* Estudo da estabilidade dos flavonóides totais nas formulações.

- \* Padronização de metodologia para separação de excipientes e princípios ativos.

- \* Padronização de metodologia para avaliação de liberação dos princípios ativos presentes nas formulações.

---

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

## 4.1. Materiais

### 4.1.1. Equipamentos e instrumentos

- Aerômetro de Baumé
- Agitador magnético - Ética
- Agitador tipo mix - Walita
- Alcoômetro de Gay-Lussac
- Aparelho de dissolução - Ética
- Balança analítica, modelo A 100, sensibilidade  $10^{-1}$  - Marte
- Cronômetro - Technos
- Centrífuga - ADAMS
- Embalagens plásticas opacas de polipropileno com capacidade para 30 e 250g
- Estufa termostatizadas a 35° C - Ética
- Estufa termostatizadas a 45° C - Fanem
- Espectrofotômetro, modelo 634 - Varian
- Evaporador rotativo - Ética
- Lâmpada UV –
- Liquidificador - Walita
- Medidor de pH DMPH -2, Digimed - Tecnal
- Microscópio BX 50 - Olympus
- Tamis malha 0,084mm
- Viscosímetro - Brookfield, modelo RVT, com spindle modelo SC4-29R

## 4.1.2. Matérias-primas e reagentes

### 4.1.2.1. Própolis

As amostras de própolis foram provenientes dos Estados de São Paulo, Santa Catarina e de regiões distintas do Estado do Paraná (Tabela 3).

Tabela 3 - Identificação das amostras de própolis estudadas.

<b>Amostra*</b>	<b>Procedência</b>	<b>Data da coleta</b>
01	Paulo Frontim-PR	02/04/97
02	Cruz Machado –PR	02/97
03	Antônio Olinto – PR	06/05/97
04	Cruz Machado – PR	13/08/97
05	Inácio Martins-PR	11/06/97
06	Canoinhas – PR	21/05/97
07	Taió – SC	05/05/97
08	São Paulo	—
09	Santa Catarina	—

\* Fornecedores: Breyer - Produtos Apícolas e Associação Brasileira de Própolis

#### 4.1.2.2. Padrões

##### Apigenina

Grau de pureza: padrão analítico

Fornecedor: Sigma

Nome químico: 5,7-diidroxi-2(4-hidroxifenil)- 4H-1-benzopirano-4-ona; 4',5,7-triidroxiflavona

Fórmula estrutural:  $C_{15}H_{10}O_5$

A estrutura pode ser visualizada na Figura 12.

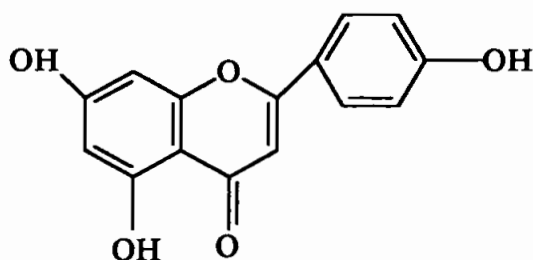


Figura 12 – Estrutura química da apigenina.

Propriedades:

É a aglicona da apigenina-7-glicosídeo. Obtida pela hidrólise enzimática do glicosídeo pela emulsificação ou fervura com 15% de  $H_2SO_4$ . Possui coloração amarela. Intervalo de fusão 345-350°C. Apresenta  $\lambda$  máximo - 269, 340 nm. Praticamente insolúvel em água, moderadamente solúvel em álcool, solúvel em KOH diluído originando solução de cor intensamente amarela (MERCK INDEX, 1996).

##### Canferol

Grau de pureza: padrão analítico

Fornecedor: Sigma

Nome químico: 3,5,7,triidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopirano-4-ona; 3,4',5,7-tetraidroxiflavona.

Fórmula estrutural:  $C_{15}H_{10}O_6$

A estrutura química pode ser visualizada na Figura 13.

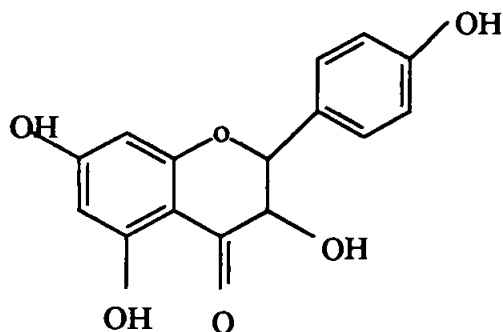


Figura 13 – Estrutura química do canferol.

Flavonóide originado de plantas. Isolado pela primeira vez na espécie *Delphinium consolida* L. (1902). Possui coloração amarela, intervalo de fusão 276-278°C. Apresenta  $\lambda$  máximo: 265, 365 nm. Fracamente solúvel em água, solúvel em álcool quente ou álcalis (MERCK INDEX, 1996).

### Quercetina

Grau de pureza: padrão analítico

Fornecedor: Merck

Nome químico: 2-(3,4-diidrofenil)-3,5,7, triidroxi-4H-1-benzopirano-4-ona; 3,3',4',5,7- pentaiidroxiflavona.

Fórmula estrutural:  $C_{15}H_{10}O_7$

A estrutura química da quercetina pode ser visualizada na Figura

14.

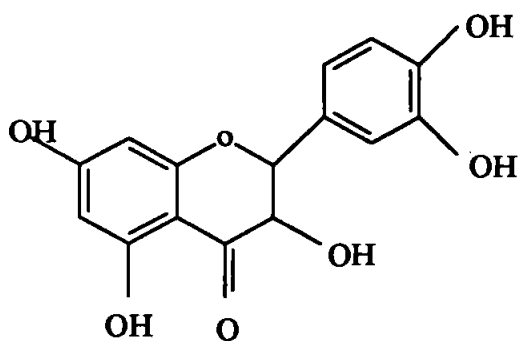


Figura 14 – Estrutura química da quercetina.

#### Propriedades:

É a aglicona da quercitrina, rutina e outros glicosídeos. Largamente distribuída no reino vegetal, especialmente nas cascas e botões florais. Possui coloração amarela em solução alcóolica. Apresenta  $\lambda$  máximo 258, 375 nm. Um grama se dissolve em 290 ml de álcool absoluto e em 23 ml de álcool fervente. Praticamente insolúvel em água. LD<sub>50</sub> em ratos: 160mg/Kg. A forma anidra decompõe-se a 314°C (MERCK INDEX, 1996).

#### 4.1.2.3. Constituintes das formulações

Todas as matérias-primas utilizadas foram de grau farmacêutico.

- Álcool cetosteárico sulfatado (Henkel)
- Carboxilpolimetileno (Goodrich)
- Crodabase CR - 2® - Base autoemulsionável emoliente, apropriada para emulsão O/A (Croda)
- Hidroxietilcelulose (HHR)
- Metilparabeno (Brasfanta)
- Propilparabeno (Brasfanta)
- Propilenoglicol (Dow Química)
- Trietanolamina (BASF)
- Uniphen ® - Mistura de parabenos utilizados como conservantes (Induchem)
- Vaselina líquida (Chemical Union)

#### 4.1.2.4. Formulações estudadas

A composição das formulações estudadas obedecem o esquema apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 – Composição das formulações estudadas.

Componentes	Composição % (p/p)			
	E1	E2	G1	G2
Extrato de própolis	10	10	10	10
Propilenoglicol	5	5	5	5
Álcool				
cetoestearílico sulfatado	12	-	-	-
Cera crodabase – CR2	-	12	-	-
Carboxilpolimetileno	-	-	1	-
Hidroxietilcelulose	-	-	-	1
Vaselina líquida	5	5	-	-
Trietanolamina	-	-	0,7	-
Conservante	1	1	1	1
Álcool etílico 96°	-	-	10	10
Água destilada	67	67	72,3	73
Em que:			G1 - gel iônico	
E1 - emulsão iônica			G2 - gel não iônico	
E2 - emulsão não iônica				

Estas formulações foram utilizadas nos estudos prévios de estabilidade. Prosseguiu-se as análises com as formulações E1 e G1. Nestas foram utilizadas concentrações totais de 5, 10 e 15% do extrato glicólico de própolis.

#### 4.1.2.5. Solventes e reagentes

- Acetato de etila p.a – Merck
- Acetato de chumbo
- Ácido acético p.a – Merck
- Ácido clorídrico
- Ácido fórmico p.a – Merck
- Ácido sulfúrico
- Álcool etílico p.a - Merck
- Álcool metílico p.a - Merck
- Benzeno p.a - Merck
- Clorofórmio p.a - Merck
- Cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ )
- Cloreto férrico
- Floroglucinol clorídrico
- Hidróxido de amônio
- Reativo de Bertrand, Bouchardat, Dragendorff, Mayer (FREITAS, 1994)

#### 4.1.2.6. Outros

- Placas de silicagel 60 F - 254 – Merck
- Silíca gel para cromatografia em coluna, tamanho de partícula 0,063-0,200mm (70- 230 mesh ASTM) - Merck

## **4.2. Métodos**

### **4.2.1. Caracterização das amostras de própolis bruta**

#### **4.2.1.1. Caracterização física**

Procedeu-se a identificação macroscópica e avaliaram-se características como cor, odor, aparência e presença de impurezas nas amostras de própolis bruta.

#### **4.2.1.2. Análise fitoquímica**

A abordagem fitoquímica para caracterização da presença de grupos químicos presentes nas amostras (COSTA, 1977; FREITAS, 1994). Procurou-se identificar qualitativamente grupos de compostos conhecidos, como taninos, alcalóides, flavonóides, saponinas e derivados antraquinônicos.

#### **Avaliação da presença de compostos fenólicos (flavonóides)**

Para identificação deste grupo foram efetuadas as seguintes reações (COSTA, 1977; FREITAS, 1994):

Reação do cloreto férrico - Em 3 ml da tintura hidroalcolica adicionaram-se 2 gotas de cloreto férrico a 4,5%. O resultado positivo é indicado pela presença de coloração verde-acastanhado, de acordo com o tipo de flavonóide presente.

**Reação com hidróxido de sódio** - Em 3ml da tintura hidroalcólica adicionaram-se 2 gotas de solução de hidróxido de sódio a 5%. O resultado positivo é indicado pelo aparecimento de cor amarela.

**Reação com cloreto de alumínio** - Em papel de filtro colocaram-se duas gotas da tintura hidroalcólica em regiões diferentes do papel. Adicionou-se 1 gota da solução de cloreto de alumínio a 5% a uma das gotas. O resultado positivo é indicado pela intensificação da fluorescência na região de contato entre a tintura e o reativo quando observada sob luz ultravioleta.

### **Avaliação da presença de taninos**

Procedeu-se a avaliação da presença deste grupo realizando-se as seguintes reações (COSTA, 1977; FREITAS, 1994):

**Preparo do extrato para teste** - Pesaram-se cerca de 3g da própolis em pó. Extraíu-se com aproximadamente 40 ml de água fervente durante 2 minutos. Filtrou-se em papel de filtro. Repetiu-se a extração por mais duas vezes adicionando-se 10 ml de água destilada e fervendo-se por 2 minutos. Reuniram-se as três soluções filtradas. As seguintes reações de identificação foram realizadas:

**Reação com cloreto férrico** - Juntaram-se 1 ml da solução obtida mais 5 ml de água. Adicionou-se, pelas paredes do recipiente, 0,5 ml de cloreto férrico a 2%. O resultado positivo é indicado pelo aparecimento de precipitado ou coloração diversa (azul a violeta - taninos gálicos / verde - taninos catequínicos).

**Identificação dos taninos gálicos.** Juntaram-se 3 ml da solução aquosa com 5 ml de ácido acético glacial a 10% e 3 ml de acetato de

chumbo a 10%. O resultado positivo é indicado pelo aparecimento de precipitado castanho-avermelhado.

Procedeu-se a identificação dos taninos catequínicos através da reação de floroglucinol clorídrico - Ferveu-se por 2 minutos, a solução teste com um palito de madeira dentro. Retirou-se o palito e deixou-se secar. Umedeceu-se o palito seco com ácido clorídrico concentrado. O resultado positivo é indicado pelo aparecimento de coloração rosa ou vermelho vinho no palito.

#### **Avaliação da presença saponinas**

Para identificação deste grupo procedeu-se a seguinte reação (COSTA, 1977; FREITAS, 1994):

Obteve-se solução aquosa pela fervura de 3 g das amostras em 40 ml de água destilada. Colocaram-se 5ml desta solução em tubo de ensaio com capacidade para 25 ml. Agitou-se o tubo vigorosamente em sentido vertical por 5 segundos. O resultado positivo é indicado pela persistência de espuma abundante após 30 minutos.

#### **Avaliação da presença de derivados antraquinônicos**

Para identificação deste grupo procedeu-se a seguinte reação (COSTA, 1977; FREITAS, 1994):

Reação de Borntraeger - Ferveu-se 1 g da própolis em pó com 15ml de etanol a 25% por 2 minutos. A 10ml do filtrado adicionaram-se 4 ml de ácido sulfúrico 10% e ferveu-se a mistura por 1 minuto. Deixou-se esfriar. Agitou-se com 1ml de benzeno R. Separou-se a camada benzênica e

agitou-se com igual volume de hidróxido de amônio SR. O resultado positivo é indicado pela formação de coloração avermelhada.

### **Avaliação da presença de alcalóides**

Para identificação deste grupo procedeu-se a seguinte reação (COSTA, 1977; FREITAS, 1994):

Processo de extração de alcalóides - pesaram-se 2 g da própolis em pó. Alcalinizou-se a droga umidecendo-a com hidróxido de amônio a 10%. Juntaram-se à droga 15 ml de clorofórmio. Agitou-se durante alguns minutos. Deixou-se em repouso e filtrou-se o sobrenadante. Extraíu-se mais duas vezes com clorofórmio. Utilizou-se a fase clorofórmica para a realização dos testes de identificação.

Para identificação deste grupo procedeu-se a seguinte reação:

Reações de Precipitação - colocou-se uma gota do extrato alcalino sobre uma lâmina para microscópio, adicionando-se uma gota de cada um dos reativos. Uniram-se as duas gotas e observou-se. O resultado positivo é indicado pela formação de precipitado ou a mudança de coloração. Utilizaram-se os reativos de Bertrand (substância reativa - ácido silicotúngstico), Mayer I (substância reativa - tetraidomercuriato de potássio), Dragendorff (substância reativa - tetraiodobismutato) e Bouchardat (substância reativa - iodeto de potássio).

#### **4.2.1.3. Determinação do teor de cinzas**

Procedeu-se a determinação do teor de cinzas segundo a FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL (1959), para determinação do material inorgânico presente nas amostras. Calcinaram-se 2g de própolis pulverizada em mufla a 600°C por 1 hora. Deixou-se em

dessecador até peso constante. Calculou-se o teor de cinzas em função do peso seco de própolis pulverizada.

#### **4.2.2. Preparação dos Extratos**

Baseados na aprovação das características macroscópicas e organolépticas das amostras, foram selecionadas 07 amostras para prosseguimento dos estudos. As amostras de própolis bruta foram submetidas a trituração por turbólise até a obtenção de um pó fino, com a finalidade de aumentar a superfície de contato com o líquido extrator e conseqüentemente a transferência de princípios ativos. Após a pulverização o material foi tamisado através de tamis de malha 0,84 mm, para que se obtivesse pó com diâmetro homogêneo.

Utilizou-se a proporção de 200g de cada amostra para 1000mL do líquido extrator para obtenção da tintura por maceração. As tinturas foram obtidas em condições semelhantes, deixou-se em maceração pelo período de 07 dias em solução hidroalcolica a 70%, com agitação esporádica. Após decorrido o tempo, estas foram filtradas em papel de filtro e o volume final completado para 1000mL. Foram acondicionadas em frascos âmbar e denominadas como tinturas I, II, III, IV, V, VI, VII.

Com o emprego de rotaevaporador, cada tintura foi reduzida a 50% de seu volume (500ml) em temperatura controlada a 30°C. Ressuspendeu-se o extrato concentrado restante em igual volume (500ml) de propilenoglicol, obtendo-se assim o extrato glicólico. O esquema das etapas realizadas para obtenção do extrato glicólico podem ser visualizadas na Figura 11 e a partir deste procedimento obtiveram-se os extratos I, II, III, IV, V, VI, VII.

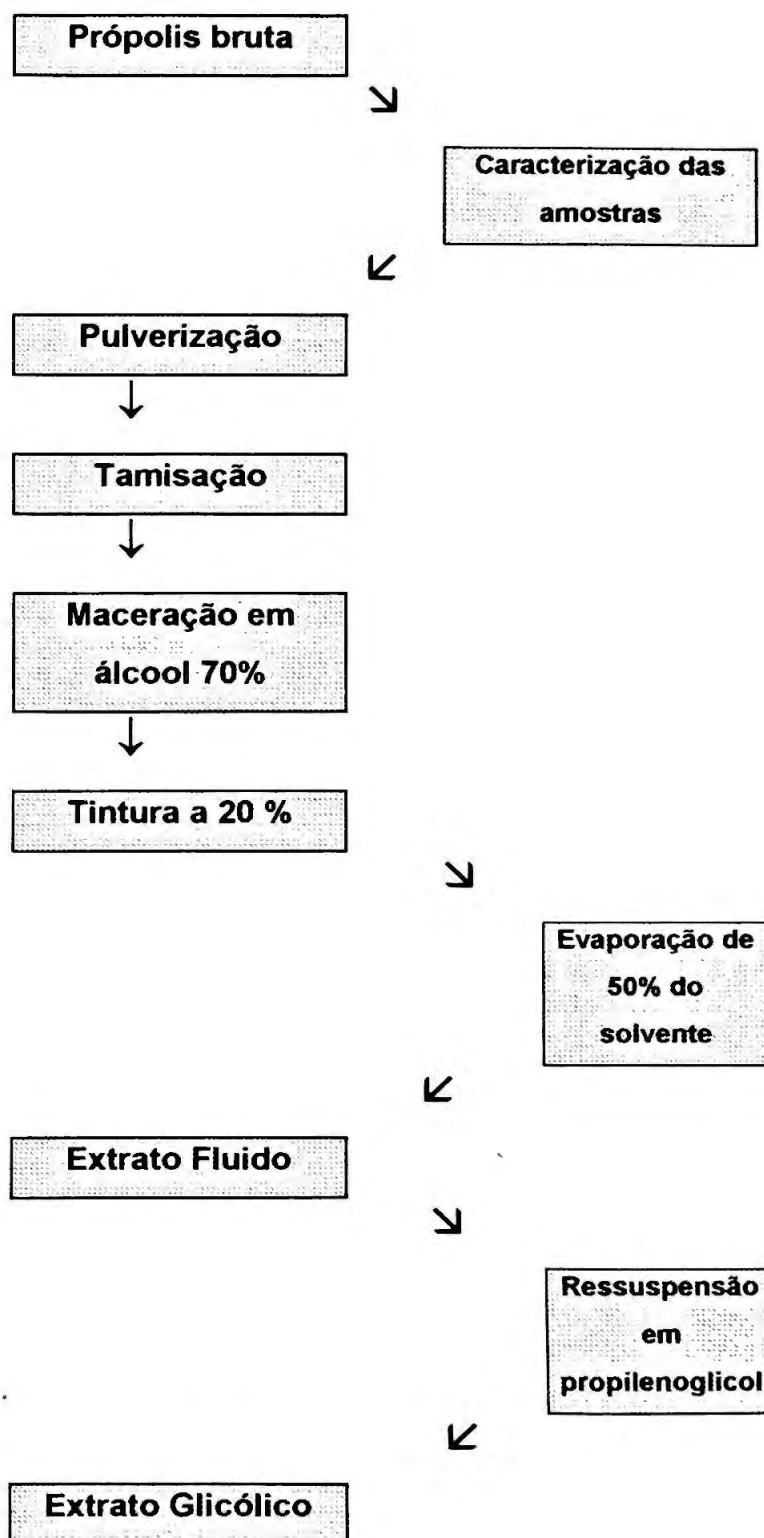


FIGURA 15 - Esquema de obtenção do extrato glicólico de propólis.

#### **4.2.2.1. Caracterização dos extratos glicólicos**

##### **pH**

Foi determinado o pH utilizando-se peagômetro Digimed modelo DM 20, introduzindo-se o eletrodo em uma alíquota de 20 ml de cada um dos extratos glicólicos.

##### **Resíduo seco**

Cápsulas de porcelana foram mantidas em estufa a 105°C durante três horas, resfriadas e deixadas em dessecador até peso constante. O processo foi repetido com 1 g do extrato. Obteve-se o peso final dos resíduos e calculou-se a porcentagem de resíduo seco de cada amostra (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1959).

##### **Densidade**

A densidade dos extratos obtidos foi determinada segundo método descrito por POZO (1963) utilizando-se aerômetro (Graduador de Baumé). Para cada amostra foram realizadas 3 determinações a temperatura de 25°C.

##### **Teor alcoólico**

Determinou-se o teor alcoólico dos extratos obtidos segundo método descrito por POZO (1963), utilizando-se alcoômetro de Gay-Lussac. Para cada amostra realizaram-se 3 determinações a temperatura de 25°C.

### **Análise dos princípios ativos por cromatografia em camada delgada**

Realizou-se a determinação dos flavonóides das amostras, seguindo-se a metodologia adotada por ARVOUET-GRAND & VENNAT et al., (1994), nas seguintes condições:

Suporte: Placa de silicagel AL TLC 20 x 20 cm, 60F 254 (Merck).

Amostra: Extrato de própolis a 20%.

Migração: 10cm a 25<sup>o</sup>C, sentido ascendente.

Fase móvel: benzeno: acetato de etila: ácido fórmico (36:12:05).

Padrões: Apigenina

Crisina

Canferol

Quercetina

Revelador: Luz Ultravioleta 365 nm.

### **4.2.3. Doseamento espectrofotométrico dos flavonóides**

Para quantificação dos princípios ativos presentes nas amostras, adaptou-se o método espectrofotométrico adotado pela Farmacopéia Alemã (STHAL & SCHIL, 1981) e por autores que procederam à dosagem de flavonóides totais provenientes da própolis (MORI, 1997; WOISKY, 1996; NAGY & GRANCAI, 1996). Utilizou-se como padrão a quercetina.

#### **4.2.3.1. Padronização e Validação do Método**

O método foi padronizado determinando-se o espectro de absorção do padrão (quercetina), espectro de absorção da solução de cloreto de alumínio em metanol, curva de Ringbom e reta de calibração, estabilidade do composto formado e reprodutibilidade do aparelho e do método (POTTER, 1995).

#### **4.2.3.2. Curva de calibração da quercetina**

Preparou-se a solução padrão de quercetina dissolvendo-se 100 mg do padrão em 350 ml de metanol em um balão de capacidade para 500ml, obtendo-se assim solução com concentração de 200 µg/ml. Construiu-se a curva padrão, utilizando-se soluções em concentrações de 2,0 a 10 µg/ml. Transferiu-se para um balão volumétrico de 25 ml a alíquota correspondente de cada concentração, 1ml da solução de  $AlCl_3$  e completou-se o volume. Após decorridos 30 minutos, realizou-se a leitura da absorbância a 415 nm. Calculou-se a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados.

#### 4.2.3.3. Análise das amostras

Tomou-se uma alíquota de 0,200µl do extrato glicólico e adicionou-se 1 ml de solução de cloreto de alumínio a 2%, completou-se o volume para 25ml com a solução de ácido acético em metanol a 5%. Esperou-se 30 minutos e procedeu-se a leitura da absorbância contra o branco contendo a solução metanólica de ácido acético a 5% e a solução de cloreto de alumínio a 2%. A concentração de flavonóides totais foi calculada em função da equação da reta de calibração da quercetina.

## **4.2.4. Preparação das formulações**

### **4.2.4.1. Preparação das emulsões**

Os componentes e a proporção destes nas emulsões podem ser visualizados em materiais (item 4.1.2.4).

