

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO**

ERIKA TAYSE DA CRUZ ALMEIDA

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE TINTURA E
EXTRATOS SECOS DE PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS**

**Maceió, AL
2013**

ERIKA TAYSE DA CRUZ ALMEIDA

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE TINTURA E
EXTRATOS SECOS DE PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção parcial do grau de Mestre em Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Delgado da Silva

**Maceió, AL
2013**

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
BIBLIOTECA CENTRAL
DIVISÃO DE TRATAMENTO TÉCNICO
Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

A447c Almeida, Erika Tayse da Cruz.
Caracterização físico-química e microbiológica de tintura e extratos secos de própolis vermelha de Alagoas / Erika Tayse da Cruz Almeida. – 2013.
143 f.: il.

Orientador: Ticiano Gomes do Nascimento.
Coorientadora: Maria Cristina Delgado da Silva.
Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Alagoas.
Faculdade de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Maceió, 2013.

BIBLIOGRAFIA: f. 108-128.
Apêndices: f. 129-143.

1. Própolis vermelha – Produtos. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência. 3. Flavonóides. 4. Liofilização. 5. Spray-drying. 6. Própolis vermelha – Atividade antibacteriana. I. Título.

CDU: 612.39:638.135



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

Campus A. C. Simões
BR 104, km 14, Tabuleiro dos Martins
Maceió-AL 57072-970
Fone/fax: 81 3214-1160



**PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE QUALIFICAÇÃO DE
DISSERTAÇÃO**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE
TINTURA E MICROENCAPSULADOS DE PRÓPOLIS VERMELHA DE
ALAGOAS**

por

ERIKA TAYSE DA CRUZ ALMEIDA

A Banca Examinadora, reunida aos 11 dias do mês de março de 2013, considera
o candidato: **APROVADA.**

Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento
Escola de Enfermagem e Farmácia/Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas
(Orientador)

Prof. Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior
Escola de Enfermagem e Farmácia/Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas
(Examinador)

Prof. Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior
Escola de Enfermagem e Farmácia/Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas
(Examinador)

A toda minha família,
em especial,
ao meu dad e a minha mamili, José e Neide
Por estarem sempre ao meu lado, me incentivando e apoiando...
Com todo meu amor
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Se vencemos, Alguém esteve conosco. Se nada conseguimos, Ele continua junto de nós. Se persistimos, vemos realmente que Quem nos fez continuar, sorrirá para nós, mesmo que Dele, na felicidade, nos tenhamos esquecido. Agradeço à Deus por estar sempre presente em minha vida, e tornar sonhos em realidade.

Aos meus pais, que não mediram esforços para que eu alcançasse mais uma etapa de minha vida, por ensinarem à superar obstáculos com perseverança, aprender com os erros e nunca desistir de meus ideais.

À minha família, que mesmo distante, me apoiam.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento, pela dedicação, suporte e oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

À minha co-orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Maria Cristina Delgado da Silva, pelas trocas de ideias, colaboração e incentivo.

Ao Victor Andrade pela amizade e pela troca de conhecimentos importantíssimos que influenciaram neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior por disponibilizar o spray dryer e ao Danilo pelo suporte e auxílio.

À Prof^ª. Dr^ª. Camila Dornelas por disponibilizar o dissolutor.

Ao Prof. Dr. Josealdo Tonholo pelo apoio na realização da Microscopia Eletrônica de Varredura.

Aos professores Dr. Pierre Barnabé Escodro e, novamente, ao Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior, a Dr^ª. Camila Dornellas por aceitarem participar da banca de qualificação, pré-defesa e defesa e por avaliarem o trabalho contribuindo para melhorá-lo.

À todos estagiários do Laboratório de Análises Farmacêutica e Alimentícia (LAFA) e do Laboratório Controle de Qualidade de Alimentos (LCQA) , em especial, Marcos, Rodolfo, Lucas, Izaias, Cantídio, Michelle, Rozália, Juliana, Amália, Bruna, Lene, Adélia, Louise e Wanessa, pela colaboração, ensinamentos e amizade.

A todos os meus amigos que caminharam comigo, que ajudaram a enfrentar e superar obstáculos. Em especial, as minhas melhores amigas, as Tonhas: Danielle, Adriana, Sayonara, Marta, Deyse, Clarissa, Laís, Leilah, Thayla e Lisyanne.

À CAPES pelo suporte financeiro.

Enfim, a todos que acreditaram em mim e que direta ou indiretamente contribuíram para a realização de mais uma meta.

Muito Obrigada!

De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...
Portanto devemos fazer:
Da interrupção, um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura... um encontro!!"

(Fernando Pessoa)

RESUMO

Própolis é um produto natural com enfoque mundial em pesquisa, que, em virtude de sua composição química, em especial de flavonoides e ácidos fenólicos, é responsável por diversas atividades biológicas. As indústrias fitoterapêuticas brasileira estão desenvolvendo extratos secos de própolis, cuja concentração de flavonoides tem sido padronizada, no entanto há uma necessidade de desenvolver novos métodos químicos e físico-químicos e ensaios microbiológicos pra garantir a sua qualidade. O presente estudo teve o objetivo de caracterizar extratos secos de própolis vermelha (ESPV) através de ensaios químicos, tecnológicos e microbiológicos estabelecendo especificações de qualidade. A própolis vermelha obtida de Marechal Deodoro foi submetida a processo de extração para obtenção de extrato bruto e, em seguida, incorporado a sistemas dispersos para a obtenção de extratos secos. Duas principais técnicas, *spray-drying* (SD) e liofilização (LF), foram utilizadas na secagem e obtenção desses extratos secos na forma sólida e de liberação controlada. Os ESPVs obtidos por *spray-drying* apresentaram problemas técnicos durante processo de secagem, resultando em altos teores de flavonoides o que não aconteceu com a maioria dos ESPV liofilizados. Estudos reológicos mostraram que ESPV A-SD, ESPV C-SD, ESPV C-LF e ESPV D-LF podem ser utilizados em formas farmacêuticas sólidas, enquanto as demais, devido a pobre fluidez podem ser aplicadas em formas farmacêuticas/alimentícias dispersas. Os estudos de dissolução dos ESPV A-SD e ESPV B-SD apresentaram um modelo de liberação modificada, seguindo um perfil curvilíneo, com liberação máxima de 28% em 12 horas de ensaio. Com relação aos marcadores da própolis foi possível identificar os flavonóides, isoflavonas, flavanas, flavonóis e chalconas em extratos de própolis utilizando CLAE-UV em comparação com padrões autênticos e confirmação também foi realizada por meio de espectrometria de massa de alta resolução. A determinação de flavonóides total mostrou concentração de 21,76 mg/100 mg de flavonóides na tintura. Os extractos liofilizados mostraram menor variação em relação ao teor de flavonóides na tintura (20,50-31,61 mg/100 mg), enquanto os extratos secos por pulverização apresentaram uma maior variação no teor de flavonóides (29,99–40,79mg/100mg). Os CIMs dos extratos secos foram de 135,87-271,74 µg/mL para *Staphylococcus aureus* e de 271,74-543,48 µg/mL para *Pseudomonas aeruginosa* em 75%(6/8) das formulações.

Palavras-chave: Própolis vermelha, extratos secos, flavonoides totais, isoflavonas, CL-UV-FTEM, atividade antibacteriana.

ABSTRACT

Propolis is a natural product with has a worldwide focus into it research due to its chemical composition which is rich in flavonoids and phenolic acids responsible for various biological activities. The Brazilian phytotherapeutics industries are developing dried extracts of propolis with where the concentration of flavonoids has been standardized, however there is a need to develop new chemical, physico-chemical methods and microbiological assays to ensure its quality. The present study aimed to characterize dry extracts of red propolis (DERP) through chemical testing, microbiological and technological establishing quality specifications. The propolis obtained from Marechal Deodoro was subjected to the extraction process to obtain crude extract, and then incorporated into dispersed systems for obtaining dry extracts. Two main techniques, spray-drying (SD) and freeze-drying (FD), were used in drying and getting those dry extracts in solid and controlled release. The DERPs obtained by spray-drying technical presents problems during the drying process, resulting in high levels of flavonoids which did not happen with most DERP freeze-drying. Rheological studies have shown that DERP A-SD, DERP C-SD, DERP C-FD, DERP D-FD can be used in solid dosage forms, while others due to the poor fluidity can be applied to dosage forms/food dispersed. Dissolution studies of DERP A-SD e DERP B-SD showed a model of modified release following a curvilinear profile, with maximum 28% release within 12 hours of the test. Regarding the markers of propolis were identified as flavonoids, isoflavones, flavans, flavonols and chalcones in propolis extracts using HPLC-UV in comparison to authentic standards and confirmation was also performed by mass spectrometry with high resolution. The flavonoids determination showed overall concentration of 21.76 mg/100 mg of flavonoids in the dye. The lyophilized extracts showed less variation in relation to the content of flavonoids in tincture (20.50 to 31.61 mg/100 mg), while the spray dried extracts showed greater variation in flavonoid content (29.99 to 40.79 mg/100mg). The MICs extracts were dried 135.87 to 271.74 μ g/ml for *S. aureus* and from 271.74 to 543.48 μ g/mL *Pseudomonas aeruginosa* in 75% (6/8) of the formulations.