A preparação das emulsões foi realizada segundo o método de inversão de fases em alta temperatura (PRISTA, 1981). As fases foram aquecidas separadamente; aqueceu-se 50 % da fase aquosa e 100% da fase oleosa a temperatura de 80-85°C. A fase aquosa foi vertida sobre a oleosa com agitação com a ajuda do agitador tipo mix por 10 minutos até a temperatura atingir 30°C. Foi incorporada o restante da fase aquosa contendo o extrato glicólico de própolis. Manteve-se a agitação por mais 10 minutos para perfeita homogeneização. Estas formulações foram denominadas E1 e E2.

### **4.2.4.2. Preparação dos géis**

Os componentes e a proporção destes nos géis podem ser visualizados em materiais (item 4.1.2.4).

Aqueceu-se 50% da quantidade total de água da formulação até a temperatura de 70°C para melhor solubilização do carboxilpolimetileno (obtenção do G1) e da hidroxietilcellulose (obtenção do G2). Agitou-se com o agitador tipo mix até a completa dissolução do pó e até atingir a temperatura de 30°C. Com agitação constante, incorporou-se o extrato glicólico de própolis, e o restante dos componentes da formulações.

#### 4.2.4.3. Estudo preliminar de estabilidade

As formulações foram submetidas à análise macroscópica por avaliação visual 48 h após a fabricação e após 1 mês de permanência em temperatura ambiente.

Foram observados itens como cor, odor, aparência e homogeneidade.

Foi realizado estudo de separação de fases, no qual centrifugou-se 5g das formulações durante 30 minutos à 3000 rpm (IDSON, 1988).

Prosseguiram-se os estudos com as formulações que mostraram-se mais estáveis, variando-se as concentrações do extrato de própolis com a finalidade de verificar-se como esta afetaria a estabilidade das formulações.

## **4.2.5. Extração dos princípios ativos**

### **4.2.5.1. Extração de flavonóides a partir das tinturas**

#### **4.2.5.1.1. Extração por coluna**

Foi realizada segundo diversas condições e, aquela que apresentou os melhores resultados, obedecia aos seguintes parâmetros:

Coluna: diâmetro interno: 10 mm

Comprimento: 50 mm

Volume morto: 50ml

Fase estacionária: sílica gel 60 - Merck ART 7734, tamanho da partícula 0,063-0,020 mm (70-230 mesh ASTM).

Montou-se a coluna por via úmida. Tomou-se uma alíquota de 2ml do extrato glicólico, evaporou-se o solvente, ressuspendeu-se o resíduo em clorofórmio esta solução foi levada à coluna e eluída por 3 vezes com 20 ml de clorofórmio. Repetiu-se a eluição por mais 4 vezes com a fase móvel benzeno: acetato de etila: ácido fórmico (36:12:5). Foram feitas mais 4 eluições com metanol. Todas as fases eluentes foram evaporadas e os resíduos resuspensores em 10 ml de solução metanólica de ácido acético a 5%.

Nesta solução foram realizadas reações para determinação espectrofotométrica de flavonóides, adicionando-se 1ml da solução de cloreto de alumínio a 2%, completou-se o volume para 25ml em balão volumétrico com solução metanólica de ácido acético a 5%. O esquema das eluições pode ser visualizado na Figura 16.

#### **4.2.5.1.2. Extração por partição em solventes**

Utilizaram-se 5 ml do extrato glicólico, em funil de separação com 5 ml de clorofórmio. Agitou-se e deixou-se em repouso por 15 minutos. Procedeu-se mais 2 lavagens com a mesma quantidade de clorofórmio. As frações foram juntadas e evaporou-se o solvente. Ressuspendeu-se em 10 ml de solução metanólica de ácido acético a 5%

Nesta solução foram realizadas reações para determinação espectrofotométrica de flavonóides, adicionando-se 1ml da solução de cloreto de alumínio a 2% e completando-se o volume para 25ml em balão volumétrico com da solução metanólica de ácido acético a 5%. O esquema da extração pode ser visualizado na Figura 17.

#### **4.2.5.2. Extração de flavonóides totais a partir das emulsões**

##### **4.2.5.2.1. Extração por coluna**

Pesaram-se 2g dos cremes. Diluiu-se em 20 ml de clorofórmio. Montou-se a coluna em clorofórmio e colocou-se a amostra. Procedeu-se 3 lavagens com 20 ml de clorofórmio (fase eluente 1). Eluiu-se 4 vezes com a fase móvel benzeno: acetato de etila: ácido fórmico (36:12:5) (fase eluente 2). Eluiu-se por mais 4 vezes com metanol (fase eluente 3). Evaporaram-se as fases eluentes e ressuspendeu-se em 10 ml da solução metanólica de ácido acético a 5%.

Esta solução foi utilizada para o doseamento espectrofotométrico de flavonóides totais adicionando-se 1ml da solução de cloreto de alumínio a

2% e completando-se o volume para 25ml em balão volumétrico com da solução metanólica de ácido acético a 5%.

#### **4.2.5.2.2. Extração por partição em solventes**

Tomou-se uma alíquota de 5 g das formulações. Dissolveu-se com ajuda do agitador magnético em 50ml de clorofórmio e colocou-se em funil de separação. Agitou-se e deixou-se em repouso por 20 minutos. Procedeu-se a separação e repetiu-se o procedimento mais 1 vez. Evaporou-se o solvente. Ressuspendeu-se em 10 ml da solução metanólica de ácido acético a 5%.

Esta solução foi utilizada para o doseamento espectrofotométrico de flavonóides totais, adicionando-se 1ml da solução de cloreto de alumínio a 2% e completando-se o volume para 25ml em balão volumétrico com da solução metanólica de ácido acético a 5%.

#### **4.2.5.3. Extração de flavonóides totais a partir dos géis**

##### **4.2.5.3.1. Extração por coluna**

Pesaram-se 2g do gel e sua estrutura foi desfeita com ácido acético (3 gotas). Diluiu-se em 10ml de clorofórmio. Montou-se a coluna em clorofórmio e colocou-se a amostra. Procedeu-se 3 lavagens com 20 ml de clorofórmio (fase eluente 1). Eluiu-se 4 vezes com a fase móvel benzeno: acetato de etila: ácido fórmico (36:12:5) (fase eluente 2). Eluiu-se por mais 4 vezes com metanol (fase eluente 3). As fases eluentes foram evaporadas e ressuspensas em 10 ml da solução metanólica de ácido acético a 5%.

Esta solução foi utilizada para o doseamento espectrofotométrico de flavonóides totais adicionando-se 1ml da solução de cloreto de alumínio a 2% e completando-se o volume para 25ml em balão volumétrico com da solução metanólica de ácido acético a 5%.

#### **4.2.5.3.2. Extração por partição em solvente**

Tomou-se uma alíquota de 5 g das formulações. Dissolveu-se com ajuda do agitador magnético em 50ml de água destilada e colocou-se em funil de separação com 50ml de clorofórmio; agitou-se e deixou-se em repouso por 20 minutos. Procedeu-se a separação e repetiu-se o procedimento mais 1 vez. Evaporou-se o solvente. Ressuspendeu-se em 10 ml da solução metanólica de ácido acético a 5%.

Esta solução foi utilizada para o doseamento espectrofotométrico de flavonóides totais adicionando-se 1ml da solução de cloreto de alumínio a 2% e completando-se o volume para 25ml em balão volumétrico com da solução metanólica de ácido acético a 5%.

#### **4.2.5.4. Teste de recuperação da quercetina**

Formulações similares às já descritas (emulsões e géis) foram preparadas com quantidade exatamente conhecida de quercetina a concentração de 0,2%. Em seguida estas foram submetidas aos mesmos processos extrativos descritos (coluna e partição) e calculados os respectivos teores de recuperação para cada método.

#### **4.2.5.5. Controle dos processos extrativos**

A eficiência dos processos extrativos foi acompanhada pela técnica de cromatografia em camada delgada, descrita anteriormente, e por doseamento espectrofotométrico. Brancos das preparações, representados por formulações sem a incorporação dos princípios ativos foram utilizados para estudo da interferência dos excipientes no processo extrativo.

## Esquema da extração por coluna

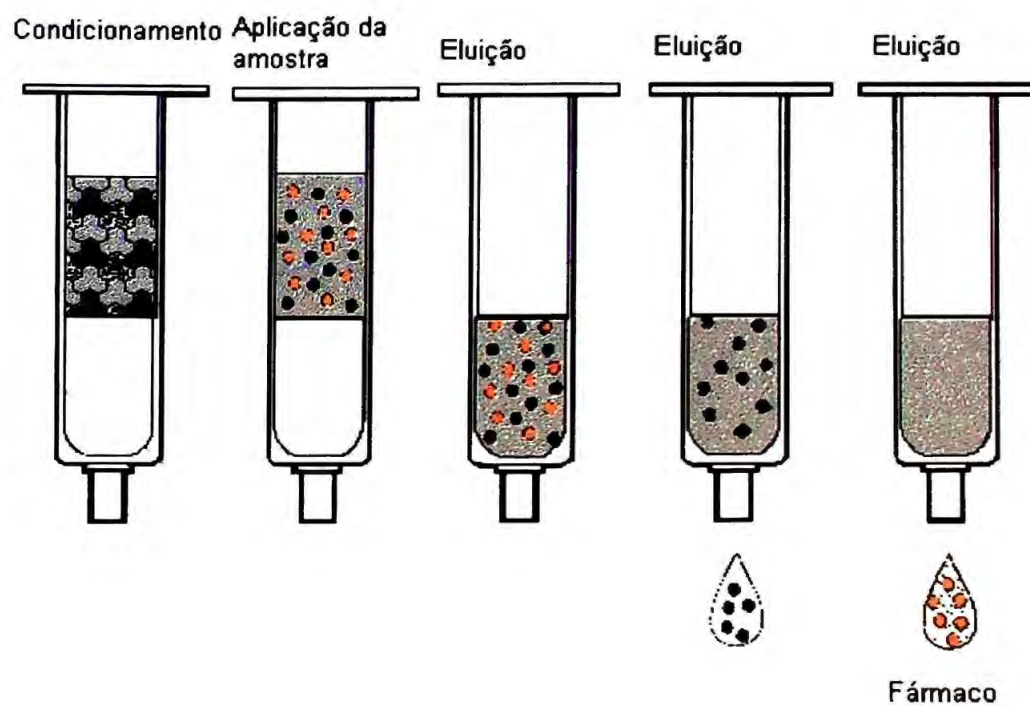


Figura 16 - Esquema da extração por coluna das formulações.

#### 4.2.5. Estabilidade

Nos testes de estabilidade avaliaram-se em condições específicas e controladas o comportamento das formulações quanto à capacidade de manter o aspecto original (cor, odor, extrato importante para formulações de uso científico/potência) além das características físicas e químicas dos produtos.

##### 4.2.5.1. Estabelecimento de protocolos para estudo de estabilidade

###### 4.2.5.1.1. Tipo de embalagem

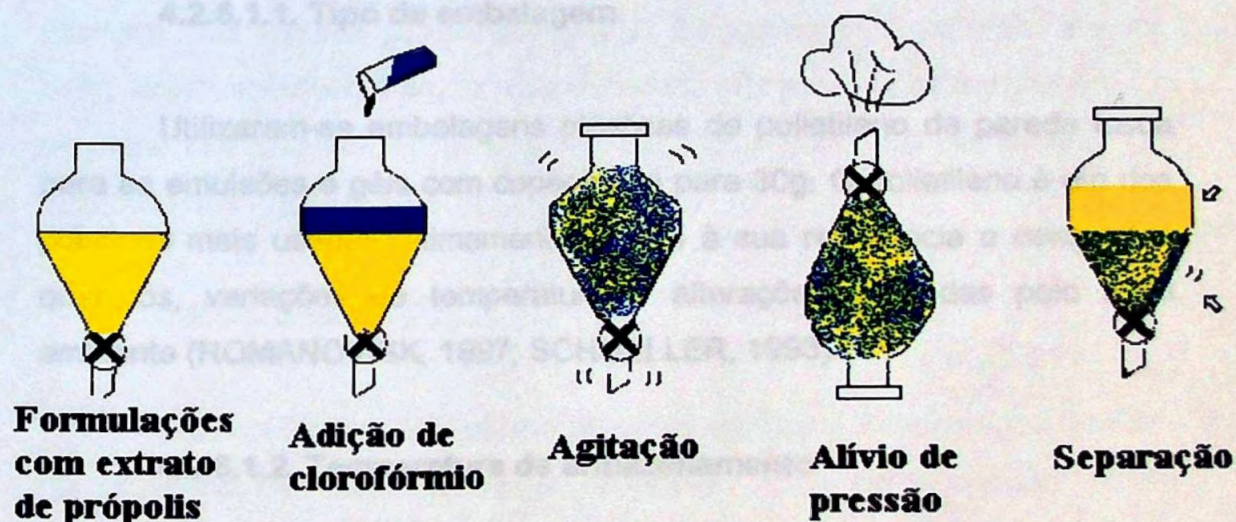


Figura 17 – Esquema da extração por partição das formulações.

## **4.2.6. Estabilidade**

Nos testes de estabilidade avaliou-se, em condições específicas e controladas de temperatura, luz e embalagem e comportamento das formulações quanto à capacidade de manter o aspecto original (fator de extrema importância para formulações de uso cosmético potencial) além das características físicas e químicas dos produtos.

### **4.2.6.1. Estabelecimento de protocolos para estudo de estabilidade**

#### **4.2.6.1.1. Tipo de embalagem**

Utilizaram-se embalagens plásticas de polietileno de parede fosca para as emulsões e géis com capacidade para 30g. O polietileno é um dos plásticos mais usados ultimamente devido à sua resistência a compostos químicos, variações de temperatura e alterações induzidas pelo meio ambiente (ROMANOVISK, 1997; SCHUELLER, 1993).

#### **4.2.6.1.2. Temperatura de armazenamento**

As formulações foram armazenadas em 4 temperaturas diferentes: -4°C, 22°C, 35°C e 45°C. Utilizou-se ampla variação de temperatura devido a maior gama de informações que pode ser coletada nestas condições, como mudança da viscosidade, alteração do coeficiente de solubilidade dos princípios ativos entre as fases, fusão e congelamento de vários materiais (IDSON, 1993).

#### **4.2.6.1.3. Tempo de duração do estudo**

O estudo de estabilidade foi conduzido por período de 90 dias.

#### **4.2.6.1.4. Frequência de amostragem**

As alíquotas foram recolhidas em 5 tempos distintos:  $t_0$  - 48h após a preparação da formulação;  $t_1$  - 15 dias após preparação;  $t_2$  - 30 dias após a preparação;  $t_3$  - 60 dias após a preparação e  $t_4$  - 90 dias após a preparação.

#### **4.2.6.2. Padronização dos testes de estabilidade física**

##### **4.2.6.2.1. Análise organoléptica**

As amostras foram analisadas após exposição às condições de estresse nos tempos pré-estabelecidos. Observou-se a variação de cor, odor, espalhabilidade e separação de fases, 48h após a preparação e após permanência por até 90 dias a  $-4$ , 22, 35 e 45°C. Os resultados são descritos nas Tabelas 13 a 17.

##### **4.2.6.2.2. pH**

Determinou-se o pH utilizando-se peagômetro, em amostras diluídas na proporção de 1:10 em água destilada. Para cada amostra foram realizadas três determinações, apresentando o desvio padrão da leitura.

##### **4.2.6.2.3. Centrifugação**

O teste de centrifugação foi realizado com objetivo de observar-se a possível separação de fases quando as formulações fossem submetidas a alteração da força de gravidade. Recolheram-se 5g das amostras e submeteu-se à força de 3000 rpm por 30 minutos (IDSON, 1993; RIEGER, 1991). Os resultados estão descritos na Tabela 18.

#### **4.2.6.2.4. Comportamento reológico e viscosidade**

Realizaram-se as análises à temperatura ambiente, utilizando-se 13g das amostras. Utilizou-se viscosímetro rotacional Brookfield para pequenos volumes. Submeteram-se as amostras aos seguintes gradientes de velocidade: 0,5; 1,0; 2,5; 10,0; 20; 50 e 100,0. Procedeu-se a leitura e registro dos valores a cada 2 minutos.

A viscosidade aparente (naap) foi registrada na velocidade de cisalhamento 2,5 (1/S), ascendente. Os valores estão representados nas Figuras 32 a 37.

#### **4.2.6.2.5. Observação microscópica**

As emulsões macroscopicamente estáveis foram submetidas à análise microscópica para verificação da homogeneidade, tamanho das partículas, assim como a formação de cristais líquidos, fatores essenciais para caracterização de formulações estáveis e indicativos de instabilidade das mesmas (KLEIN, 1984). Colocou-se em uma lâmina de vidro pequena quantidade de amostra e observou-se a aparência microscópica das mesmas, registrando-se fotograficamente os resultados que estão apresentados nas Figuras 38 a 43.

### **4.2.6.3. Testes para avaliação da estabilidade química**

#### **4.2.6.3.1. Doseamento dos princípios ativos**

Nos tempos pré-determinados as formulações foram submetidas ao processo extrativo pela partição em solvente e subsequente doseamento dos princípios ativos. Os resultados estão apresentados nas Figuras 44 a 49.

#### **4.2.7. Cálculo da velocidade de decaimento dos teor de flavonóides totais das formulações**

A partir dos valores do teor de princípios ativos doseados em tempos pré-determinados, foi calculada a constante específica de decaimento da reação (K), em cada temperatura a que estas foram submetidas.

#### **4.2.8. Perfil de liberação “in vitro”**

Avaliou-se a liberação “in vitro” dos flavonóides a partir das formulações contendo 10% do extrato de própolis. Utilizou-se aparelho de dissolução com compartimento para géis/emulsões, separado do líquido receptor (etanol 70%) por membrana de acetato de celulose de espessura de  $0,022 \pm 0,004$  mm. Manteve-se o experimento a 32°C e rotação constante de 55 rpm. Coletaram-se alíquotas de 3ml de 1 em 1 hora durante 12 horas, repondo-se igual volume de etanol 70% ao meio receptor a fim de manter constante seu volume.

#### **4.2.9. Análise estatística**

Os resultados obtidos foram comparados pela análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de análise múltipla Student – Newman – Keuls, para determinar-se o nível de significância das variáveis.

## **5. RESULTADOS**

## 5.1. Caracterização das amostras de própolis bruta

### 5.1.1. Análise organoléptica

Na Tabela 5 são apresentados os resultados da avaliação dos caracteres físicos das amostras de própolis utilizadas no trabalho e na Tabela 6 os resultados da abordagem fitoquímica realizada com o intuito de caracterizar quimicamente as amostras de própolis e identificar os grupos químicos presentes.

Tabela 5 – Avaliação organoléptica e macroscópica das amostras de própolis.

<b>Amostras</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Cor</b>	<b>Odor</b>	<b>Impurezas</b>
01	Placas uniformes	Marrom amarelado	Característico	Ausente
02	Placas uniformes	Marrom amarelado	Característico	Ausente
03	Farpas uniformes	Marrom	Característico	Ausente
04	Escamas	Marrom escuro	Característico	Ausente
05	Escamas e placas	Marrom	Característico	Sim (serragem)
06	Farpas	Marrom escuro	Característico	Ausente
07	Blocos	Marrom amarelado	Característico	Sim (pólen)
08	Grãos	Marrom	Não agradável	Ausente
09	Grãos	Marrom amarelado	Característico	Sim (farpas de madeira)

### 5.1.2. Análise fitoquímica

Tabela 6 - Grupos químicos identificados pela triagem fitoquímica, nas amostras de própolis de diferentes procedências.

Amostras	Grupo Químico						
	Flavonóides		Taninos		Derivados		
	Gálicos	Catequínicos	Saponinas	Antraquinônicos	Alcalóides		
1	+	-	+	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-	-
3	+	-	+	-	-	-	-
4	+	-	+	-	-	-	-
5	+	-	+	-	-	-	-
6	+	-	-	-	-	-	-
7	+	-	-	-	-	-	-
8	+	+	+	-	-	-	-
9	+	-	-	-	-	-	-

(+) - presença.

(-) - ausência

### 5.1.3. Teor de cinzas

A Tabela 7 apresenta o resultado da determinação do teor de cinzas das amostras de própolis bruta determinando-se assim as substâncias inorgânicas presentes em cada uma destas.

Tabela 7 - Teor de cinzas totais das amostras de própolis bruta analisadas

Amostra	Teor de Cinzas	
	Vm	$\sigma$
1	1,3	(0,01)
2	2,8	(0,01)
3	1,5	(0,02)
4	1,2	(0,02)
5	3,2	(0,01)
6	2,3	(0,01)
7	1,8	(0,02)

Legenda:

Vm - Valor médio de três determinações

$\sigma$  - desvio padrão.

## 5.2. Caracterização dos extratos glicólicos de própolis

A Tabela 8 mostra os resultados dos testes procedidos no extrato para caracterização dos aspectos descritos no item 4.2.1 e 4.2.3.

Tabela 8 - Caracterização dos extratos glicólicos de própolis, obtidos a partir de amostras de própolis (I a VII) de diferentes procedências

Análise *	Extrato						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
<b>pH</b>	4,81 (0,01)	4,78 (0,01)	4,79 (0,01)	4,91 (0,03)	4,82 (0,02)	4,43 (0,02)	4,66 (0,00)
<b>Resíduo seco (%)</b>	98,6 (0,01)	99,2 (0,01)	98,9 (0,02)	99,3 (0,01)	98,9 (0,01)	99,1 (0,01)	99,2 (0,01)
<b>Densidade</b>	1,06 (0,02)	1,06 (0,01)	1,06 (0,01)	1,09 (0,01)	1,07 (0,01)	1,06 (0,01)	1,07 (0,01)
<b>Teor alcóolico</b>	2,00 (0,01)	2,00 (0,01)	2,00 (0,01)	10,0 (0,01)	10,0 (0,01)	5,0 (0,01)	5,0 (0,01)
<b>Teor de flavonóides (% quercetina)</b>	3,84 (0,01)	4,31 (0,02)	3,37 (0,01)	3,56 (0,02)	1,09 (0,02)	0,78 (0,01)	4,87 (0,01)

\* Valor médio de três determinações e desvio padrão.

A Tabela 9 apresenta os flavonóides identificados por cromatografia em camada delgada e seus respectivos Rfs, utilizando-se como fase móvel benzeno: acetato de etila: ácido fórmico (36:12:05).

Tabela 9 - Flavonóides detectados por cromatografia em camada delgada nos extratos glicólicos e respectivos valores de Rf.

Amostra	Flavonóides Identificados	Rf
Extrato I	Crisina / Quercetina	0,45 / 0,16
Extrato II	Apigenina / Crisina / Quercetina	0,23 / 0,45 / 0,16
Extrato III	Apigenina / Crisina / Quercetina	0,23 / 0,45 / 0,16
Extrato IV	Apigenina / Crisina / Quercetina	0,23 / 0,45 / 0,16
Extrato V	Apigenina / Crisina	0,23 / 0,45
Extrato VI	Canferol / Crisina Quercetina	0,32 / 0,45 / 0,16
Extrato VII	Apigenina / Canferol / Quercetina	0,23 / 0,32 / 0,16

Condições:

Suporte: Placa de silicagel AL TLC 20 x 20 cm, 60F 254 (Merck)

Amostra: Extrato glicólico de própolis

Migração: 10cm a 25°C

### 5.3. Doseamento espectrofotométrico dos flavonóides

#### 5.3.1. Padronização do método de doseamento de flavonóides totais

A padronização do método de análise de flavonóides totais foi realizada através de parâmetros que permitiram avaliar as possibilidades de aplicabilidade do método nas nossas condições de trabalho. A Figura 18 mostra a determinação do comprimento de onda máximo para leitura da quercetina no visível, após reação com cloreto de alumínio.