Keywords: Red propolis, dried extracts, total flavonoids, isoflavones, LC-UV-FTMS, antibacterial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA:

“Própolis e controle de qualidade no desenvolvimento de novos produtos: uma revisão de literatura narrativa.”

Figura 1	Ciclo biossintético dos metabólitos secundários (SIMÕES, et al., 2007).	24
Figura 2	Estrutura química básica dos flavonoides, ácidos fenólicos e terpenos, bem como, alguns exemplos.	25
Figura 3	Funcionamento interno de um espectrofotômetro (MARTINEZ, 2010).	36
Figura 4	Reação química entre flavonoides e Cloreto de Alumínio (MARCUCCI et al., 1998).	37
Figura 5	Desenho esquemático dos principais componentes da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).	38
Figura 6	Esquemática da coluna do MEV (NECKEL, 2009).	42
Figura 7	Métodos de dissolução: (A) Método do béquer, (B) Método do frasco com agitação, (C) Método da cesta rotatória, (D) Método de pás e, (E) Método de disco rotacional e estático (Aulton, 2005).	44
Figura 8	Desenho esquemático de micropartículas e microesferas (JÚNIOR-SILVA, 2005).	47
Figura 9	Diagrama de fases da água, adaptado de Aulton, 2005.	48
Figura 10	Formação de uma partícula esférica por <i>spray-drying</i> , adaptado de Aulton, 2005.	49
Figura 11	Tipos de aspersor: (A) aspersor pneumático; (B) aspersor rotatório, adaptado de Aulton, 2005.	50

ARTIGO DE RESULTADOS 1:

“Caracterização química e tecnológica de microencapsulados de própolis vermelha de Alagoas.”

Figura 1	(A) Perfil cromatográfico da tintura de própolis vermelha na concentração de 1 mg/mL. (1) catequina, (2) epicatequina, (3) ácido caféico, (4) ácido p-cumárico, (5) ácido ferúlico, (6) rutina, (7) quercetina, (8) luteolina, (9) formononetina, (10) pinocembrina, (11) biochanina A e (12) crisina; (B) Perfil cromatográfico ampliado do	80
-----------------	--	----

extrato bruto de própolis vermelha; (C) Perfil cromatográfico da tintura de própolis vermelha com a identificação de novas isoflavonas, cumarina e chalcona presente na própolis vermelha.

Figura 2 Perfil de dissolução dos microencapsulados A e B em tampão fosfato pH 7.4. Velocidade de rotação dos cestos 100 rpm sob temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. 85

Figura 3 Fotomicroscopia de Varredura Eletrônica dos Microencapsulados A, B, C e D da própolis vermelha de Alagoas obtidos por *spray-drying* e liofilização. Fotomicrografias dos microencapsulados MPV A-SD, MPV B-SD, MPV D-SD obtidos por *Spray-Dryer* com ampliação de 1000 vezes (escala 100 μm) e Microencapsulados MPV A-LF, MPV C-LF e MPV D-LF obtidos por liofilização com ampliação de 500 vezes (escala 200 μm). 86

ARTIGO DE RESULTADOS 2:

“Caracterização química e microbiológica de microencapsulados de própolis vermelha de Alagoas obtidos por *spray-drying* e liofilização.”

Figura 1 Ensaio de atividade antimicrobiana da tintura de própolis vermelha contra *Staphylococcus aureus* (A) e (B). Concentração Inibitória Mínima (CIM) usando microplacas de 96 poços para *S. aureus* e *P. aeruginosa* (C) controle, (D) tintura, (E) ESPV D-FD e (F) ESPV D-SD. Pontos azuis mostram crescimento de *S. aureus* e *P. aeruginosa* e pontos rosas nas microplacas mostram ausência de crescimento bacteriano. 95

Figura 2 (A) Perfil cromatográfico da tintura de própolis vermelha na concentração de 1 mg/mL. (1) catequina, (2) epicatequina, (3) ácido caféico, (4) ácido p-cumárico, (5) ácido ferúlico, (6) rutina, (7) liquiritigenina, (8) quercetina, (9) luteonina, (10) isoliquiritigenina, (11) formononetina, (12) pinocembrina, (13) biochanina A e (14) crisina; (B) Perfil cromatográfico ampliado do extrato bruto de própolis vermelha. 97

Figura 3 Perfil cromatográfico da (A) tintura A e (B) tintura B da própolis vermelha na concentração de 1 mg/mL usando CLAE-Orbitrap-FTEM. 98

LISTA DE TABELAS

ARTIGO DE LITERATURA:

“Própolis e controle de qualidade no desenvolvimento de novos produtos: uma revisão de literatura narrativa.”

Tabela 1	Granulometria dos pós Fontes: ANSEL; POPOVICH; ALLEN JR., 2000; PRISTA et al., 2002).	39
Tabela 2	Relação do ângulo de repouso e propriedade de escoamento. Fontes: ANSEL; POPOVICH; ALLEN JR., 2000; PRISTA et al., 2002).	40

ARTIGO DE RESULTADOS 1:

“Caracterização química e tecnológica de microencapsulados de própolis vermelha de Alagoas.”

Tabela 1	Parâmetros do método otimizado por cromatografia líquida.	73
Tabela 2	Condições de secagem por <i>Spray-dryer</i> .	75
Tabela 3	Parâmetros físico-químicos de caracterização dos microencapsulados de própolis vermelha	82
Tabela 4	Determinação da quantidade de flavonoides/substâncias fenólicas na tintura e microencapsulados de própolis vermelha.	84

ARTIGO DE RESULTADOS 2:

“Caracterização química e microbiológica de microencapsulados de própolis vermelha de Alagoas.”

Tabela 1	Identificação e confirmação de alguns biomarcadores da própolis vermelha brasileira em tintura usando CLAE-Orbitrap-FTEM	99
Tabela 2	Determinação de flavonóides totais e substâncias fenólicas na tintura de própolis e extratos secos.	101
Tabela 3	Atividade antimicrobiana da tintura (B) e extratos clorofórmico (A) and (B) de própolis vermelha contra <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> obtidas usando o ensaio de difusão em ágar.	102
Tabela 4	Atividade Antimicrobiana de diferentes extratos secos de própolis contra <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> obtidas usando ensaios de difusão em Agar e CIM	103

dos extratos secos de própolis vermelha (ESPV) usando o ensaio de micrdiluição.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL	Alagoas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APL's	Arranjos Produtivos Locais
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BP	<i>Baird Parker</i>
CATEF	Câmara Técnica de Medicamentos Fitoterápicos
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Co-A	Coenzima A
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DO	Denominação de Origem
DST	Doença Sexualmente Transmissível
GL	Gay Lussac
GSH	Glutathione
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HSV-1	Herpes Simplex Vírus tipo 1
ID	Indicação Geográfica
IFN- γ	Interferon gama
INCA	Instituto Nacional de Câncer
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
IG	Indicação Geográfica
MPV	Microencapsulado de Própolis Vermelha
NMDA	Ácido N-Metílico-D-Aspártico
OMS	Organização Mundial da Saúde
RGC-5	Células Ganglionares da Retina
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>

UV

Ultravioleta

UV-Vis

Ultravioleta-Visible

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	17
1.1	Contexto Atual	17
1.2	Problematização	17
1.3	Problemas norteadores do estudo	18
1.4	Justificativa	19
2	ARTIGO DE REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	Introdução	21
2.2	Revisão de literatura	23
2.2.1	A Própolis	23
2.2.2	Constituintes químicos	23
2.2.3	Origem e indicação geográfica	25
2.2.4	Propriedades terapêuticas	26
2.2.4.1	Atividade Antiparasitária	26
2.2.4.2	Atividade Antitumoral	27
2.2.4.3	Atividade Antifúngica	28
2.2.4.4	Atividade oftalmológicas	29
2.2.4.5	Atividade Anti-hipertensiva	29
2.2.4.6	Atividade Antihiperglicêmica	30
2.2.4.7	Atividade Antiviral	31
2.2.4.8	Atividade Antioxidante	31
2.2.4.9	Atividade Anti-inflamatória	32
2.2.4.10	Atividade antibacteriana	33
2.2.5	Metodologias analíticas de controle de qualidade	35
2.2.5.1	Doseamento de flavonoides totais	35
2.2.5.2	Cromatografia	37
2.2.5.3	Reologia dos pós	38
2.2.5.3.1	Tamanho e distribuição de tamanho das partículas	39
2.2.5.3.2	Propriedades de escoamento	39
2.2.5.3.3	Volume aparente	40
2.2.5.3.4	Densidade	40
2.2.5.3.5	Índice de <i>Carr</i>	40