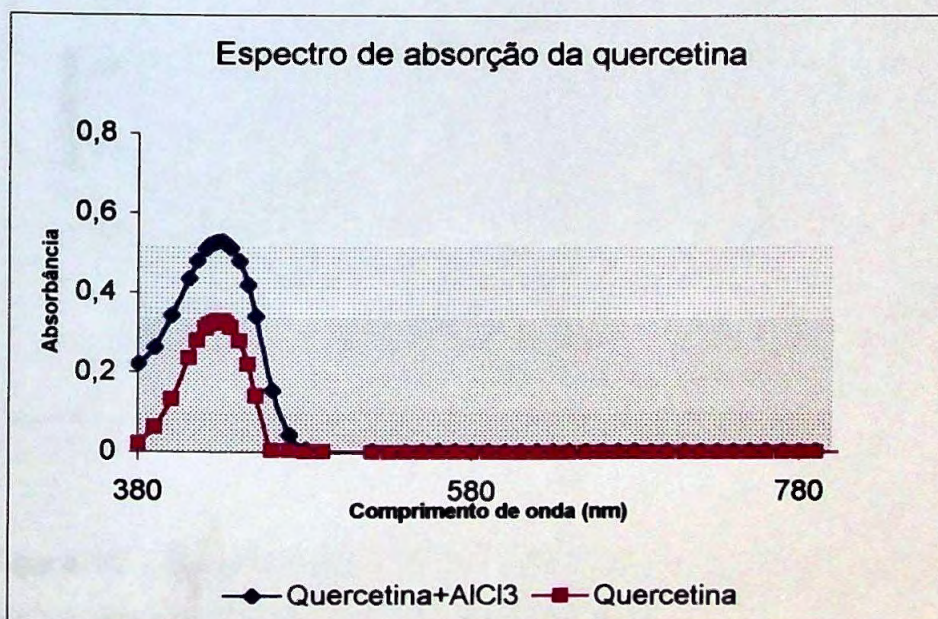


Figura 18 – Determinação do  $\lambda$  de máxima absorbância, para leitura do complexo da quercetina após reação com o cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>).

A Figura 19 mostra o comportamento do branco (solvente x reagente) utilizado no doseamento espectrofotométrico dos flavonóides totais, nos diferentes comprimentos de onda, mostrando a ausência de absorção que pudesse interferir no doseamento dos princípios ativos.

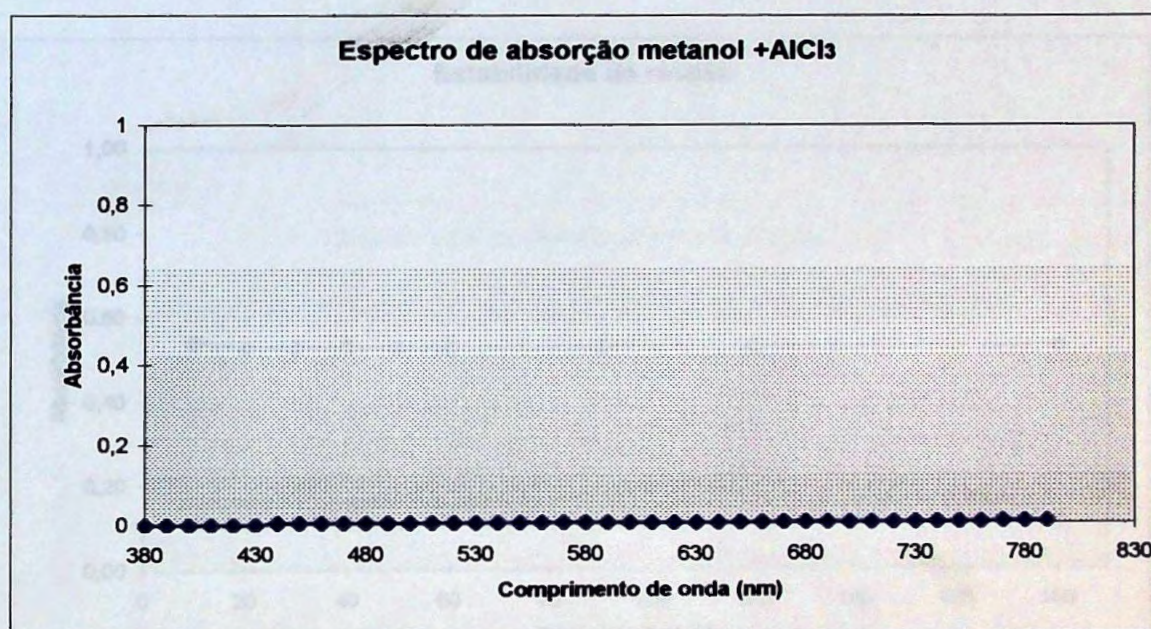


Figura 19 - Espectro de absorção da solução de metanol e cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>), em diferentes comprimentos de onda.

### 5.3.2. Curva de calibração da quercetina

A Figura 20 mostra a estabilidade das leituras de absorvância do complexo formado pela reação da quercetina e o cloreto de alumínio ( $AlCl_3$ ), através da medida do complexo formado. Pode-se observar a ausência de alteração das leituras no decorrer do tempo, até 3 horas.

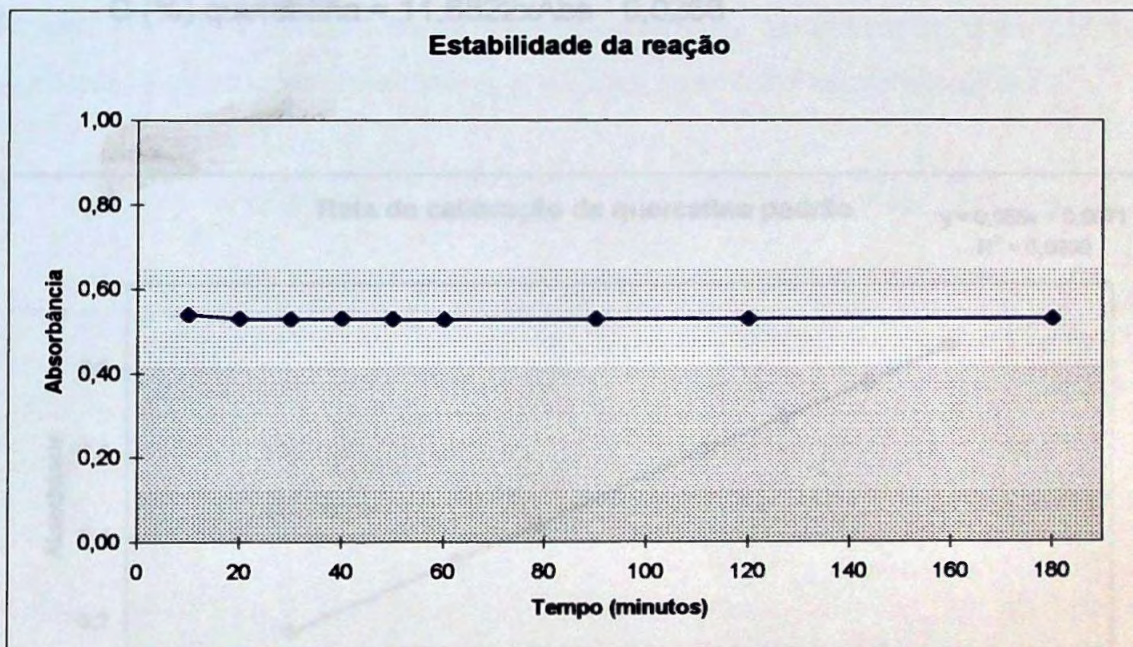


Figura 20 - Estabilidade da reação da quercetina padrão com cloreto de alumínio, determinada a 415nm, em função do tempo.

### 5.3.2. Curva de calibração da quercetina

A curva de calibração da quercetina foi construída utilizando-se soluções metanólicas de quercetina nas concentrações de 2,0 à 10,0 µg/ml. Observando-se comportamento linear e calculando-se o correspondente coeficiente de correlação linear (Figura 21). A partir desta relação obteve-se a equação que descreve o cálculo da concentração de flavonóides totais expressa em quercetina:

$$C (\%) \text{ quercetina} = 11,6822 \times \text{Abs} - 0,0268$$

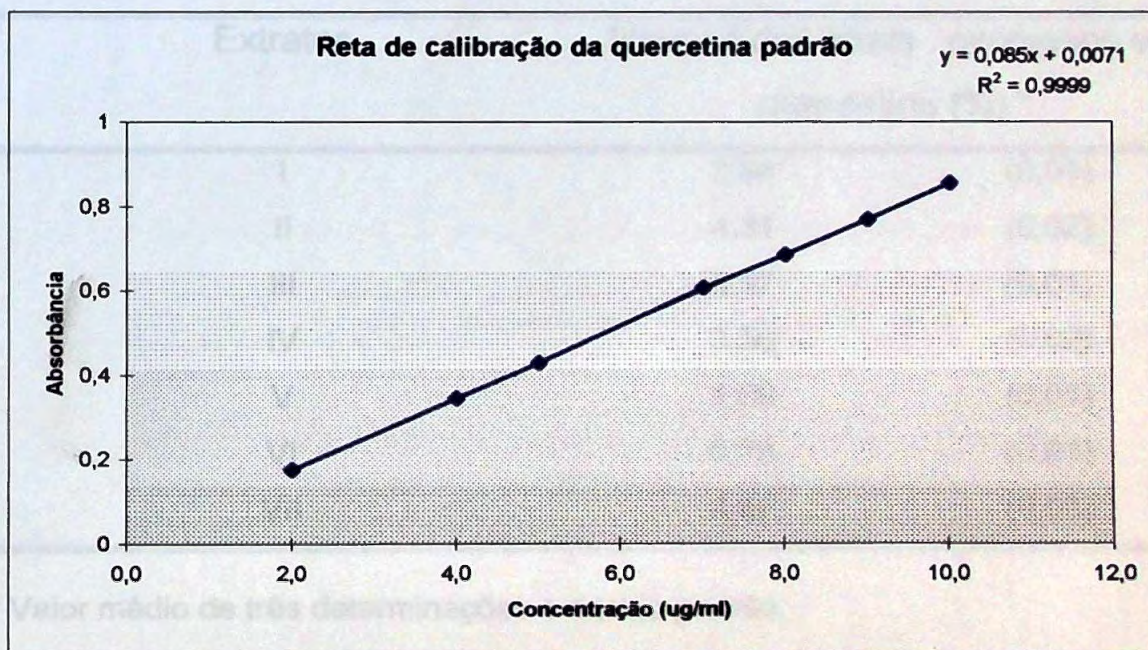


Figura 21 - Reta de calibração do padrão de quercetina em solução metanólica, obtida pela reação colorimétrica com cloreto de alumínio, a 415nm.

### 5.3.3. Análise das amostras de própolis

#### 5.3.3.1. Teor de flavonóides totais expressos em quercetina nas amostras analisadas.

As concentrações de flavonóides totais foram calculadas a partir da equação da reta de calibração. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 10.

Tabela 10 - Teor percentual de flavonóides totais, após reação com cloreto de alumínio, expresso em quercetina, a 415nm, nos extratos glicólicos a 20%.

Extratos	Flavonóides totais , expressos em quercetina (%) *	
I	3,84	(0,01)
II	4,31	(0,02)
III	3,37	(0,01)
IV	3,56	(0,02)
V	1,09	(0,01)
VI	0,78	(0,01)
VII	4,87	(0,01)

\* Valor médio de três determinações e desvio padrão.

### 5.3.3.2. Espectro de absorção dos extratos de própolis

A Figura 22 exibe os perfis de absorbância nos diferentes comprimentos de onda de amostras dos diferentes extratos glicólicos de própolis após reação com cloreto de alumínio.

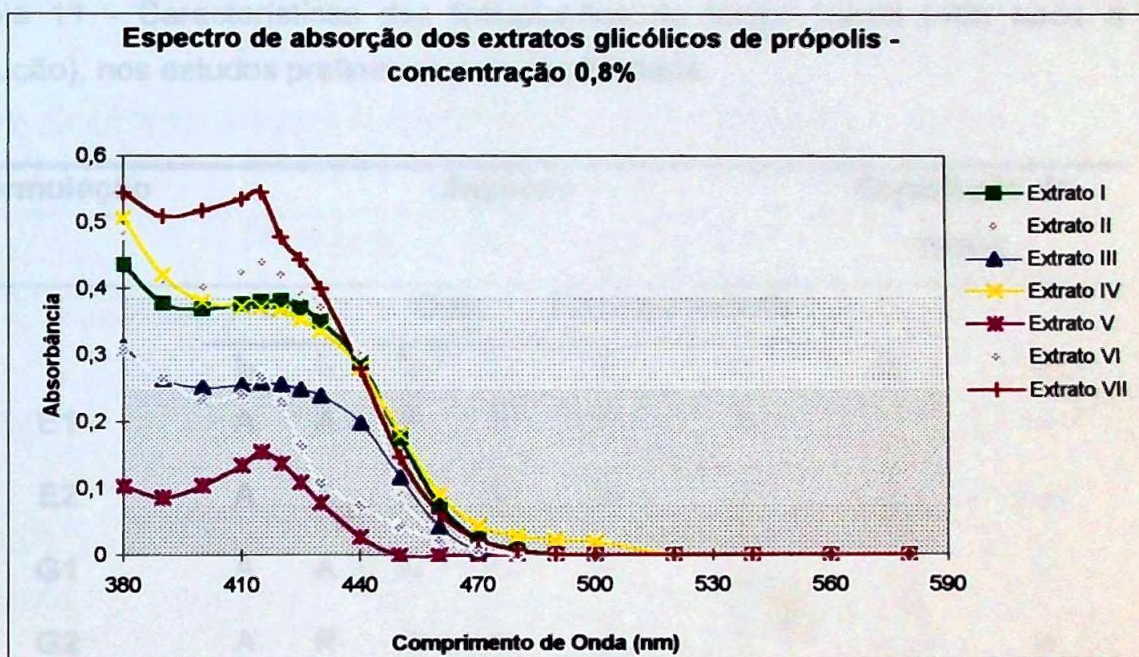


Figura 22 - Espectro de absorção dos extratos glicólicos de própolis, após reação com cloreto de alumínio em solução metanólica a 0,8%

#### 5.4. Estudos preliminares de estabilidade das formulações elaboradas.

As características das emulsões e géis elaboradas conforme item 4.2.4., são descritas na Tabela 11, analisadas 48 horas após a preparação ( $t_0$ ) e 30 dias após a preparação ( $t_1$ ).

Tabela 11 - Características das formulações no tempo inicial (48h após a produção), nos estudos preliminares de estabilidade.

Formulação	Aspecto						Separação de fases	
	Cor		Odor		Homogeneidade		$t_0$	$t_1$
	$t_0$	$t_1$	$t_0$	$t_1$	$t_0$	$t_1$		
<b>E1</b>	A	A	A	A	A	A	-	-
<b>E2</b>	A	A	A	A	A	I	-	+
<b>G1</b>	A	A	A	A	A	A	-	-
<b>G2</b>	A	R	A	A	A	I	-	+

Em que:

E1 – emulsão iônica

E2 – emulsão não iônica

G1 – gel iônico

G2 – gel não iônico

A – adequado

I - inadequado

(-) – não ocorreu separação de fases

(+) – ocorreu separação de fases

## 5.5. Avaliação da metodologia extrativa

### 5.5.1. Teores percentuais dos processos extrativos.

Na Tabela 12 pode-se visualizar os teores percentuais de recuperação de cada método empregado para extração dos princípios ativos nos extratos glicólicos e das formulações através das técnicas descritas no item 4.2.5, em coluna e por partição.

Tabela 12 - Percentual de recuperação nas técnicas extrativas utilizadas.

Percentual de recuperação *					
Extrato glicólico		Emulsão		Gel	
EC	EP	EC	EP	EC	EP
65,0	99,5	57,0	99,6	63,9	99,2
(±0,02)	(± 0,01)	(± 0,01)	(± 0,02)	(±0,01)	(±0,01)

\* Valor médio de três determinações e desvio padrão.

Em que:

EC – Extração por coluna

EP – Extração por partição

### 5.5.2. Interferência dos componentes das formulações (sem princípios ativos) submetidas ao doseamento espectrofotométrico.

Na Figura 23 pode-se visualizar o comportamento dos brancos das formulações em emulsão e gel submetidas ao processo de extração por partição, reação com cloreto de alumínio e posterior varredura espectrofotométrica para determinação de possíveis interferentes no doseamento dos princípios ativos.

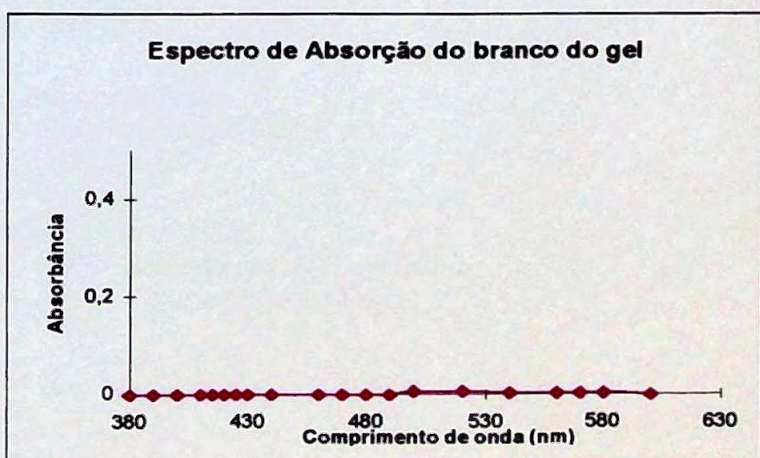
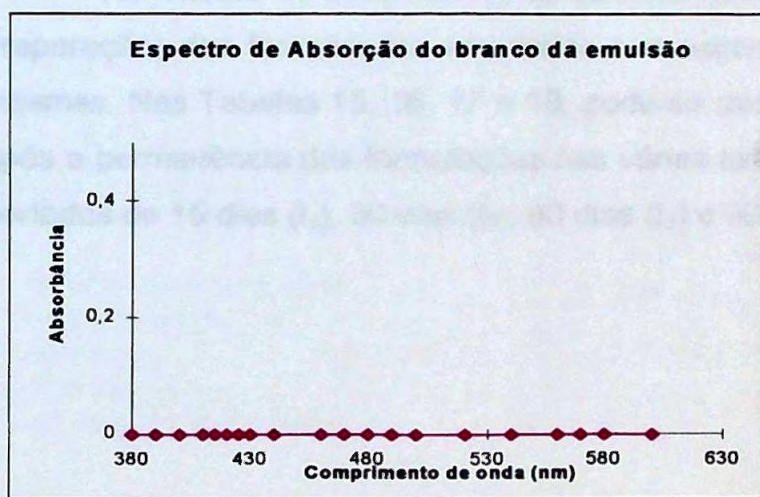


Figura 23 – Espectro de absorção dos brancos das formulações, quando submetidas à extração por solvente e reação com  $AlCl_3$ .

## **5.6. Avaliação da estabilidade das formulações**

### **5.6.1. Análise macroscópica e organoléptica**

Nos intervalos de tempo pré-determinados as formulações foram submetidas às análises para avaliação de estabilidade.

Na Tabela 13 observam-se as características iniciais (48 horas após a preparação) das formulações estudadas e o aspecto considerado padrão das mesmas. Nas Tabelas 15, 16, 17 e 18, pode-se observar os resultados obtidos após a permanência das formulações nas várias temperaturas, analisadas após períodos de 15 dias ( $t_1$ ), 30 dias ( $t_2$ ), 60 dias ( $t_3$ ) e 90 dias ( $t_4$ ).

Tabela 13 - Análise sensorial das formulações no  $t_0$ , 48h após fabricação.

Formulação	Aspecto analisado			
	Cor	Odor	Homogeneidade	Sep. de fases
E 5%	1	—	—	—
E 10%	2	—	—	—
E 15%	3	—	—	—
G 5%	1	—	—	—
G 10%	2	—	—	—
G 15%	3	—	—	—

**Cor:**

- 1 - levíssimo amarelo claro
- 2 - amarelo claro
- 3 - amarelo
- 4 - amarelo escuro
- 5 - amarelo amarronzado

**Odor:**

- (-) - característico
- (+) - alteração

**Homogeneidade**

- (-) - Não houve alteração
- (+) - cremação

**Separação de fases**

- (-) - Não houve separação de fases.
- (+) - Houve separação de fases

E 5% - emulsão a 5%

E 10% - emulsão a 10%

E15% - emulsão a 15%

G 5% - gel a 5%

G 10% - gel a 10%

G 15% - gel a 15%.

Tabela 14 - Análise sensorial das formulações quando submetidas à temperatura de -4°C, após períodos de tempo (t) variados.

Formulação	Aspecto analisado															
	C	O	H	S/ F	C	O	H	S/ F	C	O	H	S/ F	C	O	H	S/ F
	t <sub>1</sub>				t <sub>2</sub>				t <sub>3</sub>				t <sub>4</sub>			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E 5%	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-
E 10%	2	-	-	-	2	-	-	-	2	-	-	-	2	-	-	-
E 15%	3	-	-	-	3	-	-	-	3	-	-	-	3	-	-	-
G 5%	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-
G 10%	2	-	-	-	2	-	-	-	2	-	-	-	2	-	-	-
G 15%	3	-	-	-	3	-	-	-	3	-	-	-	3	-	-	-

C - cor

O - odor

H - homogeneidade

S. F. - separação de fases

Cor:

1 - levíssimo amarelo claro

2 - amarelo claro

3 - amarelo

4 - amarelo escuro

5 - amarelo amarronzado

Odor:

(-) - característico

(+) - alteração

(+) -

Homogeneidade

(-) - Não houve alteração

(+) - cremação

Separação de fases

(-) - Não houve separação de fases.

(+) - Houve separação de fases

Formulação:

E 5% - emulsão a 5%; E 10% - emulsão a 10%; E15% - emulsão a 15%

G 5% - gel a 5%; G 10% - gel a 10%; G 15% - gel a 15

t<sub>1</sub> - 15 dias

t<sub>2</sub> - 30 dias

t<sub>3</sub> - 60 dias

t<sub>4</sub> - 90 dias

Tabela 15 - Análise sensorial das formulações quando submetidas à temperatura de 22°C, após períodos de tempo (t) variados.

Formulação	Aspecto analisado															
	C	O	H	S/ F	C	O	H	S/ F	C	O	H	S/ F	C	O	H	S/ F
	t <sub>1</sub>				t <sub>2</sub>				t <sub>3</sub>				t <sub>4</sub>			
E 5%	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-
E 10%	2	-	-	-	2	-	-	-	2	-	-	-	2	-	-	-
E 15%	3	-	-	-	3	-	-	-	3	-	-	-	3	-	-	-
G 5%	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-
G 10%	2	-	-	-	2	-	-	-	2	-	-	-	2	-	-	-
G 15%	3	-	-	-	3	-	-	-	3	-	-	-	3	-	-	-

C- cor  
O - odor  
H - homogeneidade  
S. F. - separação de fases

Cor:  
1 - levíssimo amarelo claro  
2 - amarelo claro  
3 - amarelo  
4 - amarelo escuro  
5 - amarelo amarronzado

Odor:  
(-) - característico  
(+) - alteração

Homogeneidade  
(-) - Não houve alteração

(+) - cremação

Separação de fases  
(-) - Não houve separação de fases.  
(+) - Houve separação de fases

Formulação:

E 5% - emulsão a 5%; E 10% - emulsão a 10%; E15% - emulsão a 15%  
G 5% - gel a 5%; G 10% - gel a 10%; G 15% - gel a 15%.

t<sub>1</sub> - 15 dias  
t<sub>2</sub> - 30 dias  
t<sub>3</sub> - 60 dias  
t<sub>4</sub> - 90 dias

Tabela 16 - Análise sensorial das formulações quando submetidas à temperatura de 35°C, após períodos de tempo (t) variados.

Formulação	Aspecto analisado															
	C	O	H	S/ F	C	O	H	S/ F	C	O	H	S/ F	C	O	H	S/ F
	t <sub>1</sub>				t <sub>2</sub>				t <sub>3</sub>				t <sub>4</sub>			
E 5%	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-
E 10%	2	-	-	-	2	-	-	-	2	-	-	-	2	-	-	-
E 15%	3	-	-	-	3	-	-	-	3	-	-	-	3	-	-	-
G 5%	1	-	-	-	1	-	-	-	2	-	-	-	1	-	-	-
G 10%	2	-	-	-	2	-	-	-	3	-	-	-	3	-	-	-
G 15%	3	-	-	-	3	-	-	-	4	-	-	-	4	-	-	-

C - cor  
O - odor  
H - homogeneidade  
S. F. - separação de fases

Cor:  
1 - levíssimo amarelo claro  
2 - amarelo claro  
3 - amarelo  
4 - amarelo escuro  
5 - amarelo amarronzado

Odor:  
(-) - característico  
(+) - houve alteração

Homogeneidade  
(-) - Não houve separação de fases  
(+) - cremação

Separação de fases  
(-) - Não houve separação de fases.  
(+) - Houve separação de fases

Formulação:

E 5% - emulsão a 5%; E 10% - emulsão a 10%; E15% - emulsão a 15%  
G 5% - gel a 5%; G 10% - gel a 10%; G 15% - gel a 15%

t<sub>1</sub> - 15 dias  
t<sub>2</sub> - 30 dias  
t<sub>3</sub> - 60 dias  
t<sub>4</sub> - 90 dias

Tabela 17 - Análise sensorial das formulações. quando submetidas à temperatura de 45°C, após períodos de tempo(t) variados.

Formulação	Aspecto analisado															
	C O H S/ F				C O H S/ F				C O H S/ F				C O H S/ F			
	t <sub>1</sub>				t <sub>2</sub>				t <sub>3</sub>				t <sub>4</sub>			
	C	O	H	S/ F	C	O	H	S/ F	C	O	H	S/ F	C	O	H	S/ F
E 5%	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-
E 10%	2	-	-	-	2	-	-	-	2	-	-	-	2	-	-	+
E15%	3	-	-	-	3	-	-	-	3	-	-	-	3	-	-	+
G 5%	1	-	-	-	2	-	-	-	3	-	-	-	3	-	-	-
G 10%	2	-	-	-	3	-	-	-	4	-	-	-	4	-	-	-
G 15%	3	-	-	-	4	-	-	-	5	-	-	-	5	-	-	-

C - cor  
O - odor  
H - homogeneidade  
S. F. - separação de fases

Cor:

1 - levíssimo amarelo claro  
2 - amarelo claro  
3 - amarelo  
4 - amarelo escuro  
5 - amarelo amarronzado

Odor:

(-) - característico  
(+) - houve alteração

Homogeneidade

(-) - Não houve alteração

(+) - cremação

Separação de fases

(-) - Não houve separação de fases.

(+) - Houve separação de fases

Formulação:

E 5% - emulsão a 5%; E 10% - emulsão a 10%; E15% - emulsão a 15%

G 5% - gel a 5%; G 10% - gel a 10%; G 15% - gel a 15%

t<sub>1</sub> - 15 dias

t<sub>2</sub> - 30 dias

t<sub>3</sub> - 60 dias

t<sub>4</sub> - 90 dias

### **5.6.2. Avaliação da separação de fases das formulações.**

Na Tabela 18 observa-se o comportamento das formulações quando submetidas ao teste de aceleração da gravidade (centrifugação), nos tempos pré-determinados (2, 15, 30, 60 e 90 dias) após permanência as temperaturas de -4, 22, 35 e 45°C.

Tabela 18 - Observação da separação de fases das formulações quando submetidas à centrifugação (3000 rpm por 30 minutos), após exposição por diferentes intervalos de tempo e às diversas temperaturas.

Temperatura (°C)	tempo	Formulações					
		E 5%	E 10%	E 15%	G 5%	G 10%	G 15%
-4	t <sub>0</sub>	-	-	-	-	-	-
	t <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-
	t <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-
	t <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-
	t <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-
22	t <sub>0</sub>	-	-	-	-	-	-
	t <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-
	t <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-
	t <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-
	t <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-
35	t <sub>0</sub>	-	-	-	-	-	-
	t <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-
	t <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-
	t <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-
	t <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-
45	t <sub>0</sub>	-	-	-	-	-	-
	t <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-
	t <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-
	t <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	+*
	t <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	+*

Em que:

(-) - Não houve separação de fases.

(+) - Houve separação de fases

E 5% - emulsão a 5%; E 10% - emulsão a 10%; E15% - emulsão a 15%; G 5% -

gel a 5%; G 10% - gel a 10%; G 15% - gel a 15%.

t<sub>0</sub> - 48h; t<sub>1</sub> - 15 dias; t<sub>2</sub> - 30 dias; t<sub>3</sub> - 60 dias após; t<sub>4</sub> - 90 dias.

Obs: \* Alterações características de quebra da estrutura do gel

### **5.6.3. Avaliação do comportamento reológico.**

Nas Figuras 24 e 28 pode-se observar o comportamento reológico das formulações obtidas no tempo inicial, ou 48 horas após a preparação.

As Figuras 25, 26 e 27 apresentam o comportamento reológico das emulsões com 5, 10 e 15% de extrato de própolis, no tempo final (90 dias), após permanência nas temperaturas de -4, 22, 35 e 45°C.

As Figuras 29, 30 e 31 apresentam o comportamento reológico dos géis com 5, 10 e 15% de extrato de própolis, no tempo final (90 dias), após permanência nas temperaturas de -4, 22, 35 e 45°C.

---

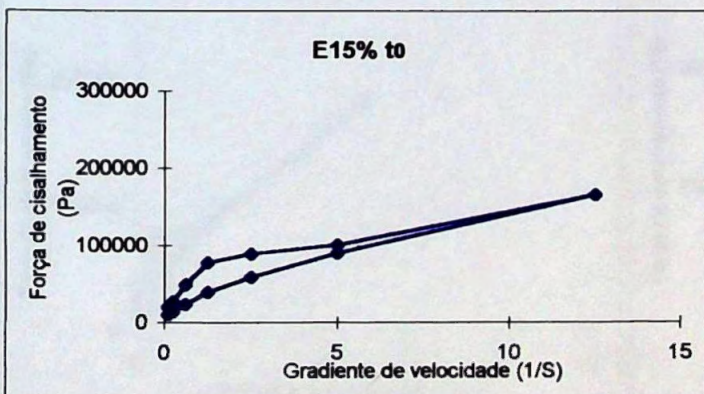
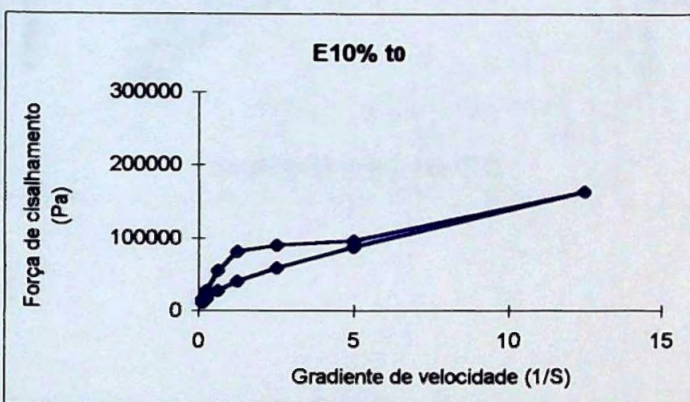
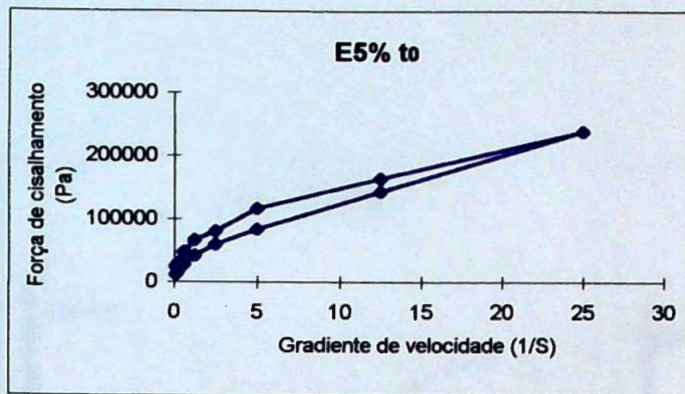


Figura 24 - Comportamento de reológico das emulsões 48h após o preparo (to), onde: E5% - emulsão a 5%; E10% - emulsão a 10% e E15% - emulsão a 15%.

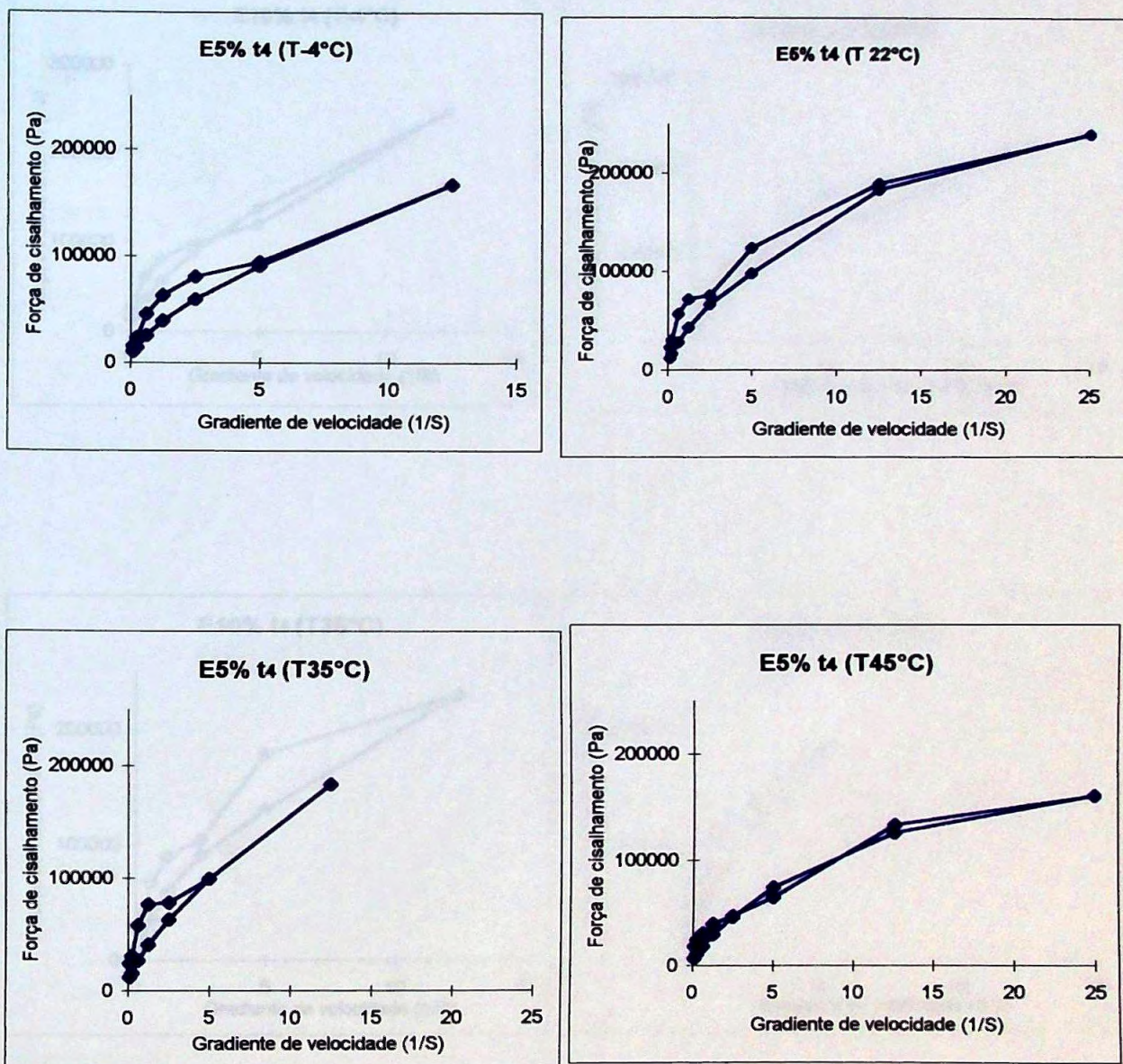


Figura 25 - Avaliação do comportamento reológico da emulsão a 5%, após permanência por 90 dias diversas temperaturas (-4, 22, 35 e 45°C).

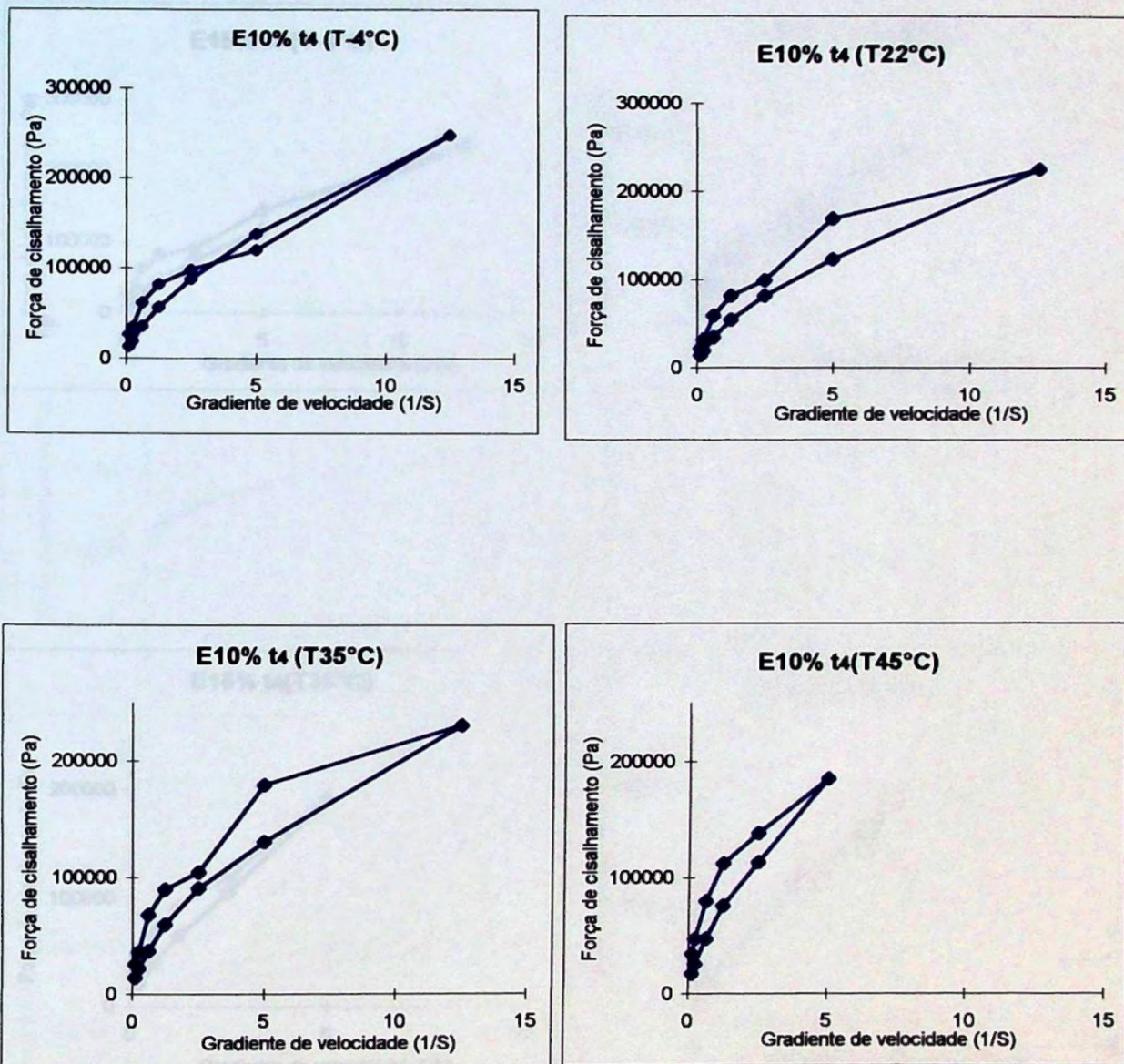


Figura 26 - Avaliação do comportamento reológico da emulsão a 10%, após permanência por 90 dias diversas temperaturas (-4, 22, 35 e 45°C).

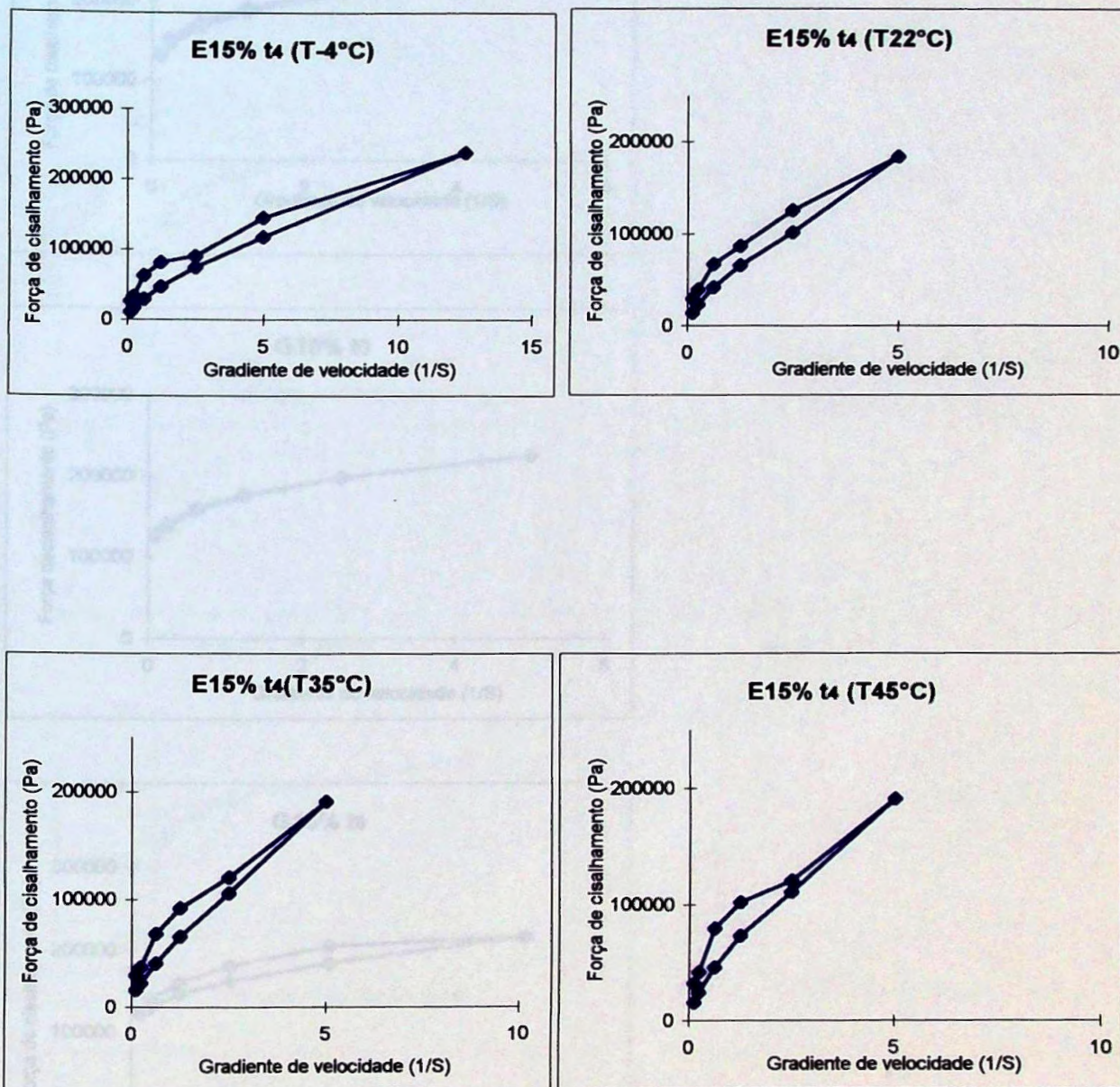


Figura 27 - Avaliação do comportamento reológico da emulsão a 15%, após permanência por 90 dias diversas temperaturas (-4, 22, 35 e 45°C).

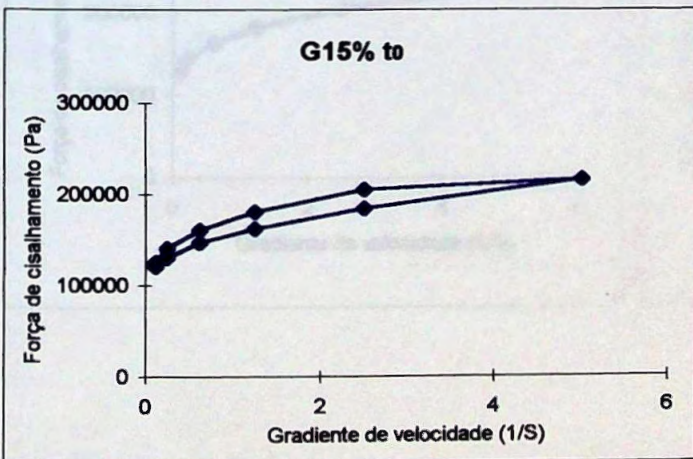
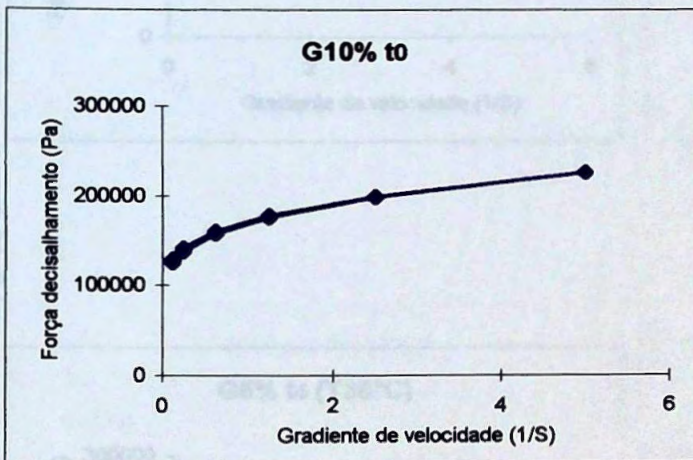
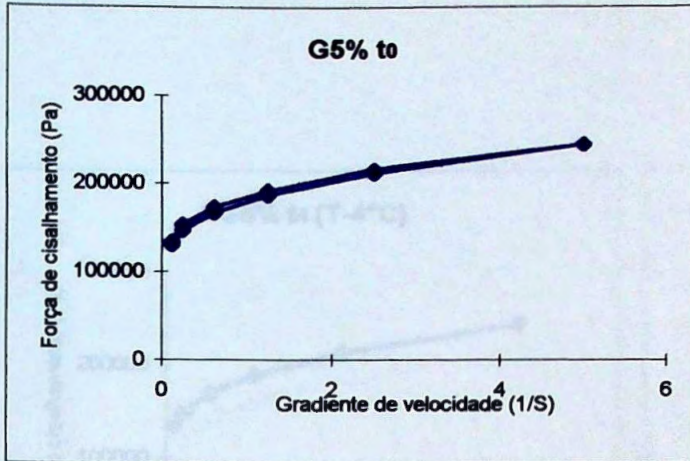
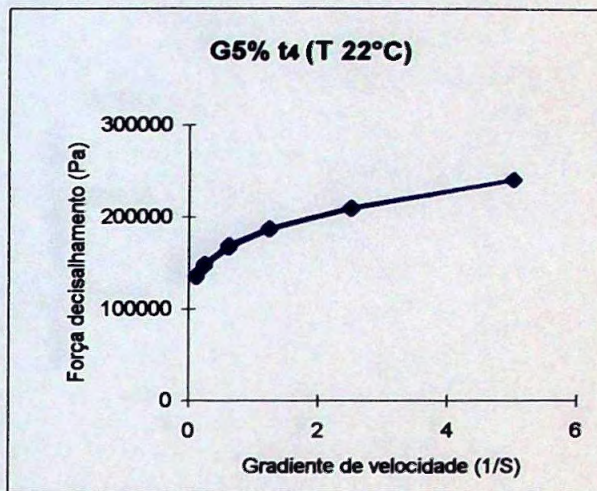
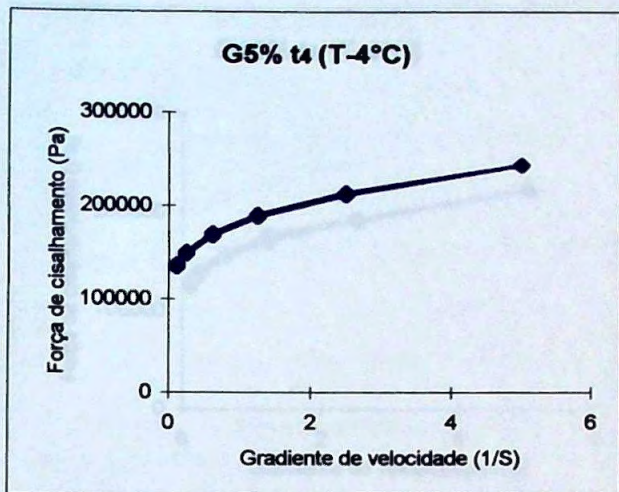


Figura 28 - Comportamento reológico dos géis 48h após o preparo (t0), onde: G5% - gel a 5%; G10% - gel a 10% e G15% - gel a 15%.