2.2.5.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	40
2.2.5.5	Ensaio de Dissolução	42
2.2.5.6	Ensaio microbiológicos	44
2.2.5.7	Validação de metodologias	45
2.2.6	Metodologias analíticas de desenvolvimento de opoterápicos	46
2.6.1	Liofilização	47
2.2.6.2	<i>Spray-Drying</i>	49
	REFERÊNCIAS	51
3	COLETÂNEA DE ARTIGOS	70
3.1	Artigos de Resultados 1:“Caracterização química e tecnológica de microencapsulados de própolis vermelha de Alagoas.”	70
3.2	Artigos de Resultados 2:“ Caracterização química e microbiológica de extratos secos de própolis vermelha de alagoas.”	88
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	107
	REFERÊNCIAS	108
	APÊNDICES	129

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Contexto Atual

A comercialização de produtos obtidos da abelha (*Apis mellifera*) como o mel e a própolis vem se tornando frequente no Brasil, visivelmente, perceptível com a crescente implantação de micro indústrias de produtos a base de mel e própolis (SEBRAE, 2006). O uso popular cada vez crescente de própolis e seus derivados (elixir, unguentos, pastas, tinturas) com ação antimicrobiana (SFORCIN, et al., 2000), anti-inflamatória (KHAYYAL et al., 1993), antiviral (VYNOGRAD et al., 2000), anticarcinogênica (BAZO et al., 2002) e imunomodulatória (SFORCIN et al., 2002) vem demonstrando o grande poder terapêutico em substituição aos medicamentos sintéticos convencionais (TOMAZZONI et al., 2006).

Segundo a Câmara Técnica de Medicamentos Fitoterápicos, CATEF, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, a própolis é um produto natural de características resinosas e composição variável, coletada de várias espécies vegetais e que sofre modificação pela adição de secreções salivares da abelha, sendo, portanto, a própolis classificada como um opoterárico (BRASIL, 2004b).

A própolis brasileira é classificada em grupos de acordo com suas características físico-químicas, que é diretamente influenciada com a planta utilizada pelas abelhas para coleta das resinas e exsudatos e, que conseqüentemente, influencia nas suas propriedades terapêuticas. Até a pouco tempo atrás, existiam 12 grupos, recentemente, foi descoberta uma nova variedade de própolis, a própolis vermelha (grupo 13), que é encontrada em áreas de manguezal do litoral e de margens de rios no nordeste, sendo esta provinda de exsudatos do caule de *Dalbergia ecastophyllum* (DAUGSCH et al., 2008). A própolis vermelha de Alagoas vem se destacado por apresentarem quantidade de flavonoides superior e, também, por apresentarem alguns compostos exclusivos (OLDONI, 2007).

1.2 Problematização

Em decorrência de suas propriedades terapêuticas, a própolis vem sendo empregada nas indústrias alimentícia, cosmética e, principalmente, farmacêutica (SEBRAE, 2006). E como quaisquer produtos comercializados no país são necessários requisitos mínimos de qualidade; como medicamento, tais requisitos requerem uma matéria-prima que apresente

atividade terapêutica adequada e metodologias de controle de qualidade químico, microbiológico, farmacológico e toxicológico validadas, sendo uma das ferramentas imprescindíveis para o registro de novos medicamentos (BRASIL, 2004a). O desenvolvimento de produtos requer um controle de qualidade desde as matérias-primas até a obtenção de um produto acabado. Ainda mais, quando envolve produtos inovadores, como a obtenção de formulações à base de própolis vermelha de Alagoas com liberação controlada. E por ser um produto inovador, os ensaios iniciais devem ser extremamente, rigorosos, para que, as etapas complementares dos estudos pré-clínicos físico-químicos e microbiológicos sejam condizentes e, portanto, sirvam de estrutura base para outros ensaios decisivos para a liberação do produto para sua comercialização (BRASIL, 2004a).

1.3 Problemas norteadores do estudo

A garantia do uso seguro e eficaz de fitoterápicos/nutracêuticos envolve análises de aspectos físico-químicos e microbiológicos de matérias-primas e de produtos intermediários (tintura e extratos) e acabados (cápsulas), como etapa preliminar para alcançar um padrão de qualidade necessário a um produto (KLEIN et al., 2009). Ou seja, os requisitos que permeiam a obtenção de registros, referentes à produção de novos produtos medicamentosos destinam-se à comprovação da eficácia terapêutica, da qualidade da matéria-prima e do produto final, e estudos de toxicidade que definam o grau de risco do produto (FREITAS, 2007).

A própolis, apesar de suas propriedades terapêuticas importantes, apresentam características organolépticas que afastam a sua utilização e, uma das soluções alternativas para atenuar o sabor amargo e o cheiro forte e desenvolver um produto intermediário que facilite a produção de produtos acabados, é a microencapsulação, que pode ser obtidos por *spray-drying* e liofilização (Diário da Saúde – RS, 2010). Então, os problemas norteadores do estudo giram em torno da ausência de monitoramentos físico-químicos e microbiológicos de microencapsulados à base de própolis vermelha de Alagoas, problemas esses, importantíssimos, que se resolvidos, permitirão um controle de qualidade e, até, uma futura padronização de fitoterápicos/nutracêuticos, a fim de obter produtos com constância de composição e propriedades terapêuticas reproduzíveis.

1.4 Justificativa

O desenvolvimento de novos produtos medicamentosos de origem vegetal e/ou animal requer o uso de metodologias biológicas e/ou bioanalíticas devidamente validadas para caracterizar as ações terapêutica/toxicológica de substâncias bioativas presentes na própolis em discussão. Além de que, trata-se de uma exigência legal, RDC nº 17/2000 (BRASIL, 2000), ao qual foi revogada pela RDC nº 48/2004, que visa normatizar o registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil e estabelece padronização do fitoterápico de modo a garantir a qualidade desde a coleta, *screening* fitoquímico, teste de autenticidade, determinação qualitativa e quantitativa de marcadores fitoquímicos, processamento, produção, estudo de estabilidade, validação de metodologias analíticas e bioanalíticas, embalagens e controle de qualidade de produto (BRASIL, 2004a). Os medicamentos apiterápicos (à base de extratos de origem animal), também, estão regulados pela ANVISA, RDC nº 132/2003 (BRASIL, 2003).

As estratégias de desenvolvimento de novos produtos de origem natural vêm contribuir para o fortalecimento da Política Nacional de Práticas Integrativas e complementares do Ministério da Saúde - Portaria ministerial nº 971/2006 (BRASIL, 2006a), dos Arranjos Produtivos Locais (APL's), do fortalecimento de Pequenas e Médias empresas no país contribuindo com a geração de emprego e renda, fortalecimento da agricultura familiar, com o desenvolvimento sustentável da região e a preservação do meio ambiente (FALCÃO, 2009). Estes estudos servirão de apoio para introduzir no mercado bioprodutos a base de própolis vermelha de Alagoas com qualidade assegurada, pois será possível, por exemplo, biomonitorar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) das formulações farmacotécnicas, etapa esta, significativa, para a realização de futuros ensaios pré-clínicos *in vivo*.

Com essa breve exposição, esta dissertação está dividida em:

- Revisão de literatura intitulada: “**Própolis e controle de qualidade no desenvolvimento de novos produtos: uma revisão de literatura narrativa**”, onde é apresentado o conhecimento acerca da própolis, bem como, dos métodos de preparo de microencapsulados e das metodologias utilizadas no controle de qualidade da matéria-prima e produtos intermediários e acabados;

Dois artigos de resultados, intitulados:

➤ **“Caracterização química e tecnológica de microencapsulados de própolis vermelha de Alagoas”**, ao qual contempla, desde a preparação das formulações até à obtenção dos microencapsulados e cápsulas, bem como o controle de qualidade desses produtos intermediários através de ensaios químicos (teor de flavonoides dos microencapsulados, teor de flavonoides da dissolução), devidamente validados e ensaios tecnológicos (reologia e dissolução);

➤ **“Caracterização química e microbiológica de microencapsulados de própolis vermelha de Alagoas obtidos por *spray-drying* e liofilização”**, artigo este, focado nos ensaios microbiológicos (atividade microbiológica preliminar, Concentração Inibitória Mínima, CIM, e Concentração Bactericida Mínima, CBM).

2.1 Introdução

A utilização e abordagem de produtos naturais pela população sejam eles, alimentos funcionais, nutracêuticos ou fitoterápicos, como fonte de produtos saudáveis/terapêuticos, vem se tornando crescente em substituição aos produtos sintéticos (TOMAZZONI et al., 2006).