15985

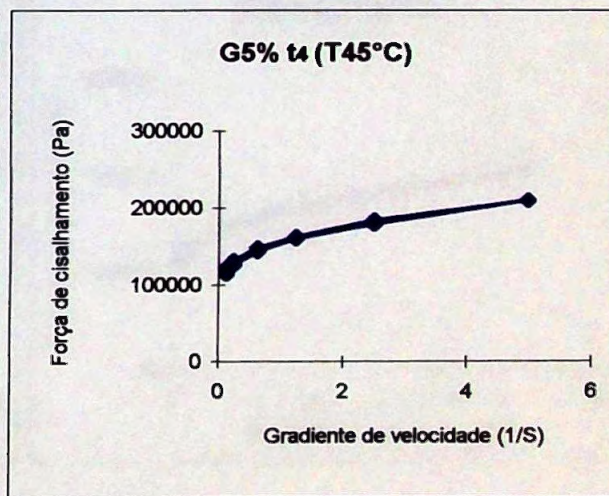
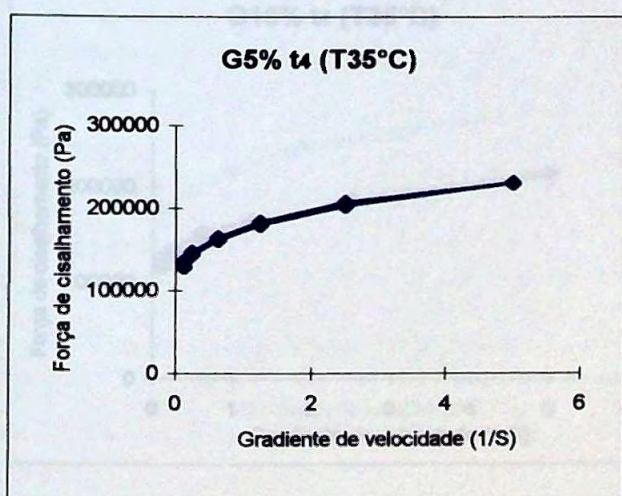


Figura 30 - Avaliação do comportamento reológico do gel a 5%, após permanência por 90 dias, em diversas temperaturas (-4, 22, 35 e 45°C).

Figura 29 - Avaliação do comportamento reológico do gel a 5%, após permanência por 90 dias, em diversas temperaturas (-4, 22, 35 e 45°C).

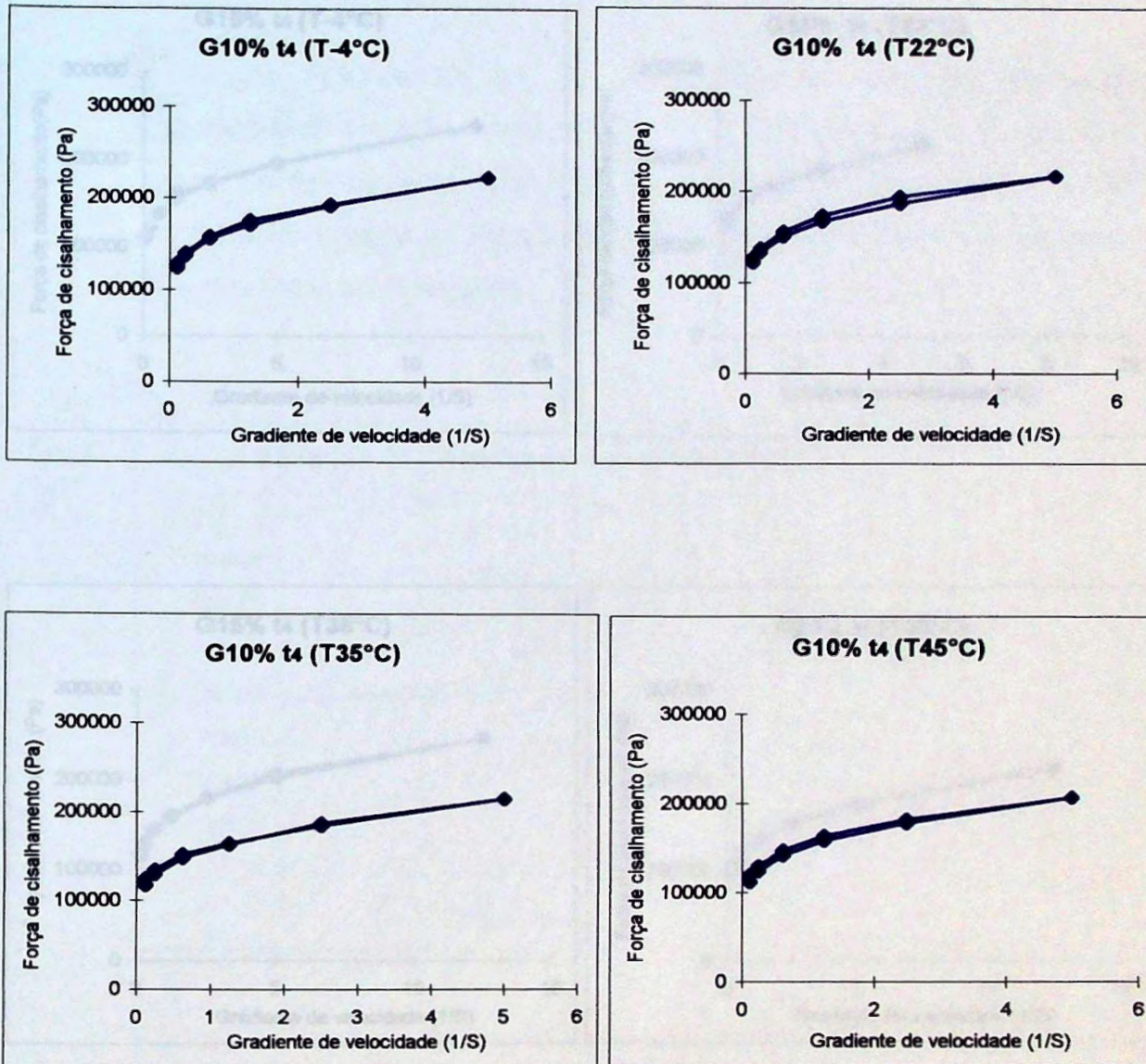


Figura 30 - Avaliação do comportamento reológico do gel a 10%, após permanência por 90 dias, em diversas temperaturas (-4, 22, 35 e 45°C).

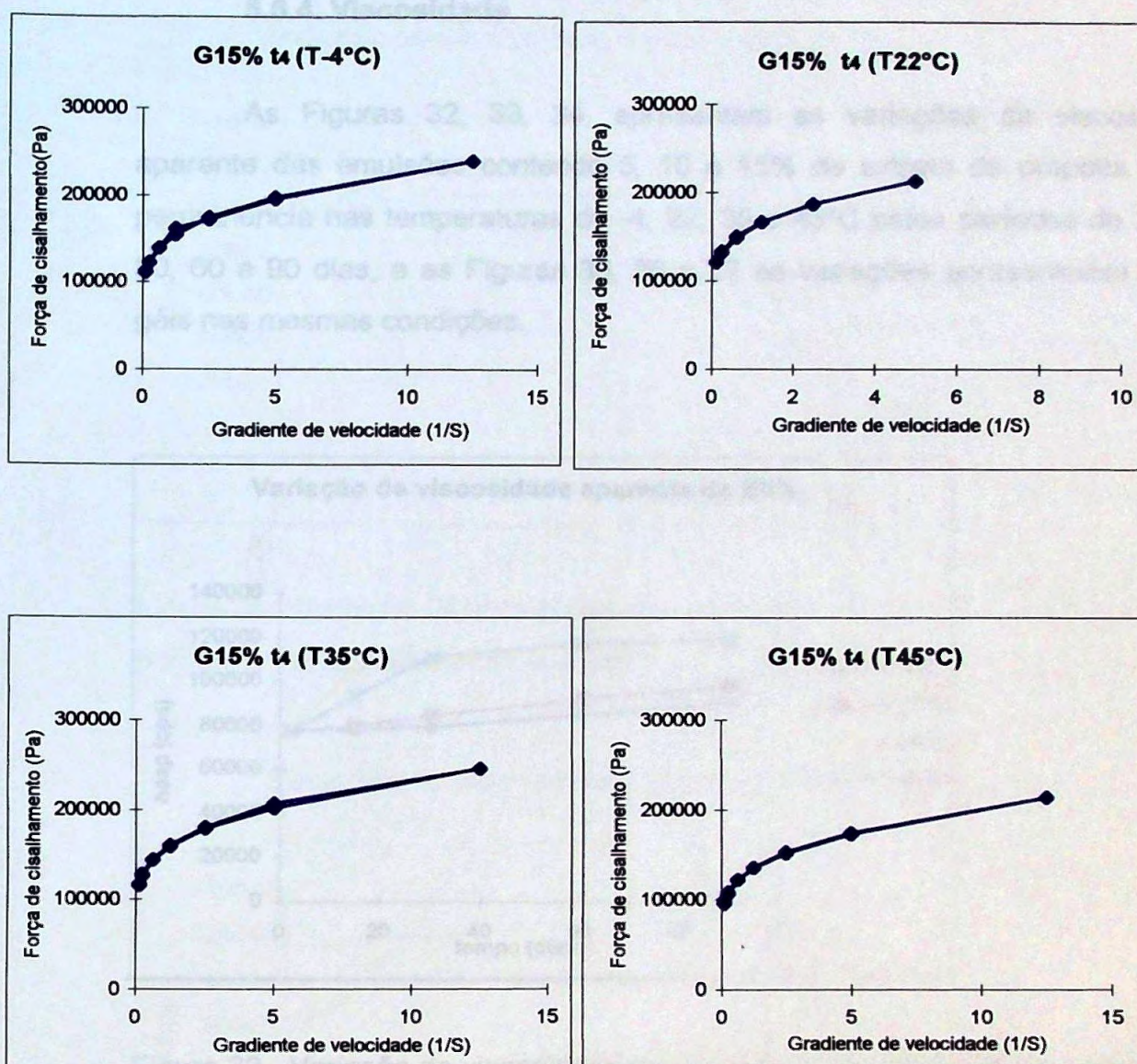


Figura 31 - Avaliação do comportamento reológico do gel a 15%, após permanência por 90 dias, em diversas temperaturas (-4, 22, 35 e 45°C).

#### 5.6.4. Viscosidade

As Figuras 32, 33, 34, apresentam as variações da viscosidade aparente das emulsões contendo 5, 10 e 15% de extrato de própolis, após permanência nas temperaturas de -4, 22, 35 e 45°C pelos períodos de 2, 15, 30, 60 e 90 dias, e as Figuras 35, 36 e 37 as variações apresentadas pelos géis nas mesmas condições.

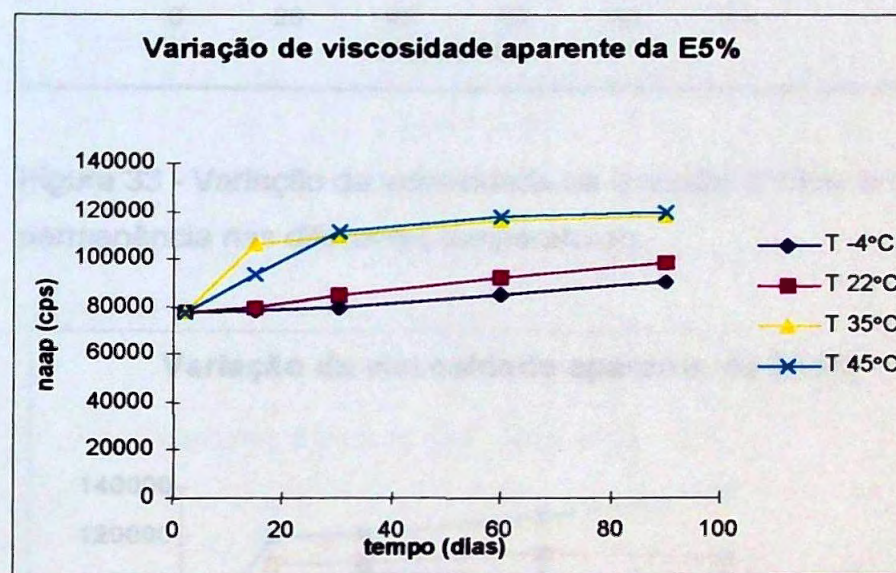


Figura 32 - Variação da viscosidade da emulsão a 5%, em função do tempo de permanência nas diferentes temperaturas.

Figura 34 - Variação da viscosidade da emulsão a 15%, em função do tempo de permanência nas diferentes temperaturas.

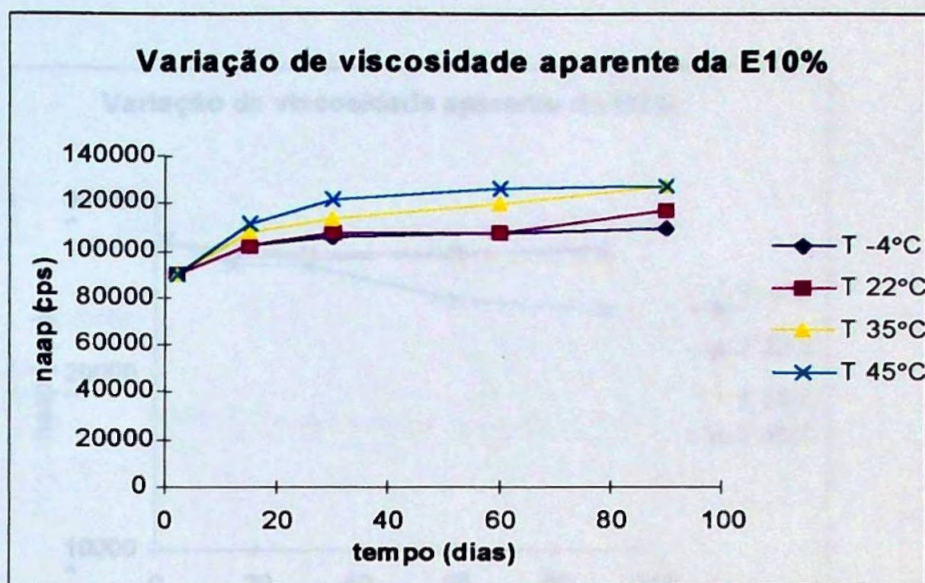


Figura 33 - Variação da viscosidade da emulsão a 10%, em função do tempo de permanência nas diferentes temperaturas.

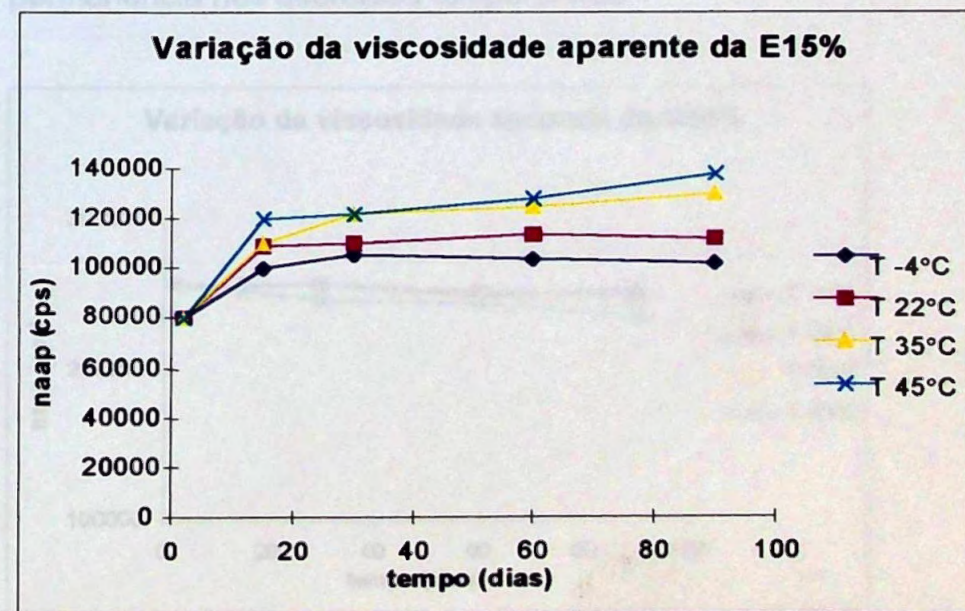


Figura 34 - Variação da viscosidade da emulsão a 15%, em função do tempo de permanência nas diferentes temperaturas.

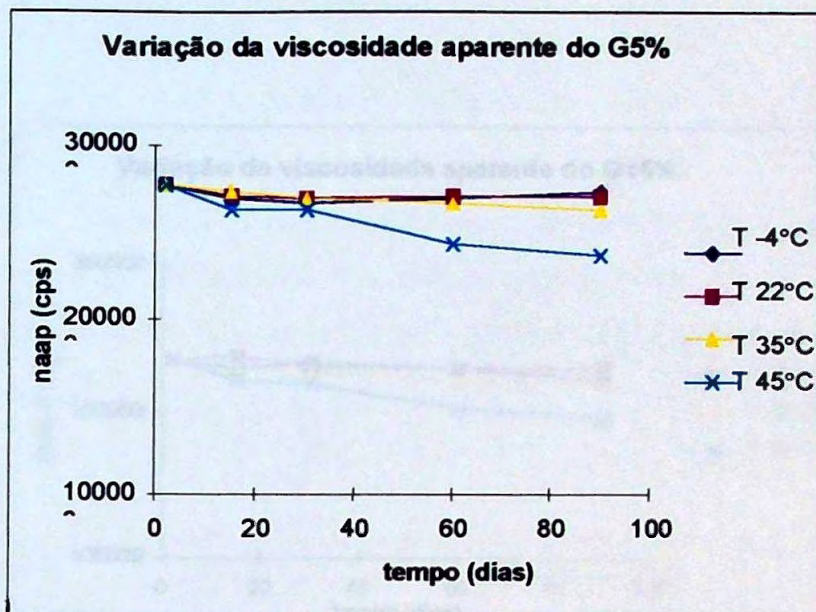


Figura 35 - Variação da viscosidade do gel a 5%, em função do tempo de permanência nas diferentes temperaturas.

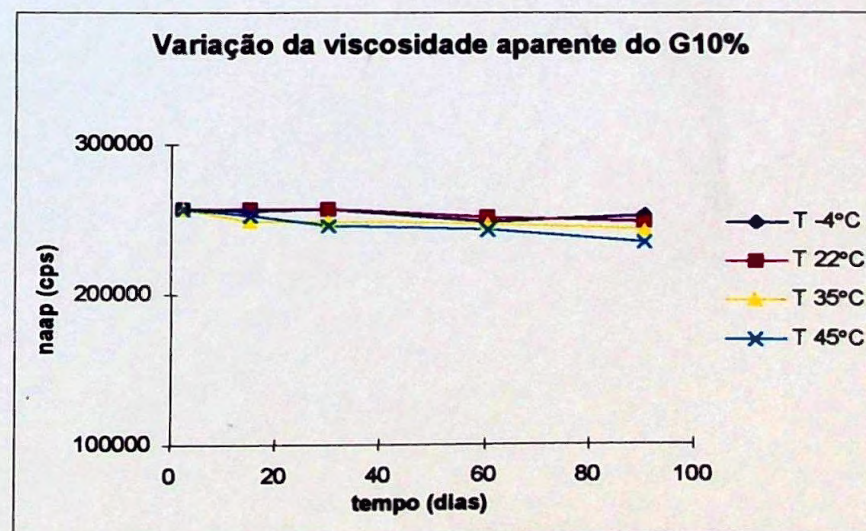


Figura 36 - Variação da viscosidade do gel a 10%, em função do tempo de permanência nas diferentes temperaturas.

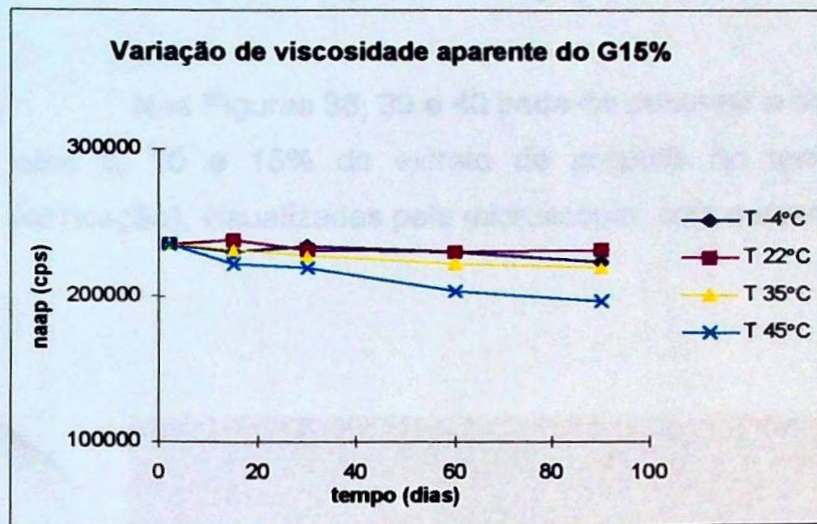


Figura 37 - Variação da viscosidade do gel a 15%, em função do tempo de permanência nas diferentes temperaturas.

### 5.6.5. Observação microscópica das emulsões

#### 5.6.5.1. Avaliação da homogeneidade

Nas Figuras 38, 39 e 40 pode-se observar a organização das emulsões com 5, 10 e 15% de extrato de própolis no tempo inicial (48h após a fabricação), visualizadas pela microscopia, com aumento de 200 vezes.

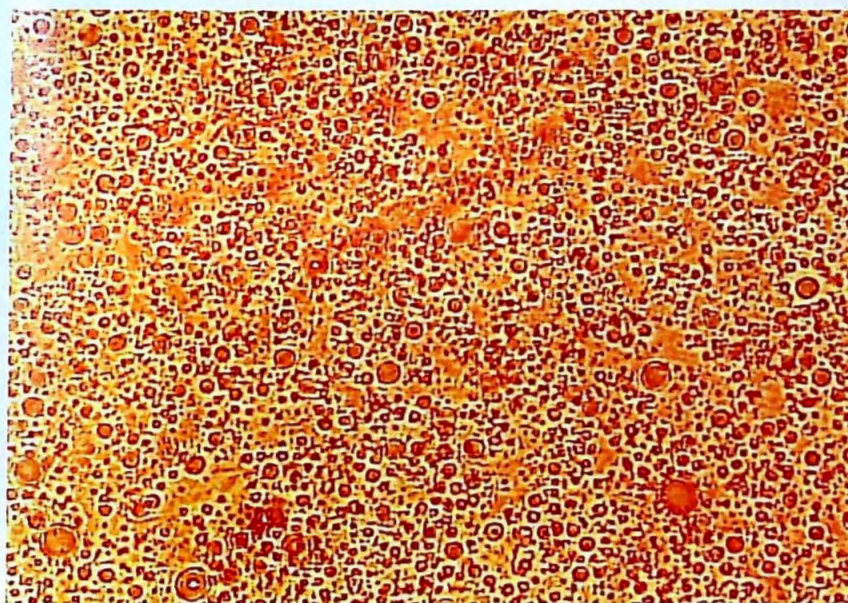


Figura 38 – Estrutura microscópica da emulsão com 5% do extrato de própolis, 48h após a preparação (aumento de 200 vezes).

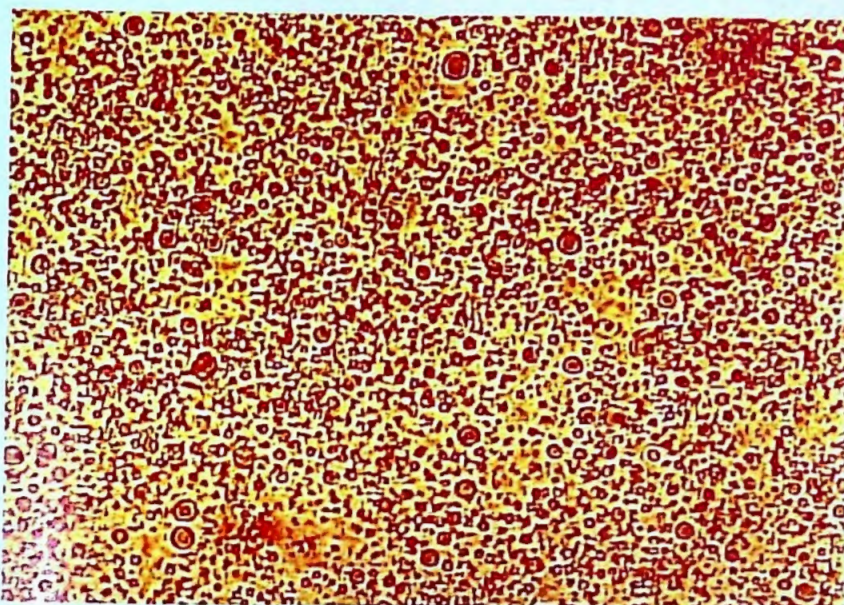


Figura 39 – Estrutura microscópica da emulsão com 10% do extrato de própolis, 48h após a preparação (aumento de 200 vezes).

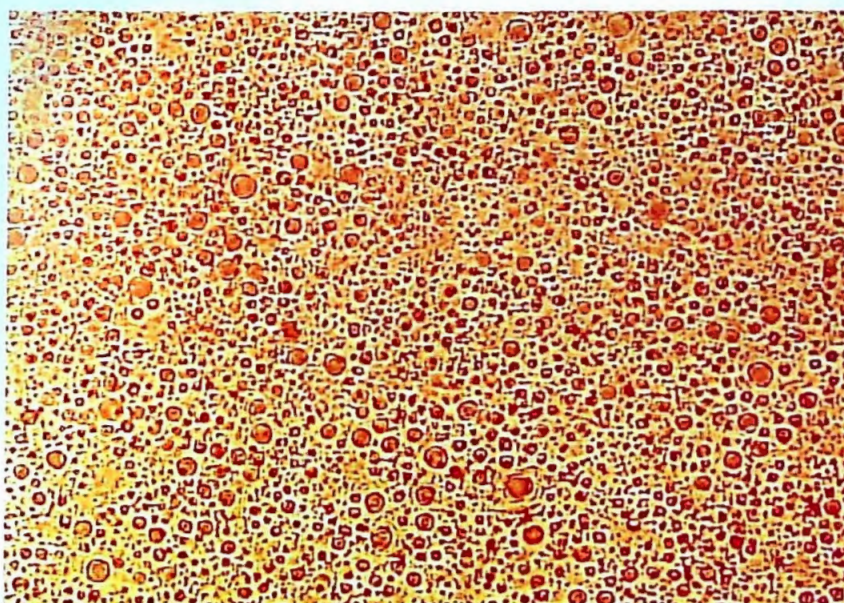


Figura 40 – Estrutura microscópica da emulsão com 15% do extrato de própolis, 48h após a preparação (aumento de 200 vezes).

#### 5.6.5.2. Avaliação da presença de cristais líquidos

Nas Figuras 41, 42 e 43 pode-se visualizar as estruturas denominadas cristais líquidos nas emulsões com 5, 10 e 15% de extrato de própolis no tempo inicial (48h após a fabricação).

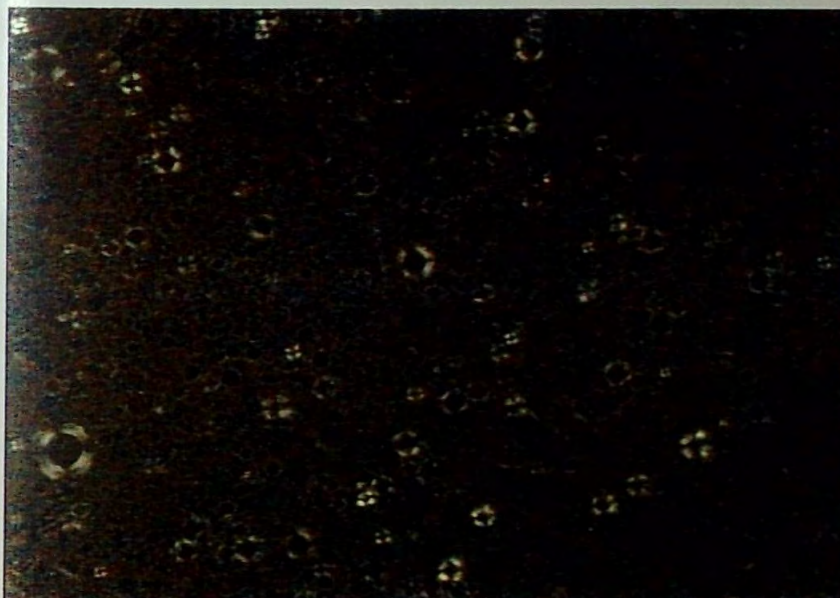


Figura 41 – Estruturas de cristais líquidos formados na emulsão contendo 5% do extrato de própolis, 48h após a preparação, observados microscopicamente, com aumento de 200 vezes.

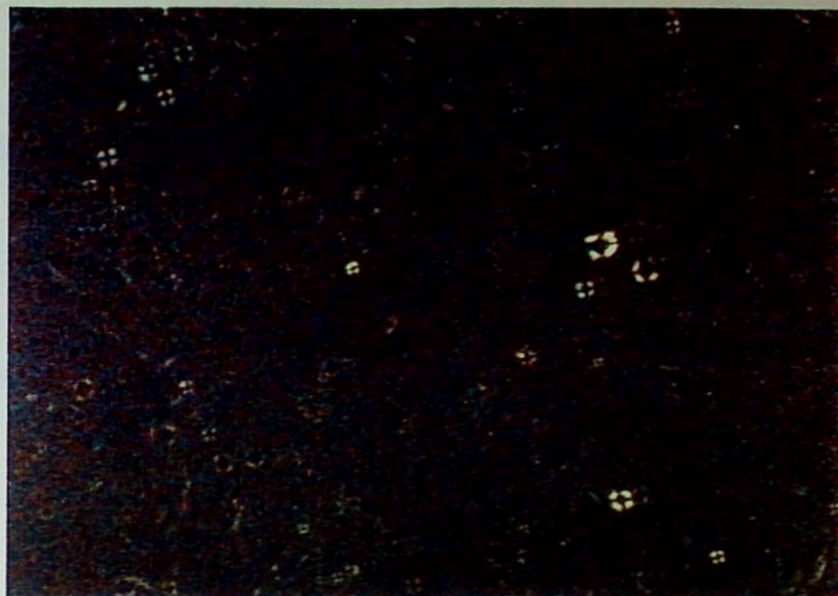


Figura 42 – Estruturas de cristais líquidos formados na emulsão contendo 10% do extrato de própolis, 48h após a preparação, observados microscopicamente, com aumento de 200 vezes.

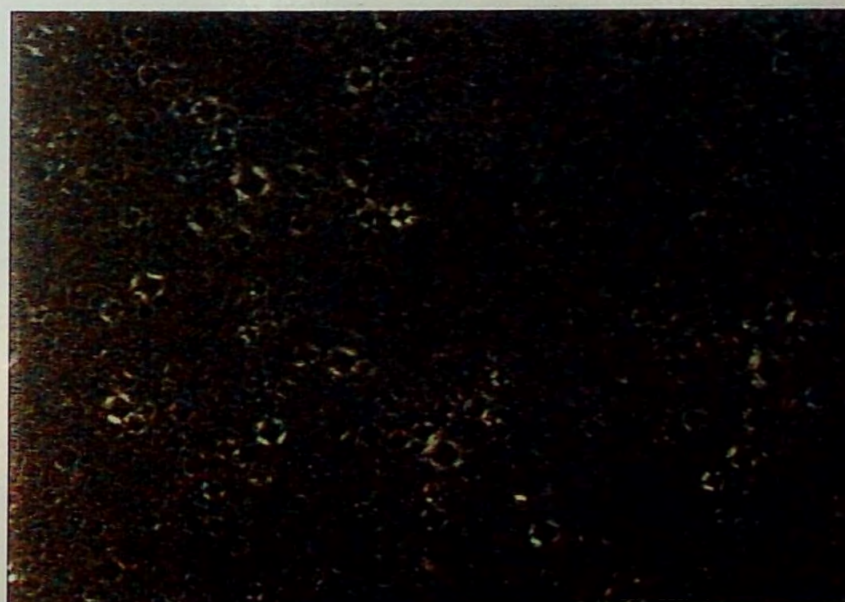


Figura 43 – Estruturas de cristais líquidos formados na emulsão contendo 15% do extrato de própolis, 48h após a preparação, observados microscopicamente, com aumento de 200 vezes.

#### **5.6.6. Variação de pH**

Nas Tabelas 19, 20, 21 e 22 podem ser visualizados os resultados dos valores de pH das formulações após 48h de preparação e 15, 30, 60 e 90 dias de permanência às temperaturas de -4, 22, 35 e 45°C.

Tabela 19 - Caracterização de pH das formulações, no tempo inicial ( $t_0$ ) e após permanência à temperatura  $-4^\circ\text{C}$ , por diferentes períodos de tempo

Formulação	pH									
	$T -4^\circ\text{C}$									
	$t_0$		$t_1$		$t_2$		$t_3$		$t_4$	
	Vm	$\sigma$	Vm	$\sigma$	Vm	$\sigma$	Vm	$\sigma$	Vm	$\sigma$
E 5%	5,2	0,06	5,1	0,00	5,0	0,02	5,0	0,02	5,2	0,01
E 10%	4,8	0,06	4,8	0,00	4,7	0,00	4,7	0,01	4,8	0,01
E 15%	4,6	0,01	4,6	0,00	4,6	0,00	4,6	0,00	4,6	0,00
G 5%	6,1	0,02	6,1	0,00	6,1	0,00	6,0	0,01	6,1	0,01
G 10%	6,1	0,01	6,1	0,01	6,1	0,01	6,1	0,01	6,1	0,00
G 15%	6,2	0,00	6,1	0,01	6,1	0,00	6,2	0,01	6,2	0,00

E 5% - emulsão a 5%; E 10% - emulsão a 10%; E 15% - emulsão a 15%; G 5% - gel a 5%; G 10% - gel a 10%; G 15% - gel a 15%.

$t_0$  - 48h;  $t_1$  - 15 dias;  $t_2$  - 30 dias;  $t_3$  - 60 dias;  $t_4$  - 90 dias.

Vm - valor médio de três determinações

$\sigma$  - desvio padrão

Tabela 20 - Caracterização de pH das formulações no tempo inicial ( $t_0$ ) e após permanência à temperatura 22°C, por diferentes períodos de tempo.

Formulação	pH											
	T 22°C											
	$t_0$		$t_1$		$t_2$		$t_3$		$t_4$		$t_4$	$\sigma$
	Vm	$\sigma$	Vm	$\sigma$	Vm	$\sigma$	Vm	$\sigma$	Vm	$\sigma$	Vm	$\sigma$
E 5%	5,2	0,06	5,2	0,00	5,1	0,00	5,1	0,00	5,1	0,00	5,1	0,02
E 10%	4,8	0,06	4,8	0,00	4,8	0,01	4,6	0,01	4,7	0,01	4,7	0,01
E 15%	4,6	0,01	4,6	0,05	4,6	0,00	4,6	0,00	4,6	0,00	4,6	0,00
G 5%	6,1	0,02	6,2	0,02	6,0	0,01	6,1	0,01	6,1	0,02	6,1	0,01
G 10%	6,1	0,01	6,1	0,01	6,1	0,01	6,1	0,01	6,1	0,01	6,1	0,01
G 15%	6,2	0,00	6,0	0,00	6,1	0,01	6,1	0,01	6,1	0,00	6,1	0,02

E 5% - emulsão a 5%; E 10% - emulsão a 10%; E 15% - emulsão a 15%; G 5% - gel a 5%; G 10% - gel a 10%; G 15% - gel a 15%.

$t_0$  - 48h;  $t_1$  - 15 dias;  $t_2$  - 30 dias;  $t_3$  - 60 dias;  $t_4$  - 90 dias.

Vm - valor médio de três determinações

$\sigma$  - desvio padrão

Tabela 21 - Caracterização de pH das formulações no tempo inicial ( $t_0$ ) e após permanência à temperatura 35°C, por diferentes períodos de tempo.

Formulação	pH											
	T 35°C											
	$t_0$		$t_1$		$t_2$		$t_3$		$t_4$		$V_m$	$\sigma$
E 5%	5,2	0,06	5,2	0,00	5,0	0,01	5,1	0,04	5,0	0,02	5,0	0,02
E 10%	4,8	0,06	4,8	0,00	4,7	0,00	4,6	0,02	4,6	0,04	4,6	0,04
E 15%	4,6	0,01	4,6	0,00	4,6	0,00	4,4	0,00	4,5	0,01	4,5	0,01
G 5%	6,1	0,01	6,0	0,01	6,0	0,00	6,0	0,02	6,0	0,01	6,0	0,01
G 10%	6,1	0,01	6,1	0,01	6,1	0,01	6,0	0,00	6,0	0,00	6,0	0,00
G 15%	6,2	0,00	6,1	0,03	6,2	0,00	6,1	0,01	6,0	0,01	6,0	0,01

E 5% - emulsão a 5%; E 10% - emulsão a 10%; E 15% - emulsão a 15%; G 5% - gel a 5%; G 10% - gel a 10%; G 15% - gel a 15%.

$t_0$  - 48h;  $t_1$  - 15 dias;  $t_2$  - 30 dias;  $t_3$  - 60 dias;  $t_4$  - 90 dias..

$V_m$  - valor médio de três determinações

$\sigma$  - desvio padrão

Tabela 22 - Caracterização de pH das formulações no tempo inicial ( $t_0$ ) e após permanência à temperatura 45°C, por diferentes períodos de tempo.

Formulação	pH											
	T 45°C											
	$t_0$		$t_1$		$t_2$		$t_3$		$t_4$		$V_m$	$\sigma$
E 5%	5,2	0,06	5,1	0,00	5,0	0,01	5,0	0,01	5,0	0,02	4,8	0,00
E 10%	4,8	0,06	4,8	0,00	4,7	0,02	4,6	0,00	4,4	0,01	4,4	0,01
E 15%	4,6	0,01	4,6	0,00	4,6	0,00	4,3	0,00	4,5	0,00	4,5	0,00
G 5%	6,1	0,01	6,0	0,01	6,0	0,01	6,0	0,01	5,9	0,00	5,9	0,00
G 10%	6,1	0,01	6,2	0,00	6,1	0,00	5,9	0,01	5,9	0,01	5,9	0,00
G15%	6,2	0,00	6,1	0,00	6,1	0,00	6,1	0,00	6,0	0,00	6,0	0,01

E 5% - emulsão a 5%; E 10% - emulsão a 10%; E15% - emulsão a 15%; G 5% - gel a 5%; G 10% - gel a 10%; G 15% - gel a 15%.

$t_0$  - 48h;  $t_1$  - 15 dias;  $t_2$  - 30 dias;  $t_3$  - 60 dias;  $t_4$  - 90 dias.

$V_m$  - valor médio de três determinações

$\sigma$  - desvio padrão

### 5.6.7. Avaliação da estabilidade química dos princípios ativos das formulações.

As Figuras 44, 45 e 46 representam graficamente a variação do teor de princípios ativos das emulsões com 5, 10 e 15% de extrato de própolis, respectivamente e as Figuras 44 a 46 representam graficamente a variação do teor de princípios ativos dos géis com 5, 10 e 15% de extrato de própolis, respectivamente.

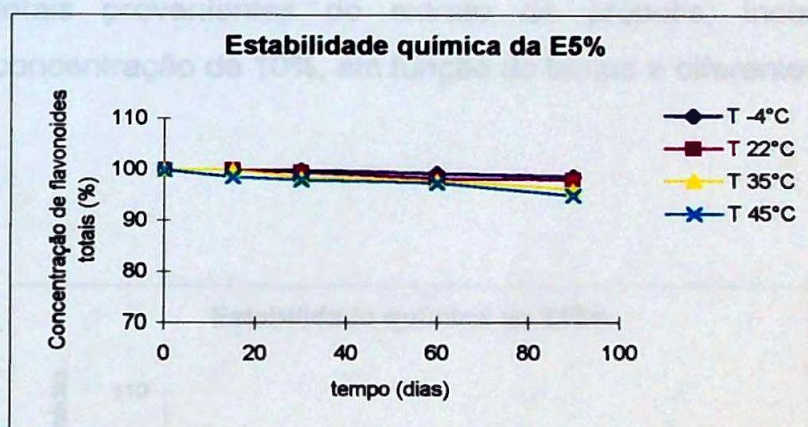


Figura 44 - Representação gráfica dos valores de concentração dos flavonóides totais provenientes do extrato de própolis, incorporado à emulsão na concentração de 5%, em função do tempo e diferentes temperaturas.

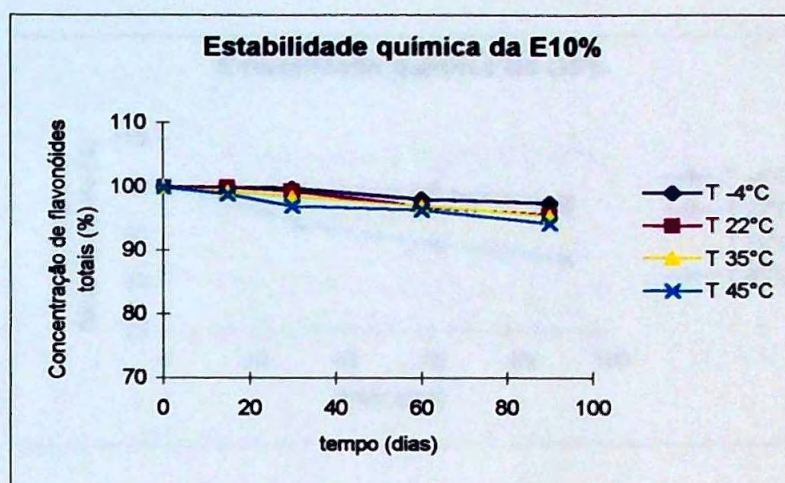


Figura 45 - Representação gráfica dos valores de concentração dos flavonóides totais provenientes do extrato de própolis, incorporado à emulsão na concentração de 10%, em função do tempo e diferentes temperaturas.

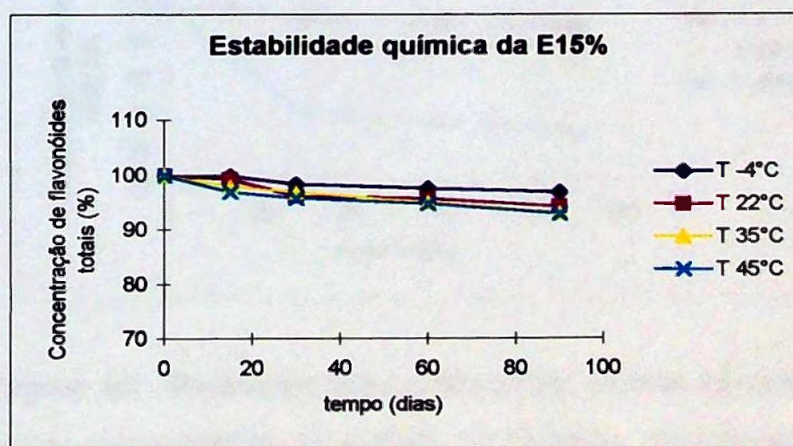


Figura 46 - Representação gráfica dos valores de concentração dos flavonóides totais provenientes do extrato de própolis, incorporado à emulsão na concentração de 15%, em função do tempo e diferentes temperaturas.

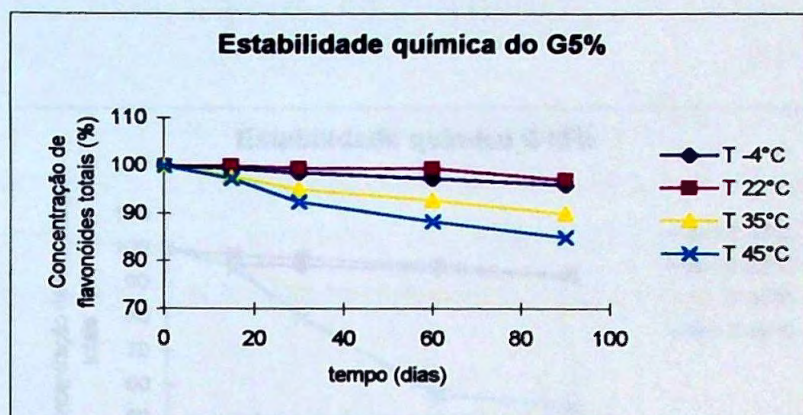


Figura 47 - Representação gráfica dos valores de concentração dos flavonóides totais provenientes do extrato de própolis, incorporado ao gel na concentração de 5%, em função do tempo e diferentes temperaturas.

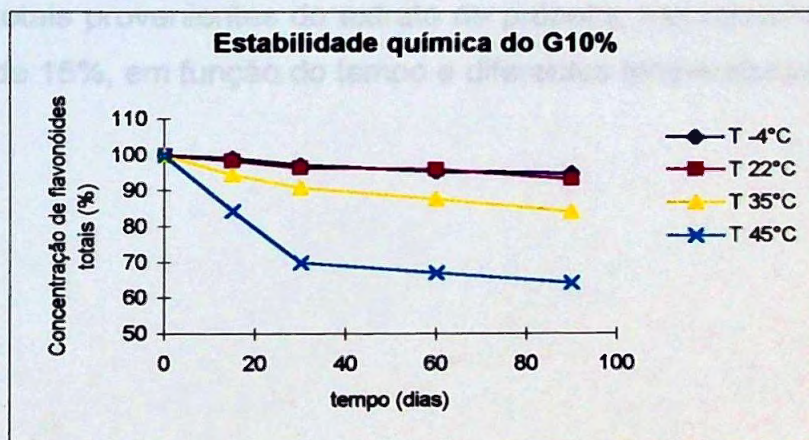


Figura 48 - Representação gráfica dos valores de concentração dos flavonóides totais provenientes do extrato de própolis, incorporado ao gel na concentração de 10%, em função do tempo e diferentes temperaturas.