Ultimamente, a própolis vem sendo um dos principais enfoques mundiais em pesquisas. Considerada um alimento funcional, utilizado na medicina popular desde os tempos remotos (AGUIAR et al., 2003), a cola das abelhas, como, também, é conhecida, apresenta diversas substâncias que são responsáveis por muitas atividades terapêuticas (KHAYYAL et al., 1993; VYNOGRAD et al., 2000; SFORCIN, et al., 2000, 2002; BAZO et al., 2002; CUNHA et al., 2004; MATSUI et al., 2004; INOCUCHI et al., 2006; MARUYAMA, et al., 2009; FONSECA et al., 2010)

No Brasil, há uma classificação das própolis, o último grupo inserido é conhecido, como grupo 13, que é encontrada nos estados da Bahia, Paraíba, Sergipe, Pernambuco e Alagoas (DAUGSCH et al., 2008). A própolis vermelha de Alagoas é diferenciada, pois contém quantidade superior de flavonoides, principal classe de compostos químicos responsáveis pela maioria das atividades biológicas e, presença, combinada, de sete substâncias exclusivas, são elas, metil-o-arselinato, metil abietato, 2,4,6-trimetilfenol, 7,4'-diidroxiflavona, homopterocarpina, medicarpina e 4',7-dimetoxi-2'-isoflavonol, sendo as três últimas majoritárias (ALENCAR et al., 2007).

Estabelecer um controle de qualidade de matéria-prima, ainda mais, sendo esta, oriunda da coleta de fontes de origem vegetal, é, sem dúvida, o ponto inicial para desenvolver produtos intermediários e finais com qualidade assegurada. Um controle da matéria-prima permite, inicialmente, identificar e, até, quantificar substâncias contidas, com o auxílio, por exemplo, de ensaios por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à um Espectrômetro de Massas, CLAE-EM, e, através de ensaios microbiológicos, determinar uma possível atividade contra uma espécie de bactéria. Da mesma forma, o controle de qualidade dos produtos intermediários e finais é importantíssimo, pois após processamentos de secagens distintos, é possível avaliar os prós e contras, por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura para verificar tanto a homogeneidade quanto o tamanho das partículas, bem como, com os dados provenientes da matéria-prima é possível comparar e compreender as

consequências que um determinado processo implica, tal como, verificar, quantitativamente, ganhos ou perdas de teores das principais classes químicas por meio de Espectrofotometria de Ultra-Violeta e, ainda, entender, por exemplo, a influência que certos excipientes adicionados à formulações tem, na produção de microencapsulados de liberação modificada.

Então, um bom conhecimento sobre, tudo, que envolve o produto final, desde a composição química do produto *in natura*, passando pelos processos de transformações empregados, até às metodologias analíticas e microbiológicas utilizadas para se controlar a qualidade, é bastante significativa.

2.2 Revisão de literatura

2.2.1 A Própolis

Etimologicamente, o termo própolis é derivado do grego, cujo prefixo “pro” refere-se em frente, na entrada, enquanto, a palavra “polis” significa comunidade ou cidade. Esta nomenclatura foi, assim, atribuída, em virtude à eficiência na participação desta substância na defesa da colmeia das abelhas (CASTALDO; CAPASSO, 2002), essa material, portanto, protege a colônia contra a invasão de outros insetos e de micro-organismo; repara frestas e buracos presentes na parede da colmeia; prepara locais assépticos, para que ocorra a postura pela abelha rainha; e, mumifica cadáveres de invasores (MARCUCCI, 1995). Trata-se de um material resinoso, de coloração variada, de consistência cerosa produzida por abelhas melíferas (*Apis mellifera*) a partir de várias partes de plantas. Esta resina é mastigada e durante a mastigação é adicionado enzimas salivares e cera (GHISALBERTI, 1979).

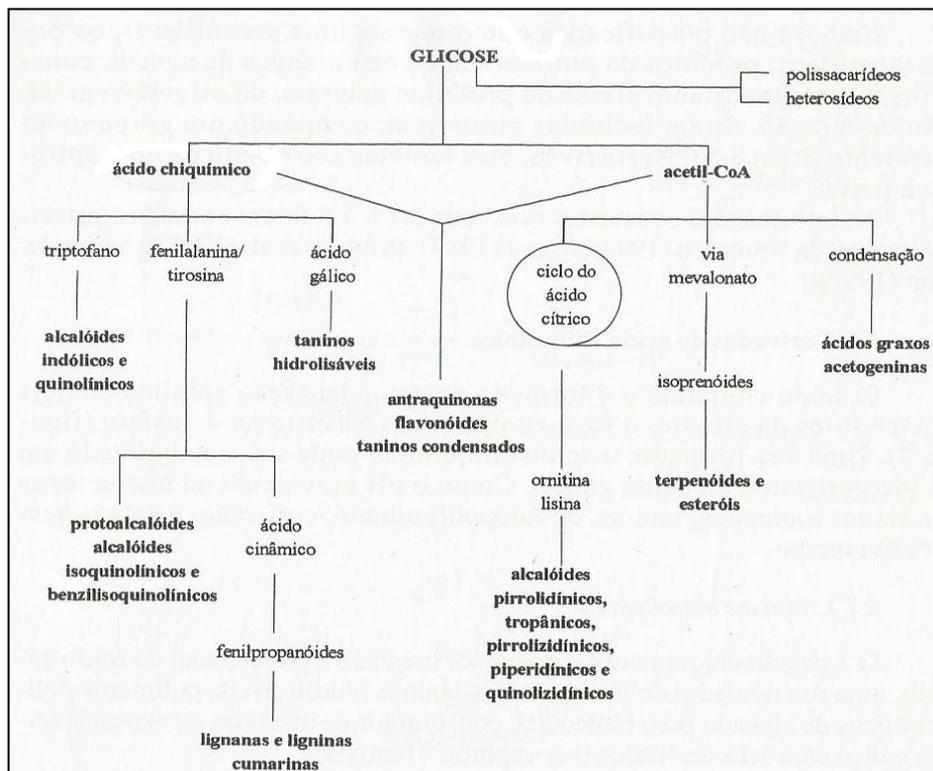
2.2.2 Constituintes químicos

A própolis brasileira é classificada em grupos de acordo com suas características físico-químicas, até o momento, existem 13 grupos diferentes de própolis, porém, acredita-se que, ainda, há uma subestimação das variedades de própolis, até porque, a flora brasileira apresenta uma imensa diversidade, das quais as abelhas podem coletar (PARK et al., 2000). No Brasil a principal fonte vegetal coletada por esses insetos para a produção da própolis verde é da espécie *Baccharis dracunculifolia* (SALATINO et al., 2005), na Bahia, a origem botânica da própolis marrom é *Hyptis divaricata*, enquanto, na região Sul é provinda da *Populus alba* (PARK et al., 2002a) e para elaboração da própolis vermelha, as abelhas utilizam exsudatos do caule de *Dalbergia ecastophyllum*, popularmente, conhecida como “rabo de bugio” (DAUGSCH et al., 2006). Assim, além da origem botânica (BANKOVA et al., 2000), a composição química depende, fortemente, da estação do ano (SFORCIN et al., 2000).

Geralmente a própolis é composta por 50% de resinas e bálsamos, 30% de cera, 10% de essência e óleos aromáticos, 5% de pólen, e 5% de outras substâncias (contidas principalmente na resina), como ácidos alifáticos, ésteres, ácidos aromáticos, ácidos graxos, carboidratos, aldeídos, aminoácidos, cetonas, chalconas, diidrochalconas, terpenóides, vitaminas (B1, B2, B6, C e E) e minerais (alumínio, antimônio, cálcio, céσιο, cobre, ferro,

lítio, manganês, mercúrio, níquel, prata, vanádio e zinco) (ALMEIDA; MENEZES, 2002). Os constituintes químicos do mel e da própolis vêm sendo identificados no mundo inteiro (GARDANA et al., 2007). Até o momento, na própolis existem mais de 300 metabólitos secundários identificados (ISHIHARA et al., 2009). É importante ressaltar que, compostos fenólicos, caracterizada pela presença de um ou mais anéis aromáticos e ao menos uma hidroxila, tais como, flavonoides e ácidos fenólicos, bem como, os terpenos, obtidos a partir da junção de duas ou mais unidades da molécula do isopreno, são as principais classes fitoquímicas encontradas e utilizadas para rastrear a qualidade e, em alguns casos, para demonstrar a autenticidade da própolis de algumas regiões geográficas (VOLPI; BERGONZINI, 2006). Como demonstrado na Figura 1, tais classes fitoquímicas são produzidas a partir do metabolismo da glicose, através de dois importantes intermediários, o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico, de modo geral, origina os aminoácidos aromáticos, precursores de uma gama de metabólitos secundários aromáticos, o acetato é responsável pela biossíntese de aminoácidos alifáticos, bem como, de alcalóides dele derivados, terpenóides, esteróis, ácidos graxos e triglicerídeos, enquanto que, antraquinonas, flavonoides e taninos condensados são derivados das duas vias metabólicas (SIMÕES, et al., 2007).

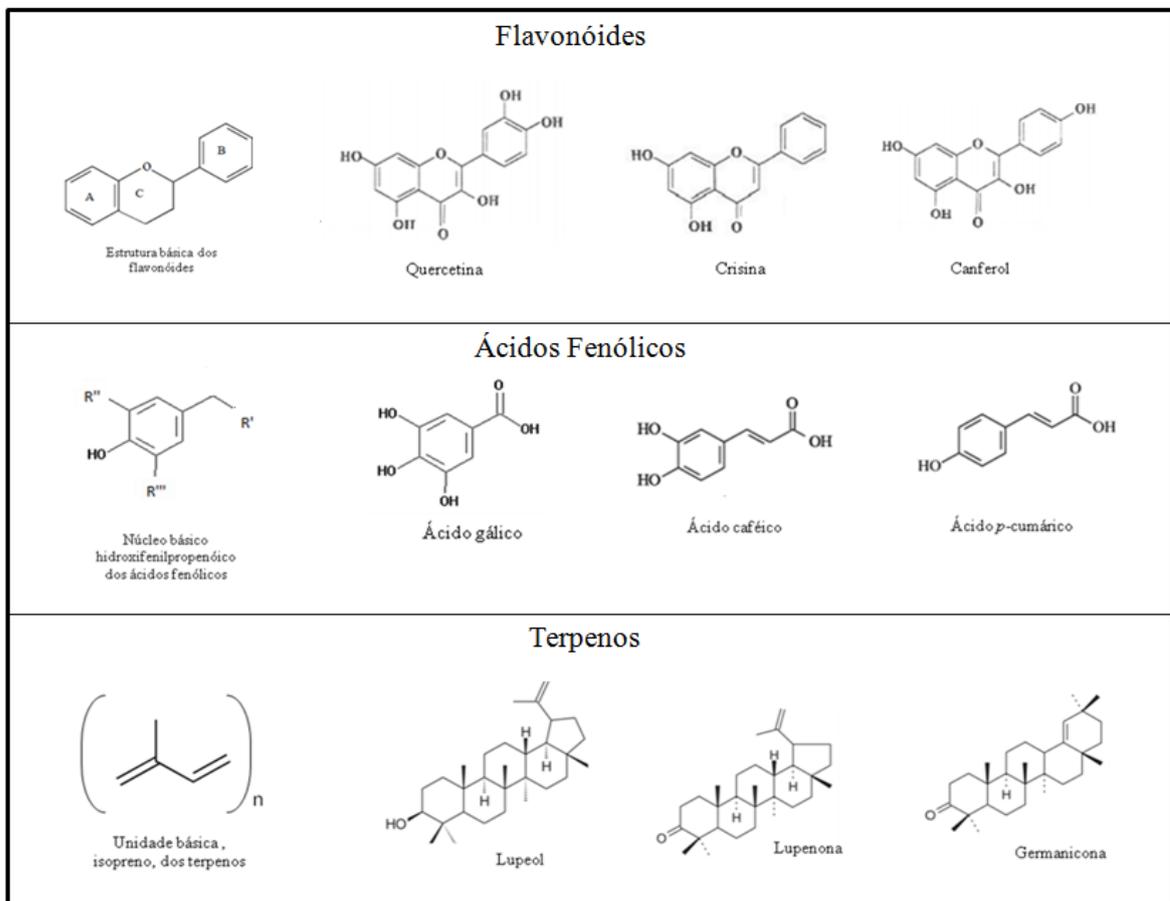
Figura 1 - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários



FONTE: SIMÕES et al., 2003.

Dentre as substâncias mais comumente utilizadas como marcadores podem ser citados: quercetina, canferol, naringenina, crisina, pinocembrina, galangina (flavonoides); ácido gálico, ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido cinâmico e derivados (ácido fenólicos); e, lupeol, lupenona, germanicon, ácido canárico (triterpenóides) (ALBUQUERQUE et al., 2007). A Figura 2 demonstra a estrutura básica de cada classe e, também, exemplifica a estrutura química de algumas substâncias.

Figura 2 - Estrutura química básica dos flavonoides, ácidos fenólicos e terpenos, bem como, alguns exemplos.



FONTE: COSTA et al., 2009.

2.2.3 Origem e indicação geográfica

Segundo, Instituto Nacional de Propriedade Industrial, INPI, Indicação Geográfica (IG) engloba o conceito de origem geográfica, ou seja, IG é um termo destinado a produtos que a apresentam uma origem geográfica específica e que possuem características próprias atribuídas ao lugar de origem, em virtude, por exemplo, de fatores específicos locais, tais como, clima, solo e vegetação (INPI, 2012).

Recentemente, foi concedida a certificação de Indicação Geográfica da própolis vermelha dos manguezais de Alagoas, válida internacionalmente, por ser uma própolis peculiar, foi reconhecida como puramente alagoana, na modalidade de Denominação de Origem (DO), bem como, os registros concedidos aos produtos foram “Própolis Vermelha” e “Extrato de Própolis Vermelha.” (Agência SEBRAE de Notícias AL: Os pequenos negócios em pauta, 2012).

2.2.4 Propriedades terapêuticas

A descoberta de moléculas e seus alvos terapêuticos para cura das doenças é uma prática contínua na humanidade. A busca por novas moléculas que tenham eficácia terapêutica e baixas reações adversas ou efeitos colaterais é prática comum das sociedades contemporâneas (SIMÕES et al., 2007).

O uso de agentes terapêuticos de origem natural que em sua composição apresentam mais de uma substância com atividade terapêutica vem sendo utilizada pela população mundial desde a antiguidade (JÚNIOR-VIEGAS et al., 2006). A presença de vários flavonoides e ácidos fenólicos em extratos e tinturas de própolis mostram que estas substâncias agem sinergicamente em ação citostática/citotóxica, anti-inflamatória, cicatrizante, antimicrobiana e antioxidante (AMOROS et al, 1992). Desta forma, um coquetel de substâncias que apesar de estarem em baixas concentrações, mas de forma combinadas, irão promover um potente ação contra os agentes patogênicos (KROL et al., 1993).

A seguir encontram-se todas as informações pertinentes às atividades terapêuticas da própolis brasileira, bem como, algumas fundamentações teóricas a cerca das doenças em questão.

2.2.4.1 Atividade Antiparasitária

Primeiramente, define-se parasitismo como associação entre seres vivos com unilateralidade de benefícios, sendo o hospedeiro um dos associados e o prejudicado na associação, pois fornece todo o aporte ao parasita, enquanto que, a parasitose é o estado de infecção que agride o hospedeiro (NEVES, 1997).

As parasitoses intestinais, tais como, helmínticas e protozooses, representam a doença mais comum do globo terrestre, consistindo, importantes problemas de Saúde Pública, até

porque, em alguns países em desenvolvimento são consideradas endêmicas (MONTEIRO et al., 1986; WHO, 1987; MONTEIRO et al., 1995).

Além dos convencionais medicamentos alopáticos (NEVES, 1997), os produtos naturais são alternativos contra parasitas (BARBOSA et al., 2007). E estudos mostram a utilização da própolis como possível fitomedicamento na erradicação do agente causador.

Ayres et al., 2007, em estudo, *in vitro*, pioneiro de investigação do efeito de extratos etanólicos de própolis brasileira sobre formas promastigotas, amastigotas extracelulares e macrófagos peritoneais infectados de *Leishmania amazonensis* observaram que, esses extratos foram capazes de reduzir a carga parasitária, e, ainda, destacaram a importância da própolis vermelha de Alagoas, como o extrato mais ativo contra *L. Amazonensis*, em virtude da alta concentração de benzofenonas prenilados.

Cunha et al., 2004 pesquisaram, *in vitro*, a atividade da própolis contra a forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* e observaram que o método de extração das substâncias químicas da resina influencia diretamente na atividade tripanocida. Extrato etanólico de própolis verde brasileira, segundo estudos elaborados por Salomão et al., 2009, poderia ser um bloqueador potente da metaciclo gênese, considerando seu efeito sobre reservosomos, que são uma importante fonte de energia durante a diferenciação do parasita.

2.2.4.2 Atividade Antitumoral

Segundo o Instituto Nacional de Câncer, INCA, câncer é um termo dado a um conjunto de mais de cem doenças que apresentam em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos e, que podem se espalhar para outras regiões do corpo, enquanto que tumor trata-se do acúmulo de células cancerosas. O seu aparecimento e desenvolvimento estão relacionados ao estilo de vida das pessoas e aos fatores ambientais a que elas se expõem (INCA, 2012).

De acordo com as estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer (INCA, 2011).

A escolha do tratamento depende de uma série de fatores que incluem tipo, tamanho, região e extensão do câncer, bem como, do estado geral do paciente. Cirurgia, quimioterapia e radioterapia constam-se como tipos de tratamentos, que podem ser ministrados isoladamente

ou em combinações, objetivando o controle da doença, diminuição dos sintomas e melhora da qualidade de vida do mesmo. O grande problema desses tratamentos é que, além de destruírem células cancerosas, acabam lesionando, células saudáveis (INCA,2012).