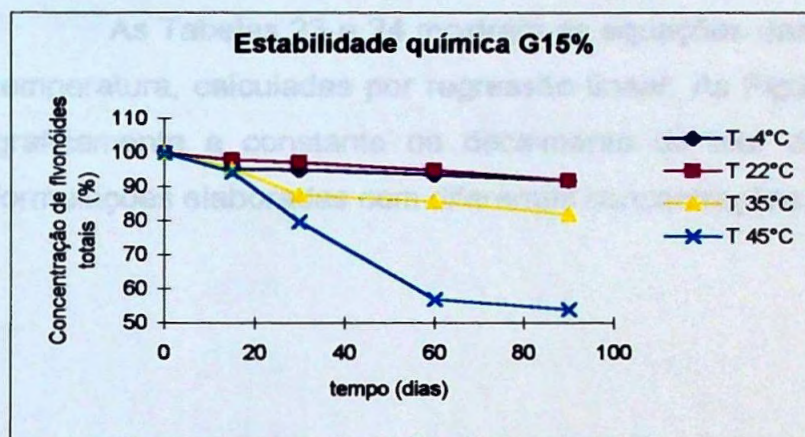


Figura 49 - Representação gráfica dos valores de concentração dos flavonóides totais provenientes do extrato de própolis, incorporado ao gel na concentração de 15%, em função do tempo e diferentes temperaturas.

## **5.7. Cálculo da constante de decaimento**

As Tabelas 23 e 24 mostram as equações das retas, obtidas para cada temperatura, calculadas por regressão linear. As Figuras 50 e 51 representam graficamente a constante de decaimento do teor de flavonóides totais nas formulações elaboradas com diferentes concentrações de extrato de própolis.

Tabela 23 – Equações lineares, relacionando a concentração de flavonóides totais, com a exposição às várias temperaturas nas emulsões com diferentes concentrações de extrato de própolis.

<b>Velocidade de decaimento</b>			
<b>T (°C)</b>	<b>Formulação</b>	<b>Equação</b>	<b>Constante de Velocidade</b>
-4	E5%	$Y=-0,0002x+4,6106$	0,0065
	E10%	$Y=-0,0006x+4,613$	0,0117
	E15%	$Y=-0,0004x+4,6081$	0,0004
22	E5%	$Y=-0,0006x+4,6151$	0,0006
	E10%	$Y=-0,0006x+4,6166$	0,0006
	E15%	$Y=-0,0007x+4,6074$	0,0007
35	E5%	$Y=-0,0005x+4,6000$	0,0005
	E10%	$Y=-0,0005x+4,6058$	0,0005
	E15%	$Y=-0,0007x+4,5945$	0,0007
45	E5%	$Y=-0,0006x+4,603$	0,0006
	E10%	$Y=-0,0006x+4,5982$	0,0006
	E15%	$Y=-0,0005x+4,5805$	0,0005

Em que:

$$y = \ln(a_0 - a)$$

$x$  = constante de velocidade de decaimento

$a_0$  - concentração inicial de flavonóides totais

$a$  - concentração final de flavonóides totais a cada instante

Tabela 24 – Equações lineares, relacionando a concentração de flavonóides totais, com a exposição às várias temperaturas nos géis com diferentes concentrações de extrato de própolis.

<b>Velocidade de decaimento</b>			
<b>T (°C)</b>	<b>Formulação</b>	<b>Equação</b>	<b>Constante de Velocidade</b>
-4	G5%	$Y=-0,0005x+4,605$	0,0005
	G10%	$Y=-0,0006x+4,6021$	0,0006
	G15%	$Y=-0,0005x+4,5707$	0,0005
22	G5%	$Y=-0,0004x+4,6113$	0,0004
	G10%	$Y=-0,0008x+4,6001$	0,0008
	G15%	$Y=-0,0009x+4,6031$	0,0009
35	G5%	$Y=-0,0012x+4,6003$	0,0012
	G10%	$Y=-0,0019x+4,5926$	0,0019
	G15%	$Y=-0,0023x+4,6001$	0,0023
45	G5%	$Y=-0,0018x+4,5994$	0,0018
	G10%	$Y=-0,0038x+4,4756$	0,0038
	G15%	$Y=-0,0072x+4,6293$	0,0072

Em que:

$$y = \ln(a_0 - a)$$

x= constante de velocidade de decaimento

$a_0$  - concentração inicial de flavonóides totais

a - concentração final de flavonóides totais a cada instante

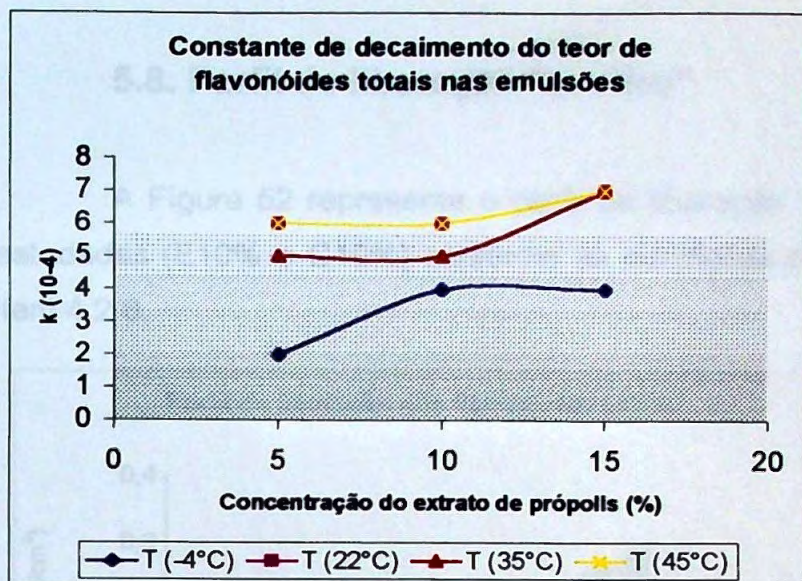


Figura 50 – Representação gráfica da constante de decaimento do teor de flavonóides totais nas emulsões com 5, 10 e 15% de extrato de própolis em diversas temperaturas.

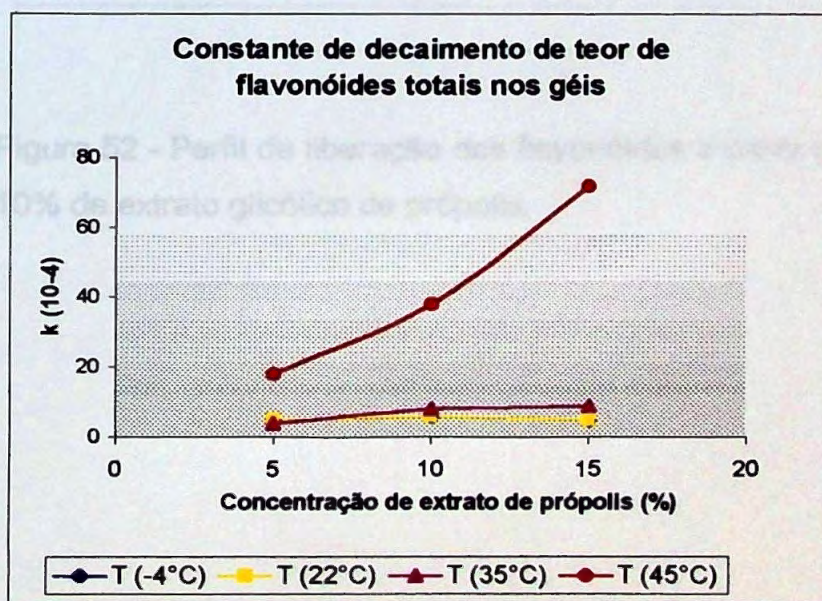


Figura 51 – Representação gráfica da constante de decaimento do teor de flavonóides totais nas emulsões com 5, 10 e 15% de extrato de própolis em diversas temperaturas.

### 5.8. Perfil de liberação “in vitro”

A Figura 52 representa o perfil de liberação “in vitro” das formulações estudadas (E10% e G10%) conforme as condições padronizadas descritas no item 4.2.8.

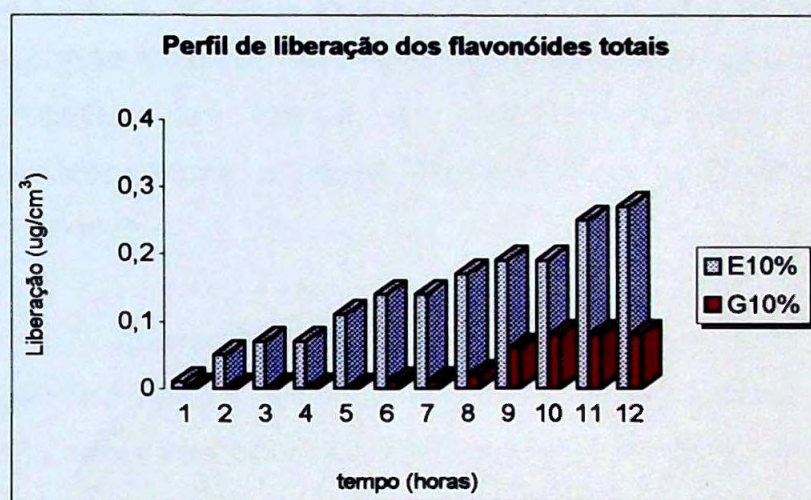


Figura 52 - Perfil de liberação dos flavonóides a partir de formulações contendo 10% de extrato glicólico de própolis.

## **6. DISCUSSÃO**

O trabalho iniciou-se pela análise de amostras de própolis provenientes de diferentes regiões nacionais. O propósito era avaliar a homogeneidade de sua composição e a influência da flora de onde se originou a própolis, prevendo-se que diferentes características se refletiriam no material modificado. As amostras foram provenientes de apiários de qualidade comprovada na criação de abelhas da região sul e sudeste, considerando que nas regiões mais quentes é menor a produção de apíderivados. Acompanhou-se a coleta de algumas amostras em São Paulo o que proporcionou melhor entendimento do processo das etapas de coleta, manipulação inicial, conservação e armazenamento, as quais são essenciais para obtenção do produto de boa qualidade.

As amostras de própolis bruta estudadas apresentaram aspectos físicos semelhantes. As variações observadas deram-se devido à sua manipulação ou não pelo fornecedor que altera seu aspecto inicial visando melhor transporte e armazenamento das amostras. A coloração variou muito pouco tendo predominância a cor marrom em todas as amostras como pode ser observado na Tabela 5.

A análise fitoquímica das amostras confirmou a presença de grupos químicos relatados na literatura como sendo aqueles mais frequentemente presentes na própolis. Os flavonóides, tidos como um dos grupos principais responsáveis pela ação farmacológica da resina, estavam presentes em todas as amostras estudadas, como pode ser observado na Tabela 6. A determinação do teor de cinzas totais nos mostrou que a quantidade de substâncias inorgânicas foi bastante diferente entre as amostras, variando entre 1,2 a 3,2%, conforme Tabela 7. Estes valores não apresentaram correlação direta com os teores de flavonóides presentes em cada amostra.

O material recebido apresentava-se congelado e foi pulverizado para a preparação dos extratos glicólicos, que foi realizada através de técnica que envolveu a maceração da droga bruta, filtração seguida da evaporação do líquido extrator e adição de propilenoglicol. Inicialmente utilizou-se como método de extração, a maceração, por permitir a obtenção de resultados satisfatórios de extração dos princípios ativos de maior interesse da propólis, os ácidos fenólicos e flavonóides, além de representar a principal forma de obtenção de tinturas existentes no mercado. Como líquido extrator foi utilizado o álcool etílico a 70°GL por apresentar maior índice de extração dos princípios ativos (WOISKY, 1996). Obteve-se extrato transparente, de coloração amarela de intensidade variada, de odor característico. A intensidade da coloração mostrou-se diretamente relacionada com a concentração de flavonóides totais presentes em cada formulação, sendo as amostras V e VII de coloração amarelo claro, e as mais concentradas, amarelo âmbar.

Para obtenção do extrato glicólico procedeu-se à evaporação parcial do líquido extrator inicial seguida da adição de propilenoglicol. Esta segunda fase do processo justifica-se pela utilização posterior dos extratos em formulações de uso externo, nas quais a presença de álcool etílico em altas proporções seria fator de instabilidade e mesmo de irritabilidade ao usuário. Esta técnica de obtenção dos extratos evita perda dos princípios ativos e adapta o veículo do extrato às formulações em que estes serão utilizados.

Os extratos foram caracterizados física e quimicamente. As características físicas (densidade, pH e resíduo seco) apresentaram pouca variação entre as amostras estudadas. Entretanto, o teor dos princípios ativos, doseados espectrofotometricamente, (flavonóides totais), apresentou grande variabilidade, conforme pode ser visualizado na Tabela 8, situando-se entre 0,78 µg/g (amostra VI) a 4,87 µg/g (amostra VII).

A identificação destes compostos nos confirmou que a variação pode ser mais quantitativa que qualitativa, pois houve homogeneidade nas substâncias identificadas.

Em todas as amostras analisadas por cromatografia em camada delgada foram identificados flavonas e flavonóis, tipos de flavonóides relatados como os de maior concentração na própolis o que pode ser visualizado na Tabela 9 (GONZÁLES & ORZAES, 1997).

No doseamento espectrofométrico de flavonóides totais utilizou-se cloreto de alumínio ( $AlCl_3$ ) como reagente. Este método baseia-se na formação de complexos coloridos, descritos a seguir na Figura 53, cuja concentração está diretamente relacionada com a quantidade de princípios ativos presentes nas amostras. Este método é relatado como a adaptação da técnica proposta por DOWD (1959) para doseamento da quercetina, no qual o desvio batocrômico e a intensificação da absorção são devidos à formação de quelatos estáveis que aumentam a sensibilidade do processo e evitam a interferência de outras substâncias fenólicas (MABRY, 1970; VENNAT & GROSS et. al., 1992).

Adaptou-se de 425 para 415nm o comprimento de onda para leitura, pois nas nossas condições de trabalho, em todas as amostras analisadas mostraram pico de absorção máximo neste ponto, como pode ser visto na Figura 22. Além disso, esta região é citada por outros autores como comprimento de onda adequado para leitura dos flavonóides totais da própolis (ARVOUET-GRAND & VENNAT et al., 1994).

A quercetina foi empregada como padrão, por ser a aglicona flavonoídica mais comum nas angiospermas utilizadas pelas abelhas na fabricação da própolis, além de estar presente em todas as amostras estudadas neste trabalho, conforme observa-se na Tabela 9. A quercetina mostrou-se

adequada ao método espectrofotométrico utilizado por possuir hidroxilas em sua estrutura necessárias à formação do complexo com o metal - flavonóide em presença de cloreto de alumínio (WOISKY, 1996; FRANCO, 1986).

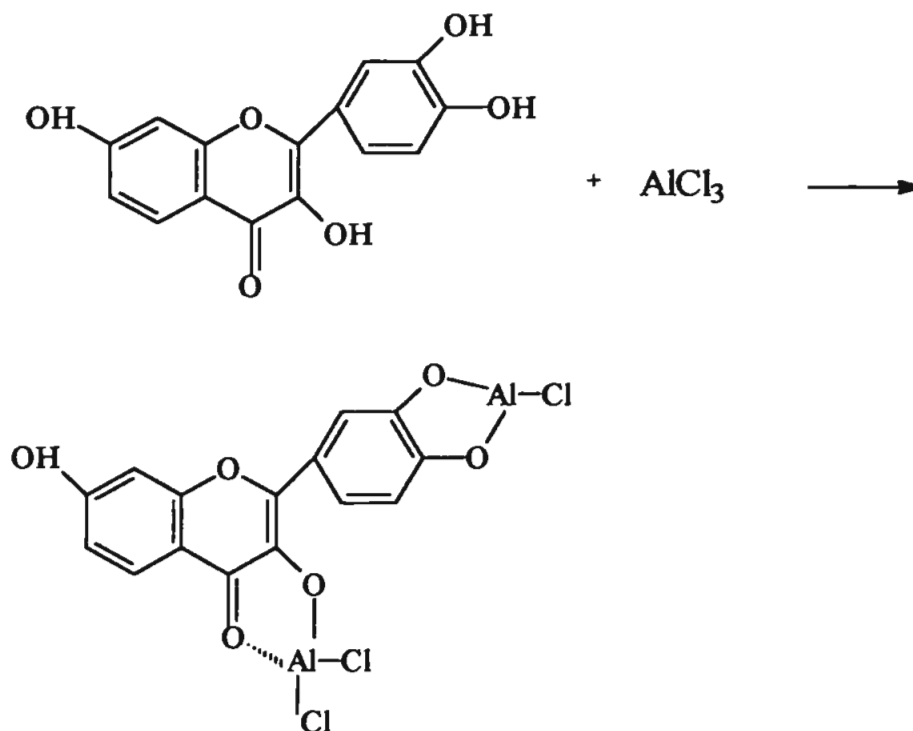


Figura 53 - Exemplo de reação entre flavonóides e cloreto de alumínio, com formação de complexos coloridos

A padronização do método espectrofotométrico, nas nossas condições de trabalho, mostrou-se adequada (Figuras 18 a 21), o que pode ser evidenciado pelos valores de correlação linear, reta de calibração e estabilidade das leituras, a reprodutibilidade do método e do aparelho apresentaram desvio padrão respectivamente iguais a 0,0011 e 0,003. O método espectrofotométrico mostrou-se sensível às concentrações entre 2,0 a 10,0 $\mu\text{g/ml}$ .

Os extratos de própolis analisados apesar da diferença na concentração de flavonóides totais apresentaram semelhantes perfis ou espectros de absorção no visível semelhante, conforme evidenciado na Figura 22.

Considerando-se a propriedade de algumas substâncias de reter na superfície de suas partículas sólidas determinados solutos sem a ocorrência de reação química especial, utilizou-se método de separação por cromatografia em coluna, na tentativa de isolar-se o grupo de flavonóides presentes nas formulações. A técnica baseia-se na aplicação da amostra na coluna contendo material adsorvente (sílica gel) seguida pela eluição dos componentes com solventes apropriados (MARKHAM, 1982). Os resultados de recuperação dos princípios ativos obtidos por esta técnica foram muito baixos (cerca de 60%) (Tabela 12), tornando-a portanto inviável para nosso trabalho.

Adotou-se então a solubilização seletiva, utilizando-se a técnica de separação por solventes (partição), procedimento utilizado para remoção de fármacos e outros compostos orgânicos de amostras complexas. A partir do coeficiente de solubilidade de vários solventes orgânicos, utilizados para extração das agliconas, e afinidade destes com grupo flavonóides, tentou-se a solubilização seletiva. O solvente com o qual obtiveram-se melhores resultados foi o clorofórmio, o que pode ser explicado devido à presença, na própolis, de flavonóides que são altamente metilados, como as flavonas e flavonóis, usualmente extraídos por solventes menos polares (HARBONE & MABRY et al., 1975). A extração seletiva foi controlada por cromatografia em camada delgada e espectrofotometria. Pela realização dos brancos dos excipientes pode-se comprovar a não interferência destes no processo extrativo (Figura 23).

Na preparação das formulações foi utilizado o extrato I, por apresentar concentração mediana de flavonóides totais entre os extratos estudados (Tabela 10), podendo-se considerar a amostra representativa das demais

quanto ao teor de flavonóides totais. Nas formulações elaboradas utilizou-se excipientes e componentes de uso corrente no mercado, visando-se elaborar formulações simples para estudar-se a influência do extrato de própolis incorporado nestas.

As formulações propostas foram divididas em dois tipos distintos. As emulsões possuíam na sua composição como agente emulsivo álcool cetosteárico sulfatado (E1) e cera crodabase CR-2 (E2) que atuam sobre a tensão superficial e interfacial dos líquidos imiscíveis (PRISTA, 1981), além de umectantes (propilenoglicol) e emolientes (vaselina). Os géis possuíam na sua formulação além do agente geleificante (hidroxietilcelulose e carboxipolimetileno) também componentes umectantes (propilenoglicol) e emolientes (vaselina).

Os estudos preliminares de estabilidade forneceram dados sobre as formulações mais viáveis para continuação dos estudos. As formulações que apresentaram melhores resultados foram a E1 e G1 – emulsão e gel iônico (Tabelas 11 e 12), nas quais procedeu-se a incorporação de quantidades totais de 5, 10 e 15% de extrato glicólico de própolis. Considerando-se neste extrato a presença de 3,84% de flavonóides totais, pode-se calcular em cerca de 0,2, 0,4 e 0,6mg/g de flavonóides em 100g da emulsão ou gel obtido.

As preparações foram então identificadas como E5%, E10%, E15%, G5%, G10% e G15% e analisadas em seus aspectos de estabilidade física, manutenção dos teores de flavonóides totais e liberação destes.

Alguns aspectos organolépticos da análise mostraram-se influenciados pelo aumento da concentração dos extratos nas emulsões e géis. A cor e odor foram incrementados com o aumento da concentração do extrato, de coloração naturalmente amarela escura e odor característico.

Nos géis, a alteração da coloração das amostras foi profundamente afetada pelas condições de estresse. Provavelmente a maior quantidade de água presente na formulação pode ter facilitado a ocorrência de fenômenos oxidativos, sendo este portanto importante fator a ser avaliado para planejamento do armazenamento e conservação de géis contendo extrato de própolis. Os outros aspectos sensoriais analisados não mostraram alterações importantes (Tabelas 14 a 17).

Após o período de estresse térmico, não houve separação de fases nas emulsões em todos os valores de concentração de extrato presentes. Mesmo após serem submetidas às condições extremas de aceleração da gravidade (centrifugação) estas características não foram alteradas. Nos géis apenas naqueles com concentração de 15% do extrato de própolis submetidos à 45°C observou-se liquefação característica da quebra de estrutura dos mesmos (Tabela 18).

A análise do comportamento reológico das formulações nos forneceu dados importantes a respeito da caracterização física dos sistemas desenvolvidos. As emulsões apresentaram maior tixotropia do que os géis. Pode-se observar que, quando a emulsão a 5% do extrato foi submetida a 45°C por 90 dias, ocorreu a maior variação da área entre a curva ascendente e a descendente, significando redução na tixotropia do sistema. Nas emulsões contendo 10 e 15% de extrato de própolis as características iniciais mantiveram-se aparentemente sem alterações mesmo após o estresse térmico (Figura 24 a 27).

Nos géis o comportamento reológico foi aparentemente semelhante nas formulações de 5 e 10% de extrato incorporado, não havendo área de histeresse evidente. Apenas os géis contendo concentração de 15% do ativo

apresentaram tixotropia, com área de histerese, no tempo inicial. Após a exposição ao estresse térmico, durante 90 dias, houve desaparecimento da tixotropia inicial observada (Figuras 28 a 31).

Estas características tixotrópicas, poderiam indicar maior potencial das formulações em liberarem os princípios ativos pois a área de histerese indica que as formulações levarão maior tempo para reorganizar sua estrutura inicial após serem submetidas a determinada força. Este fator poderia vir a facilitar a liberação dos princípios ativos da formulação. Nossos estudos evidenciaram maior liberação dos flavonóides a partir das emulsões do que dos géis, entretanto não podemos considerá-los conclusivos neste sentido, exigindo ainda otimização destes estudos

A variação da viscosidade aparente apresentou comportamento distinto nas emulsões e nos géis. Nas emulsões houve aumento da viscosidade quando estas foram submetidas às temperaturas elevadas, o que sugere que estas poderiam ter perdido água, de forma a terem alteradas suas características iniciais. Entretanto, em temperatura próxima da ambiente (22°C) houve pequena variação da viscosidade aparente destas (Figura 32 a 34).

Nos géis, à temperatura próxima à ambiente (22°C) houve pouca alteração nos valores de viscosidade; entretanto com o aumento da temperatura as formulações apresentaram pequena queda de viscosidade (Figura 35 a 37), o que pode ser explicado pela quebra da estrutura do gel e sua pequena liquefação, fenômenos observados macroscopicamente.

A variação da viscosidade dos géis observada em altas temperaturas foi acompanhada de alterações gerais no aspecto da formulação, as quais limitariam sua utilização. Pode-se sugerir a conservação do produto em temperaturas controladas (15-25°C).