Nos últimos anos, fitoterápicos, nutracêuticos e alimentos funcionais vêm sendo considerados como uma opção mais acessível de prevenção e, até, de tratamento contra o câncer (BRASIL, E. et al., 2008) e, estudos demonstram que a própolis pode ser uma alternativa.

Em estudos *in vitro* realizados por Búfalo et al., 2009, verificaram-se que a própolis verde apresenta efeito citotóxico contra células de carcinoma epidermóide de laringe humana, de forma dose tempo-dependente, ou seja, maiores concentrações de própolis apresentaram ação a curto prazo, enquanto que menores concentrações foram eficazes com o tempo, e, o efeito antitumoral foi atribuída ao ácido caféico fenetil éster.

Franchi et al., 2011, ao comparem os efeitos de extratos etanólicos de própolis brasileira, verificaram a elevada capacidade citotóxica de células leucêmicas humanas da própolis vermelha em relação a verde, supondo que a própolis vermelha pode conter substâncias capaz de inibir o crescimento de células cancerosas.

Em outro estudo pioneiro, *in vivo*, foi verificado que própolis é rica em derivados do ácido cinâmico: baccarina e drupanina, e tais substâncias demonstraram que são responsáveis pela indução da apoptose em linhas celulares de vários tumores, suprimindo o crescimento do tumor em camundongos com sarcoma aloenxertada (MISHIMA et al., 2005).

2.2.4.3 Atividade Antifúngica

Dota et al., 2010, constataram a inibição *in vitro* de todas as espécies de leveduras *Candida albicans* e não *Candida albicans* (*C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis*) frente à extrato etanólico de própolis e micropartículas de própolis.

Candidíase é uma micose oportunista, cujo agente etiológico pertence ao gênero *Candida*, declarada como Doença Sexualmente Transmissível (DST) sendo, a *C. albicans* o principal agente causal, pode provocar lesões brandas, agudas ou crônicas, superficiais ou profundas, e de espectro clínico bem variável. A *C. albicans* é um dos principais agentes de interesse clínico (BARBEDO; SGARBI, 2010).

2.2.4.4 Atividade oftalmológicas

A visão é, sem dúvida, um dos mais importantes sentidos no desenvolvimento físico e cognitivo normal de um indivíduo, em especial, das crianças. O desenvolvimento motor e, também, a capacidade de interação são prejudicados com a deficiência visual, visto que, gestos e condutas sociais são aprendidos pelo *feedback* visual (GRAZIANO; LEONE, 2005). Assim sendo, os problemas visuais são responsáveis por grande parte de evasão e repetência escolar, pelo desajuste individual no trabalho, por limitações na qualidade de vida, etc. (BRASIL, 2007). A promoção da saúde ocular e a prevenção de doenças visuais consistem na forma mais fácil de reduzir o índice de cegueira evitável (TEMPORINI; KARA-JOSÉ, 1995), porém, sabe-se que, essa questão não é bem desenvolvida e incentivada, e o tratamento com medicamentos é uma das alternativas não invasivas que podem amenizar sintomas, e, até curar (TEMPORINI; KARA-JOSÉ, 2004).

A própolis verde, em ensaios *in vivo*, foi capaz de inibir danos na retina, após indução intravítrea por injeção de NMDA (Ácido N-Metílico-D-Aspártico) em camundongos, já em estudos *in vitro*, este tipo de própolis conseguiu proteger células ganglionares da retina (RGC-5) contra H₂O₂ (Peróxido de Hidrogênio) e estaurosporina induzida, ambas responsáveis por ocasionar danos na retina (como apoptose e necrose), assim sendo, Inocuchi et al., 2006, indicaram que a própolis inibe a lesão neuronal *in vitro* e *in vivo*.

2.2.4.5 Atividade Anti-hipertensiva

Define-se Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) como condição clínica provocada por diversos fatores de risco e caracteriza-se por níveis elevados e sustentados de pressão arterial. Esta associada às modificações das funções e/ou das estruturas dos órgãos-alvo (coração, cérebro, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, aumentando, consequentemente, o risco de eventos não fatais e a mortalidade cardiovascular. (SBC, Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010).

Recomendações não medicamentosas, ou melhor, mudanças na qualidade de vida são, sem dúvida, a melhor estratégia na prevenção e, até, tratamento da hipertensão, porém, na maioria dos casos, faz-se necessária implantação de medidas medicamentosas de caráter sintético (SBC, 2010) e, também, natural (BRASIL, E. et al., 2008).

A própolis verde apresentou efeitos anti-hipertensivos em ratos espontaneamente hipertensos, por ação vasodilatadora, e foi verificado que os componentes ativos são quatro flavonoides: dihidrocanferida, isosacuranetina, betuletol e canferida (MARUYAMA, et al., 2009).

Ácidos di e tri-cafeoilquínicos (CQAs) foram encontrados para ser componentes característicos de própolis etanólica. 3,4-diCQA, 3,5-diCQA e 3,4,5-triCQA contribuíram para o efeito anti-hipertensivo do extrato de própolis (MATSUI et al., 2004).

2.2.4.6 Atividade Antihiperglicêmica

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), hiperglicemia é o aumento de glicose presente na circulação sanguínea, a sociedade considera que níveis superiores a 126 mg em jejum e níveis superiores a 200 mg em qualquer situação correspondem a indicativos de diabetes e diagnóstico, respectivamente. Este aumento de glicose no sangue pode ser resultante de defeitos de secreção e/ou ação da insulina que inclui alterações patogênicas específicas, tais como, destruição das células beta do pâncreas, resistência à ação da insulina, distúrbios da secreção da insulina e da atividade de algumas glicosidases (maltase, sacarsase e glicoamilase), entre outras. Assim como a hipertensão, nem sempre, mudanças no estilo de vida são eficazes no tratamento, há a necessidade, portanto, de tratamento convencional, ou seja, medicamentoso sintético e natural (BRASIL, 2006b; BRASIL, E. et al., 2008).

Em estudos, *in vivo*, realizados em ratos demonstraram um potente efeito antihiperglicêmico. Sendo o composto ativo ácido 3,4,5-tri-cafeoilquínico como candidato de destaque que exerce o efeito e mostra uma inibição específica na maltase. (MATSUI et al., 2004). A maltase é uma enzima responsável pela hidrólise de maltose em duas moléculas de glicose, quando inibida, retarda a digestação de carboidratos e, assim, controla os níveis de glicose no sangue após as refeições (MELO et al., 2006).

Zhu et al., 2010, realizaram um estudo testando os efeitos das própolis brasileira e chinesa em ratos com Diabetes *Mellitus* tipo 1 induzida por streptozotocina, e, observaram que, ambas as própolis inibiram, significativamente, a perda de peso corporal e o aumento da glicose no sangue desses ratos e que isso, seria resultante do efeito antioxidante.

2.2.4.7 Atividade Antiviral

Shimizu et al., 2011, ao caracterizarem tratamentos experimentais em camudongos infectados com Herpes Simples Vírus tipo 1 (HSV-1) com própolis, constataram a atividade não só anti-HSV-1, mas também atividade imunológica contra infecção trandermal HSV-1. Segundo os autores, a atividade imunológica está associada com a produção de interferon gama (IFN- γ) na indução de linfócitos T auxiliares, informação esta, importante, para a elucidação de várias ações farmacológicas de própolis na saúde e na doença.

Um ponto importante, marcou o estudo de Takemura et al., 2011, sobre a hipótese dos efeitos anti-influenza de própolis é que o 3,4-ácido dicafeoilquínico é a substância que pode desencadear ou aumentar os mecanismos de auto-defesa. Os vírus são as menores partículas infecciosas, que possui um único tipo de ácido nucleico, desoxirribonucleico (DNA) ou ribonucleico (RNA), tratam-se de verdadeiros parasitas, pois necessitam de células hospedeiras para sua replicação; as células aos quais os vírus infectam e a resposta do sistema imune do organismo ditam a natureza da manifestação clínica (MURRAY et al., 2006).

O Herpes Simples é uma doença infectocontagiosa crônica, cujo material genético é o DNA, a infecção pode permanecer latente por longos períodos ou ser recorrente. O agente etiológico apresentam dois genótipos o tipo 1 (HSV-1) associado ao herpes labial ou extragenital e o tipo 2 (HSV- 2) que determina lesões perigenitais (LUPI, 2000).

O vírus da Influenza contém como material genético RNA de fita simples, é transmitido por inalação de gotículas expelidas durante a tosse e espirro e pelo contato direto com superfícies contaminadas, a depender, do sistema imune do indivíduo e da virulência do parasita, os sintomas podem ser leves ou graves (BRASIL, 2002).