As emulsões mostraram-se homogêneas quando submetidas à avaliação microscópica e a concentração do extrato não mostrou influência significativa neste aspecto. Pode-se observar a presença de estruturas uniformes nas três concentrações de extrato de própolis, característica que não se alterou após a permanência nas condições de estresse. A formação de cristais líquidos também foi evidenciada com as mesmas características da homogeneidade (Figuras 38 a 43).

Quanto ao pH, nas emulsões o aumento da concentração do extrato provocou diminuição no seu valor, enquanto no gel esta variação foi muito pequena. Este resultado pode ser explicado pelos componentes das formulações. Na emulsão o valor do pH era igual a 6,63, a incorporação do extrato levemente ácido (pH – 4,84) provocou seu decréscimo a 5,2, 4,8 e 4,6 respectivamente com 5,10 e 15% de extrato respectivamente.

Nas formulações géis a presença da trietanolamina provavelmente promoveu a neutralização desta acidez.

Estes valores não alteraram-se após a permanência em condições estressantes (Tabelas 19 a 22). A análise da variância dos valores de pH das emulsões mostra que a interação do tipo de formulação e temperaturas a que foram submetidas não é estatisticamente significativa com  $\alpha=0,056$ , assim como a interação tipo de formulação e tempo de permanência nas condições do estudo, com  $\alpha=0,104$ . Nos géis essas mesmas interações não se mostraram significativas com  $\alpha$  igual a 0,1406 e 0,0748 respectivamente para as mesmas interações.

O conhecimento dos valores de pH é de grande importância para o desenvolvimento de formulações, já que valores inadequados podem inviabilizar o uso da formulação e sua alteração pode levar à degradação de conservantes

e dos princípios ativos. Pode ainda ser um indicativo de reações de degradação dos componentes das formulações.

O estudo da estabilidade química dos flavonóides totais presentes nas formulações mostrou pelas constantes de velocidade de decaimento, a influência da concentração inicial de princípios ativos e temperatura. A partir dos dados de variação de concentração de flavonóides totais em função do tempo de exposição às diferentes temperaturas (Figuras 44 a 49), foram construídas relações lineares logarítmicas que forneceram valores de constantes de velocidade, conforme Tabelas 23 e 24 para emulsões e géis respectivamente, valores representados graficamente nas Figuras 50 e 51.

Nas emulsões são observados dois comportamentos distintos. Quando expostas a temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$  houve pequena variação nos valores de constante de velocidade da reação. Nas temperaturas maiores ( $22, 35, 45^{\circ}\text{C}$ ) observa-se muita semelhança entre os valores destas constantes (variando entre  $6$  e  $7 \times 10^{-4}$ ), podendo-se identificar valor médio representativo.

No gel, a  $35^{\circ}\text{C}$  e  $45^{\circ}\text{C}$  a velocidade de degradação ( $K$ ) mostrou-se altamente influenciada pela concentração inicial do extrato de própolis, ou seja, quanto maior a quantidade de extrato maior a velocidade de degradação, o que fica bastante evidente pela construção da reta que relaciona  $\ln(k)$  ( $45^{\circ}\text{C}$ ) com a concentração de extrato, a qual obedece a relação linear  $y = 0,1386x + 2,2152$  ( $R^2 = 0,998$ ) e a  $35^{\circ}\text{C}$  a relação linear  $y = 0,1099x + 1,1081$  ( $R^2 = 0,98$ ), considerando-se "y" a concentração remanescente de flavonóides totais e  $k$  a constante de velocidade de decaimento.

A análise de variância dos dados nos mostra que os fatores concentração, tempo de exposição e temperatura influenciam a estabilidade química. Nas emulsões se mostraram significativas as interações entre tipo de

formulação e temperatura (com  $\alpha=0,0006$ ) e formulação e tempo de exposição à temperatura (com  $\alpha=0,0000$ ). Nos géis este perfil se repete com nível de significância de  $\alpha=0,0002$  para a interação tipo de formulação e temperatura e de 0,003 para interação formulação e tempo de exposição.

As emulsões se mostraram mais estáveis quimicamente que os géis; mesmo em temperaturas mais elevadas o índice de decaimento máximo foi de 7,1% do teor inicial de princípios ativos. Pode se relacionar aqui a influência da maior estabilidade física destas formulações.

Os estudos de liberação dos flavonóides presentes na emulsão e no gel contendo 10% de extrato glicólico de própolis mostraram maior liberação por unidade de área a partir da emulsão do que do gel. Procurou-se relacionar a concentração da solução receptora em função do tempo e obteve-se uma relação linear a partir da qual pode-se calcular a velocidade de liberação. Nas emulsões a equação que descreve a liberação é  $y = 0,0224x - 0,0035$  ( $R^2=0,9901$ ). Nos géis é  $y = 0,0088x - 0,0289$  ( $R^2=0,864$ ), nas quais  $y$  representa a concentração na solução receptora e o  $x$  o tempo de tomada de amostra da dissolução.

A quantificação dos flavonóides liberados a partir das emulsões e géis nos indica a necessidade de otimização das formulações, pela inclusão, por exemplo de promotores de liberação, para que, além da manutenção da estabilidade física e química os sistemas possam liberar os princípios ativos tornando-os biodisponíveis.

## **7. CONCLUSÕES**

---

As amostras de própolis de diferentes procedências apresentaram diferente composição (qualitativa e quantitativa) e a padronização baseada em grupos químicos característicos ou princípios ativos específicos pode ajudar na avaliação e estabelecimento de padrões de qualidade.

Os métodos padronizados para extração e doseamento de flavonóides totais mostraram-se adequados à aplicação nos extratos, nas formulações e na avaliação da liberação "in vitro".

As emulsões e os géis de caráter iônico contendo extrato glicólico de própolis mostraram-se mais estáveis que os não iônicos, nas condições do estudo. Os produtos devem ser mantidos preferencialmente protegidos de temperaturas elevadas para manutenção de suas características físicas e químicas.

A velocidade de degradação foi influenciada pela concentração inicial de extrato presente nas formulações, característica mais acentuada nas emulsões que nos géis.

Os flavonóides mostraram-se mais estáveis e disponíveis quando veiculados em emulsões do que em géis.

---

## **8. RESUMO**

---

Extratos de origem natural têm sido cada vez mais utilizados em preparações farmacêuticas devido aos resultados obtidos pelas investigações científicas confirmarem as aplicações terapêuticas já utilizadas empiricamente durante muitos anos. Entretanto, a maioria ainda é destituída de suporte técnico científico, que exige a exploração do conhecimento para fixação das condições de estabilidade química, físico-química e farmacológica dos seus componentes. A própolis é um apíderivado constituído por uma série de substâncias resinosas e gomosas de consistência viscosa recolhida de bulbos, sépalas, pétalas, folhas e caules e cascas dos vegetais pelas abelhas. Na colmeia, esta mistura é modificada através da adição de produtos de procedência das abelhas tais como ceras e secreções salivares. Em termos gerais, a própolis se caracteriza por conter resinas (50%), ceras (40%) e substâncias voláteis (10%). Quimicamente, esses componentes são constituídos basicamente por substâncias fenólicas, pertencentes aos grupos estruturais: flavonóides aglicônicos, ácidos fenólicos e seus ésteres. Esta composição, faz com que mistura tenha ampla aplicabilidade em formas farmacêuticas de uso externo tais como filtros de radiação ultravioleta, antioxidantes e incrementadores da resistência capilar. No presente trabalho, padronizou-se metodologia para análise dos princípios ativos, particularmente flavonóides, utilizando-se cromatografia em camada delgada e espectrofotometria visível, bem como adequou-se a preparação de formulações farmacêuticas para uso externo, especialmente as emulsões cosméticas e os géis, pela análise dos parâmetros físicos (pH, viscosidade, comportamento reológico e aspectos externos) e químicos pela determinação da estabilidade dos flavonóides.

## **9. SUMMARY**

Extracts from natural origin have been used more and more in pharmaceutical formulations. Results obtained through scientific investigations confirm many of the therapeutic applications suggested empirically during many years. However, most of them still lack technical and scientific support which demand knowledge exploration to determine chemical, physico-chemical and pharmacological stability conditions of their components. Propolis is one bee product constituted by a series of resinous and gummy substances of a viscous consistence which is collected by bees from bulbs, sepals, petals, leaves, stems and barks from plants. In the hive, this mixture is modified through the addition of products produced by the bees such as salivary secretions and waxes. In general terms, propolis contains resins (50%), waxes (40%) and volatile substances (10%). Chemically these components are basically formed by phenolic substances that belong to the structural groups: flavonoid aglicons, phenolic acids and their esters. This composition enhances the applicability of the mixture into pharmaceutical means for topic use such as a protective screen against ultra-violet radiation, antioxidants and improves to vein resistance. Herein, the methodology to analyze active principles, particularly flavonoids, has been standardized by the use of thin layer chromatography and visible spectrophotometry. Also, there have been adaptations in the production of pharmaceutical formulations for topic use, specially the cosmetic emulsions and gels through the analyses of physical and chemical parameters (pH, viscosity, rheological characteristics and external aspects) and also through the determination of flavonoids stability.

---

## **10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

ANTUNES, R.M.P., CATÃO, R.M.R., CEBALLOS, B.S.O. Atividade antimicrobiana da própolis. **Rev. Bras. Farm.**, Rio de Janeiro, v.77, n.1, p.15-18, 1996.

ARVOUET-GRAND, A., LEJUNE, B., BASTIDE, P., POURRAT, A.M., PRIVAT, A., 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.165-170, 1993.

ARVOUET-GRAND, A.; LEJUNE, B., BASTIDE, P., POURRAT, A.M., PRIVAT, A., 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.171-178, 1993.

ARVOUET-GRAND, A., VENNAT, B., POURRAT, A., LEGRET, P. Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. **J. Pharm. Belg.**, Brussels, v.49, n.6, p.462-468, 1994.

ARVOUET-GRAND, A., VENNAT, B., 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.438-444, 1995.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRÓPOLIS. Curso de análise de própolis. Paraná: ABP, 1992. 9p.

---

\* De acordo com a NBR6023/89, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1994.

- BALL, A. JARAMILLO, J. MARKOWSKI, T. A Rapid and reliable method for determining viscosity on stability samples. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.97, n.10, p.40-44, 1982.
- BANKOVA, V.S., POPOV, S., MAREKOV, N.L. High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.242, p.135-143, 1982.
- BANKOVA, V.S., POPOV, S., MAREKOV, N. L. A study on flavonoids of propolis. **J. Nat. Prod.**, Columbus, v.46, n.4, p.471-474, 1983.
- BANKOVA, V.S., CHRISTOV, R., POPOV, S. Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.607, p.150-153, 1992.
- BERNARDO, L.E.C., SOUZA, I.A.F., Própolis - Cicatrizante e antibiótico natural. **Rev. Racine**, São Paulo, v.6, n.32, p.38-41, 1996.
- BREYER, H.F.E. Aspectos de produção, coleta, limpeza, classificação e acondicionamento de própolis bruta de abelhas *Apis mellifera* L. In: SIMPÓSIO ESTADUAL DE APICULTURA DO PARANÁ, 10, e EXPOSIÇÃO DE EQUIPAMENTOS E MATERIAIS APÍCOLAS, 7, Curitiba, 1995. **Anais**. Curitiba. 1995. p.114-119.
- BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica e de Farmacognosia**. Zaragoza: Editora Acribia, S. A. 1991. 594p.
- BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.36, p.347-363, 1998.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 2.ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1977. 3v.

DOBROWOLSKI, J.W., VOHORA, S.B., SHARMA, K. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipiretic studies on propolis bee products. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v.35, p.77-82, 1991.

DONADIEU, Y. **La Propolis**. Paris: Maloine S. A. Éditeur, 1980. 45p.

DOWD, L. E. Spectrophotometric determination of quercetin. **Anal. Chem.**, Washington D. C., v.31, n.7, p.1184-1187, 1959.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed., São Paulo: Siqueira, 1959. 1295p.

FRANCO, T.T., KUREBAYASHI, A K. Isolamento de princípios ativos da própolis por cromatografia em papel bidimensional e doseamento espectrofotométrico. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.46, n.1/2, p.81-86, 1986.

FREE, J.B. **A organização social das abelhas**. São Paulo: EDUSP, 1980. 79p. (Coleção Temas de Biologia, v.13).

FREITAS, P.C.D., BACCHII, E.M. **Práticas de farmacognosia**. 3.ed. São Paulo: FCF, USP, 1994. 64p. [Apostila].

FOX, C. Cosmetic emulsions. In: LISSANT, K. J. **Emulsions and Emulsions Technology**, part.II. New York: Marcel Dekker, Inc., 1974. p. 701-933.

GALLO, F.R., SAVI, G. Propoli: usi e tecniche di rilevazione. **Boll. Chim. Farm.**, Millan, v.9, n.12, p.483-491, 1995.

GARCIA - VIGUERA, C., GREENAWAY, W., WHATLEY, F.R. Composition of propolis from two different Spanish regions. **Z. Naturforsch.**, Berlin, v.47, p.634-637, 1992.

GARRET, R. E. Stability of oil-water emulsions. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v.154, n.11, p.1557-1570, 1965.

GHISALBERTI, E.L. Propolis: A Review. **Bee World**, Gerrards Cross, v.60, p.59-84, 1979.

GONZÁLES, E, ORZAES, M. T. Estudio del propoleo: Origen e importancia de los compuestos fenolicos en su composicion. **Alimentaria**, Madrid, v.283, p.103-107, 1997.

GREENAWAY, W. SCAYSBOOK, T., WHATLEY, F.R. Headspace volatiles from propolis. **Flavour Frag. J.**, Chichester, v.4, p.173-175, 1989.

HARBONE, J.B, MABRY, T.J., MABRY, H. **The Flavonoids**. 2.ed. New York: Chapman and Hall, 1975. 120p.

HARBONE, J. B. **Phytochemical methods: a guide to a modern techniques of plant analysis**. 2.ed. London: Chapman and Hall, 1991, p. 37-76.

HAUSEN, B.M., WOLLENWEBER, E., SENFF, H.T., POST, B. Propolis allergy (I). Origin, properties, usage and literature review. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v.17, p.163-170, 1987.

---

HAUSEN, B.M., EVERS, P., STUWE, H. T., KÖNIG, W. A. WOLLENWEBER, E. Propolis allergy (IV). Studies with further sensitizers from propolis and constituents common to propolis, poplar buds and balsam of Peru. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v.26, p.34-44, 1992.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural product of high pharmacology potency. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v.32, n.7, p.1141-1148, 1983.

HOLLMAN, P.C.H., HERTOOG, M.G.L., KATAN, M.B. Analysis and health effects of flavonoids. **Food Chem.**, Barking, v.57, n.1, p.43-46, 1996.

IDSON, B. Rheology: Fundamental concepts. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.93, n.7, p.23-30, 1978.

IDSON, B., LAZARUS, J. Semisolids. In: LACHAMAN, L., LIEBERMAN, H. A., KANIG, J. L. **The Theory and Practice of Industrial Pharmacy**. 3.ed. Philadelphia: Lia & Febiger, 1986. p. 534-563.

IDSON, B. Stability testing of emulsions. **Drug Cosmet. Ind.**, New York, v.143, n.12, p.35-38, 1988.

IDSON, B. Stability testing of emulsions part 2. **Drug Cosmet. Ind.**, New York, v.152, n.2, p.38- 43, 1993.

KEDZIA, B.G., IWASZKIWCZ, J. Pharmacological investigations of ethanolic extract of propolis. **Phytoterapie**, London, v.6, p.7-10, 1990.

KIVALINA, V.P., BUDARKOVA, E.L. Effect of propolis extract on antigenic and immunogenic properties of tetanic anatoxin. Fitosindy: eksperimental'nye issledovaniya voprosy teorii i praktiki. Polluwy: B. E. Aizenman. 1975. p. 269-

---

270. Apud: BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.36, p.347- 363, 1998.
- KHAYAL, M.T., EL-GHAZALV, M.A., EL-KHATIB, A.S. Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. **Drugs Exp. Clin. Res.**, Genebra, v.19, n.5, p.197-120, 1993.
- KLEIN, K. Improving emulsions stability. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.99, n.5, p.121-126, 1984.
- KLEIN, K. Formulating skin care emulsions. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.109, n.5, p.63-66, 1994.
- KOO, M.H., PARK, Y.K. Investigation of flavonoid aglycones in propolis collect by two different varieties of bees in the same region. **Bios. Biotech. Biochem**, Tokyo, v.61, n.2, p.367- 369, 1997.
- KUJUMGIEV, A., BANKOVA, V., IGNATOVA, A., POPOV, S. Antibacterial activity of propolis, some of its components and their analogs. **Pharmazie**, Berlin, v.48, n.10, p.785-786, 1993.
- KULEVANOVA, S., STAFILOV, T., DOREVSKI, K. Determination of some macroelements in propolis by atomic spectrometry. **Acta Pharm.**, Helsinki, n.45, p.45-52, 1995.
- LOCHHEAD, R. Y. Emulsions. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.109, n.5, p.93-103, 1994.

MABRY, T.J., MARKHAM, K.R, THOMAS, M.B. **The sistematic identification of flavonoids**. Berlim: Springer - Verlag. 1970. 183p.

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

MARCUCCI, M.C. Propriedades químicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, São Paulo, v.19, n.5, p.529-536, 1996.

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

MARKHAM, K.R., MITCHEL, K.A., WILKINS, A.L., DALDY, J. A., LU, Y. HPLC and CG-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. **Phytochemistry**, Oxford, v.42, n.1, p.205-211, 1996.

MENDONÇA, V.L.M. Protetores solares de alta proteção: estabilidade física e eficácia. São Paulo, 1997. 145p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

MERCK index. 12.ed. Withehouse Station, 1996. 1741p.

MERESTA, L., MERESTA, T. Effect of pH on bacterial activity of propolis. **Bull. Vet. Inst. Pulawy.**, Pulawy, v.24, p.21-25, 1980.

MINER, P.E. Emulsion Rheology: Creams and lotions. In: LABA, D., **Rheological properties of cosmetics and toiletries**. New York: Marcel Dekker, 1993. p. 313-360.

MOREIRA, T.F. Composição química da própolis: vitaminas e aminoácidos. **Rev. Bras. Farmacogn.**, São Paulo, v.1, p.12-19, 1986.

MORI, A.L.P. Própolis - Identificação de flavonóides e ácidos aromáticos em tintura. Estimativa de FPS de extrato mole em base cosmética. São Paulo, 1997. 114p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

NAÉ, H. N. Introduction to rheology. In: LABA, D., **Rheological properties of cosmetics and toiletries**. New York: Marcel Dekker, 1993. p. 9-33.

NAGY, M., GRANCAI, D. Colorimetric determination of flavanones in propolis. **Pharmazie**, Berlin, v.51, n.2, p.100-101, 1996.

NIGG, H. N.; SEIGLER, D. **Phytochemical resources for medicine and agriculture**. London: Plenum Press, 1992. p. 260-276.

NORMAS para la calidad del propoleo: Espanha. Barcelona. Associação Internacionale de Pesquisa de Abejas, 1989. 15p.

PAMPLONA, B. Própolis. Composição e atividades terapêuticas. **Rev. Racine**, São Paulo, v.7, n.37, p. 49-53, 1997.

PARK, Y.K., KOO, M.H., IKEGAKI, M., CONTADO, J.L. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. **Arq. Biol. Technol.**, Curitiba, v.40, n.1, p.97-106, 1997.

PEPEJNJAK, S., JALSENJAK, I., MAYSINGER, D. Flavonoid content in propolis extracts and growth inhibition of *Bacillus subtilis*. **Pharmazie**, Berlin, v.40, n.2, p.122-123, 1985.

---

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 3.ed., 1981. 3 v.

POTTER, W. H. **Analysis of biological molecules**. An introduction to principles, instrumentation and techniques. London: Chapman & Hall, 1995. 202 p.

POPE, D.G. Accelerated stability testing for prediction of drug product stability. **Drug Cosmet. Ind.**, New York, v.127, n.5, p.54-62, 1980.

POZO, A del., IRRIARTE, E.G. **Enciclopedia Farmacéutica: métodos analíticos de Identificación y valoración**. Barcelona: Editorial Científico -Médica. Tomo III, 1963. 1037p.

QUACK, L.M. Testing the stability of cosmetics emulsions. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.91, n.10, p.21-36, 1976.

RENG, A.K., SKRYPZAK, W. Ways to regulate the viscosity of cosmetic preparations. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.94, n.6, p.25-36, 1979.

RIEGER, M. M. Emulsions. In: LACHAMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **The Theory and Practice of Industrial Pharmacy**. 3.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. p. 502-533.

RIEGER, M.M. Stability testing of macroemulsions. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.106, n.5, p.59-69, 1991.

ROA, W.E.P. Reologia na aplicação de cosméticos. **Aerosol. Cosmet. Toiletries**, São Paulo, v.1, n.2, p.22-25. 1979.

ROBINSON, T. **The organic constituents of higher plants**. 6.ed. Massuchets: Cordus Press, 1991. p. 187-217.

ROMANOWSKI, P., SCHUELLER, R. Cosmetic product packing. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.112, n.5, p.65-73, 1997.

SILVA, E.C. Desenvolvimento de emulsões cosméticas utilizando o óleo de pequi. São Paulo, 1994. 112p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

SCHUELLER, R. Estabilidade: Testar ou não testar. **Cosmet. Toiletries Ed. Port.**, São Paulo, v.5, p.35-38, 1993.

STHAL, E., SCHIL, W. **Pharmazeutische Biologie 4: Drogenalyse II. Inhaltsstoffe und Isolierung**, Stuttgart: Gustav Fischer Verlagn, 1981. p.126-127.

STRUCKMANN, J.R., NICOLAIDES, A.N. Flavonoids - A review of the pharmacology and therapeutic efficacy of Daflon 500mg in patients with chronic venous insufficiency and related disorders. **Angiology**, New York, v.45, n.6, p.419-428, 1994.

TOMÁS-BARBERAN, F.A., GARCIA-VIGUERA, A.C., VIT-OLIVIER, P., TOMÁS-LORENTE, F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. **Phytochemistry**, Oxford, v.34, n.1, p.191-196, 1993.

UNITED States pharmacopeia. 23.ed. Rockville: United States Pharmacopeial, 1995. 2067p.

---

- VANHAELEN, M, VANHAELEN - FASTRÉ, R. Propolis. - I. Origine, micrographie, composition chimique et activité thérapeutique. **J. Pharm. Belg.**, Brussels, v.34, n.5, p.253-259, 1979.
- VELASCO, M.V.R. Desenvolvimento e padronização de gel contendo papaína para uso tópico. São Paulo, 1993. 146p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).
- VENNAT, B., GROSS, A. D., POURRAT, A. *Hamamelis virginiana*: Identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extracts. **Pharm. Acta Helv.**, Zürich, v.67, n.1, p.11-14, 1992.
- VOLPERT, R., ELSTNER, E. F. Biochemical activities of propolis extracts. I. Standardization and antioxidative properties of ethanolic and aqueous derivatives. **Z. Naturforsch.**, Berlin, v.48c, p.851-857, 1993.
- VOLPERT, R., ELSTNER, E. F. Biochemical activities of propolis extracts. II. Photodynamic activities. **Z. Naturforsch.**, Berlin, v.48c, p.858-862, 1993.
- WALKER, P., CRANE, E. Constituents of propolis. **Apidologie**, Paris, v.18, p.327-334, 1987.
- WILKINSON, J.B., MOORE, R. J. **Cosmetologia de Harry**. Madrid: Diaz de Santos, 1990. 1039 p.
- WINTSON, M.L. **The Biology of the Honey Bee**. London: Havard University Press. 1987, 281p.

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. S. Paulo**, São Paulo, v.30, p.19-21, 1994.

WOISKY, R.G. Métodos químicos para controle de amostras de própolis. São Paulo, 1996. 74p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).