2.2.4.8 Atividade Antioxidante

O termo radical livre é direcionado a qualquer átomo, molécula ou fragmento de molécula que contém um ou mais elétrons desemparelhados nas últimas camadas eletrônicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). A geração de radicais livres *in vivo* se dá através da via de ação catalítica de enzimas, durante a transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição à fatores exógenos. Contudo, apesar da existência de mecanismos de defesa ou mecanismos antioxidantes, estes podem apresentar-se insuficientes e/ou ineficazes, e a concentração desses radicais pode aumentar (CERUTTI, 1991; 1995),

quando esse desequilíbrio acontece, ocorre o estresse oxidativo. E, é, justamente, esse excesso de radicais livres que promovem a oxidação de moléculas biológicas e, conseqüentemente, modificam suas características e ocasionam transtornos no metabolismo celular (CHIHUAILAF et al., 2002), provocando processos fisiopatológicos como envelhecimento, câncer, aterosclerose, inflamação, etc (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

Como há deficiência de antioxidantes endógenos, uma das alternativas é a ingestão de alimentos ricos em substâncias antioxidantes, como os flavonoides (BRASIL, E. et al., 2008).

Um trabalho desenhado por Fonseca et al., 2010, ao avaliarem a aplicabilidade potencial de dois extratos de própolis brasileira, verde e marrom, para a prevenção do estresse oxidativo na pele devido à radiação UV, observaram, através de ensaios *in vitro*, que a própolis verde apresentou atividade antioxidante maior que a própolis marrom, pois o extrato de própolis verde continha uma maior quantidade de polifenóis, cumarina, drupanina, bacarina e artepilina C do que extrato de própolis marrom, já, em ensaios *in vivo*, o tratamento oral de camundongos sem pêlo demonstrou uma recuperação de GSH (Glutationa) esgotado induzida por radiação UV, enquanto que, o pré-tratamento tópico de animais com ambas as soluções de extrato de própolis, também, recuperaram o GSH esgotados, no entanto, os tratamentos empregados não inibiu o aumento da secreção cutânea de proteinase, cuja atividade é causada por irradiação.

Em estudos realizados por Shimawava et al., 2005, realizado com ensaios *in vitro* de própolis administrados, intraperitonealmente, em camundongos foi diagnóstico efeito neuroprotetor em cultura de células PC12 (linhagem de células feocromocitoma), que agiu como um antioxidante contra a peroxidação lipídica e produção de radicais livres. Além disso, *in vivo*, a própolis, também, apresentou efeito neuroprotetor contra a lesão isquêmica (infarto cerebral e inchaço). Essas descobertas são consistentes com a observação de que a função anti-isquêmica promovida pela própolis deriva, pelo menos em parte, de suas propriedades antioxidantes e, que o ácido, 3,5-di-o-cafeoilquínico e ácido p-cumárico podem ser responsáveis por tais efeitos.

2.2.4.9 Atividade Anti-inflamatória

A inflamação é um mecanismo de defesa, desenvolvido pelo próprio organismo, a fim de combater infecções (bactérias, vírus e outros patógenos) e agressões (cortes, queimaduras e

feridas). Uma infecção, ou dano nos tecidos, promove uma indução de uma cascata complexa de eventos, conjuntamente, conhecida como resposta inflamatória, que é caracterizada por rubor, calor, inchaço, dor e, em último caso, perda de função. E estes sintomas ocorrem, em virtude, do aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular através dos capilares, aos quais permitem que moléculas maiores (fatores do complemento, anticorpos e citocinas) deixem a corrente sanguínea e atravessem a parede endotelial. Bem como, há um movimento de leucócitos da corrente sanguínea para os tecidos circundantes. Assim sendo, a elevação da temperatura e a vermelhidão do tecido (eritema) é explicado pelo aumento do volume de sangue. Enquanto que, o influxo de líquido dos capilares para os tecidos e sua acumulação (exsudado) contribui para o inchaço do tecido (edema) (CALDER, 2006; KINDT et al., 2008).

Moura et al., 2009, analisaram a função do extrato aquoso de própolis verde brasileira e, confirmaram e ampliaram descobertas anteriores de que os efeitos terapêuticos da própolis estão associados à regulação de citocinas que são secretadas por células inflamatórias no local da lesão tecidual.

2.2.4.10 Atividade antibacteriana

As bactérias são micro-organismos unicelulares, de estrutura simples, podendo apresentar-se isolados ou em colônias, que foram descobertas com o advento do microscópio. Umas, consistem como parte integrante da microbiota normal do hospedeiro, que em equilíbrio, não ocasionam danos, outras, são patogênicas, responsáveis por sérios prejuízos à saúde (MURRAY et al., 2005).

Apesar da descoberta e existência de antibióticos, o grande marco no tratamento das infecções bacterianas ocorreu em 1928, quando Alexander Fleming descobriu a penicilina. A partir daí, abriram-se caminhos a novos investimentos científicos no domínio da antibioterapia com consequente descoberta de novos antibióticos, mas, com a existência de uma gama variedade de antibióticos e uso irracional destes, surgiram o aparecimento de resistências bacterianas (PEREIRA; PITA, 2005).

Embora, os mecanismos de resistência possam variar de patógeno para patógeno, a resistência é causada por alguns fatores básicos: inativação do antibiótico, promovidas por enzimas bacterianas; modificação do alvo que leva à perda de sensibilidade ao antibiótico pela

bactéria; mudanças na bomba de efluxo e permeabilidade externa da membrana que permitem a redução da concentração do antibiótico; transmissão do alvo, ou seja, algumas bactérias se tornam insensíveis a alguns antibióticos (NIKAIDO, 2009).

E o desenvolvimento da resistência tem impulsionado a uma procura enorme por novos antibióticos, e dentre estes, destaque especial para as plantas medicinais e para os produtos de origem natural, entre eles a própolis (ADELMANN, 2005).

Várias pesquisas demonstram a atividade antimicrobiana, Castro et al., 2009, em ensaios *in vitro*, concluíram que tanto o extrato etanólico quanto a fração hexânica da própolis inibiam o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, e sugeriram que ação da atividade antimicrobiana ocorre em virtude da presença da classe de benzofenonas e não aos ácidos graxos, como alguns autores defendiam.

Daugusch et al., 2008, corroboram em estudo *in vitro* sobre a atividade antimicrobiana e, ainda ressaltaram que, essa atividade é dependente da composição química da planta utilizada pelas abelhas para a produção de própolis. Os possíveis mecanismos de atividade antimicrobiana dos compostos da própolis são: inibição da motilidade bacteriana; atuar no potencial de membrana; inibição da RNA-polimerase; desorganização da membrana citoplasmática, citoplasma e parede celular e inibição da síntese proteica (MIRZOEVA et al., 1997; TAKAISI-KIKUNI; SCHILCHER, 1994).

Em outro estudo *in vitro*, a própolis verde apresentou efeito anticariogênico, pois foi verificado que ela é capaz de inibir a produção de glicosiltransferases por *Streptococcus mutans*, enzimas responsáveis pela síntese de glucanos a partir da sacarose (LEITÃO et al., 2004).

A atividade antimicrobiana da própolis foi ativa frente à espécies bacterianas, tanto gram-positivas quanto gram-negativas (BURDOCK, 1998). Porém, Valdés et al., 1989, ao avaliarem as características da própolis de diferentes zonas de província de Havana e suas propriedades antibacterianas, comprovaram que há uma maior atividade frente às bactérias gram-positivas em relação às gram-negativas. Os prováveis mecanismos de atividade antibacteriana estão relacionados ao efeito sinérgico entre os compostos fenólicos, flavonoides e outros compostos orgânicos, principalmente pinocembrina, pinobacatina e

galangina (BURDOCK, 1998). Mirzoeva et al., 1997, observaram que, algumas substâncias presentes na própolis são responsáveis pela inibição da motilidade celular.

2.2.5 Metodologias analíticas de controle de qualidade

A evolução tecnológica no desenvolvimento de qualquer produto, especialmente, na produção de medicamentos, cosméticos e alimentos exige a execução de diretrizes (YAMAMOTO et al., 2004). De acordo com o conceito de Controle Total de Qualidade, a qualidade é construída durante todo o processo de fabricação de um medicamento, e não, apenas, na inspeção do produto final, considerado um processo dinâmico, que evolui, de acordo com as necessidades que vão surgindo (SANTORO, 1988). O Controle de Qualidade consiste em um conjunto de procedimentos importantes cujas intenções estão baseadas em obter, por exemplo, medicamentos cada vez melhores, eficazes e seguros, menos tóxicos e mais estáveis (PINTO et al., 2000).

2.2.5.1 Doseamento de flavonoides totais

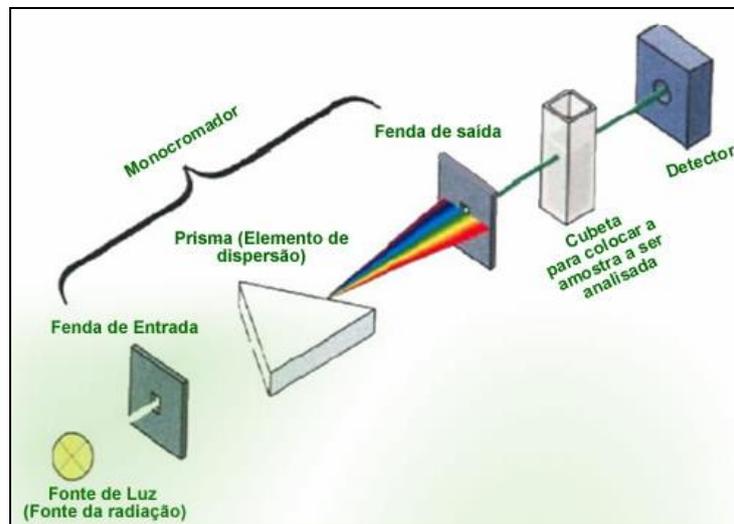
Diversas técnicas são empregadas com o objetivo de dosear flavonoides em materiais vegetais, uma delas, é a espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis) que, apesar da pouca seletividade, ocasionada pela sobreposição das bandas, impedem a absorção do componente de interesse, é bastante utilizada (PERKAMPUS, 1992; ROCHA; TEIXEIRA, 2004), pois apresenta diversas vantagens, tais como: simplicidades, rapidez, baixo custo de execução e, por isso, é, amplamente utilizada nos laboratórios de controle de qualidade. (KOMAROVA, et al., 2009; ALVES et al., 2010).

A espectrofotometria de UV-Vis, um dos métodos espectroscópicos, baseia-se na medida da quantidade de radiação que é produzida ou absorvida pelas moléculas (SKOOG et al., 2006), ou seja, trata-se de transições eletrônicas intra-atômicas ou moleculares, responsáveis pela absorção de radiação luminosa na região do ultravioleta (200-400 nm) e no visível (400-800 nm) (TREVISAN; POPPI, 2006). Em outras palavras, a espectrofotometria baseia-se na medida de transmitância ou absorbância de uma radiação monocromática que atravessa uma solução contendo um analito absorvente e na relação entre estas medidas e a concentração da espécie absorvente. Essa energia absorvida pela substância em análise provoca a excitação dos elétrons do seu estado fundamental ou normal a estados de maior

energia ou estado excitado, fenômeno conhecido como transição eletrônica (SILVERSTEIN et al., 1994).

Necessita-se, portanto de um espectrofotômetro, equipamento que, de modo geral, é composto por fonte de radiação, esta dependente da região utilizada, ultravioleta e/ou visível, sendo necessário, portanto, lâmpadas de hidrogênio e tungstênio, respectivamente, uma fenda de entrada que permite a passagem de luz policromática emitida até a uma lente que converge os raios luminosos até uma rede de difração ou prisma, permitindo a separação da luz branca nas cores que a compõem, tornando-a monocromática, de modo que, seja possível a seleção do comprimento de onda desejado a incidir na amostra. Em seguida, surge uma fenda de saída, com uma determinada largura espectral, onde, apenas, passa a luz de comprimento de onda escolhido que vai incidir. Por fim, a presença de um detector ou um transdutor mede o sinal obtido após a passagem do feixe de luz monocromático pela amostra e um computador converte o sinal elétrico em termos de absorvância ou transmitância (HARRIS, 2001; SKOOG et al., 2006), funcionamento este, esquematizado na Figura 3.

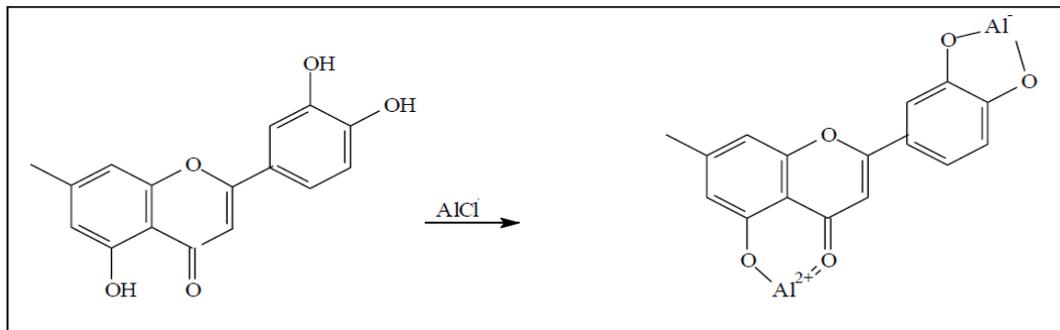
Figura 3 - Funcionamento interno de um espectrofotômetro



FONTE: MARTINEZ, 2010.

Outro método empregado para o doseamento de flavonoides, no que tange a obtenção de espectros de flavonoides sem a interferência de outros compostos fenólicos, é o método com Cloreto de Alumínio (AlCl_3). Conforme, a Figura 4, o cátion Al^{3+} forma complexos estáveis com as hidroxilas livres dos flavonoides, provocando extensão do sistema conjugado e, conseqüentemente, um deslocamento dos seus máximos de absorção para regiões de maior comprimento de onda. (SOUSA; GIOVANI, 1985; MARCUCCI et al., 1998; BURIOL et al., 2009).

Figura 4 - Reação química entre flavonoides e Cloreto de Alumínio



FONTE: MARCUCCI et al., 1998.

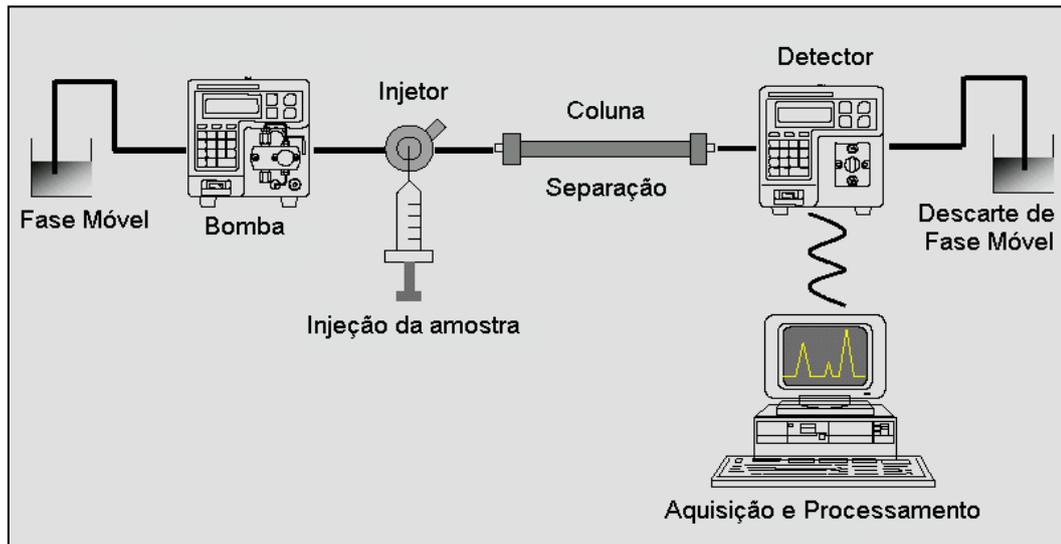
2.2.5.2 Cromatografia

O isolamento e caracterização de metabólitos oriundos de matrizes vegetais requerem a crescente utilização de modernas técnicas cromatográficas, que viabilizem elevar a sensibilidade e a seletividade da análise dos compostos de interesse (HOSTETTMANN et al., 2003).

Nos últimos anos a cromatografia líquida, principalmente CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) com o uso de coluna de fase reversa, tem sido, amplamente, utilizada para identificação de flavonoides e ácidos fenólicos em alimentos, extratos de plantas e produtos apícolas (MERKEN; GARY, 2000; PARK et al., 2002b, GÓMEZ-CARAVACA et al., 2006; CASTRO et al., 2007), por causa de sua versatilidade (DEGANI et al., 1998), reprodutibilidade, estabilidade, sensibilidade, precisão e exatidão (LIANDA, 2009).

A cromatografia é um método físico-químico de separação no qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases, estacionária e móvel, essa separação é dependente das interações existentes, que podem ser do tipo: ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas ou Van der Waals, entre outras (BRAITHWAITE, 1999). Os componentes que compõe um cromatógrafo estão demonstrados na Figura 5.

Figura 5 - Desenho esquemático dos principais componentes da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).



FONTE: http://dc228.4shared.com/doc/9a_db_AR/preview.html

Há vários detectores disponíveis para análises de flavonoides, um dos mais utilizados é o detector UV-Vis, pois esta classe de substâncias apresentam duas bandas de absorção características no UV, sendo uma com λ_{max} entre 240-280 nm e a outra em torno de 300-380 nm (KALEGARI, 2009). Outro detector que pode ser acoplado a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é o Espectrômetro de Massas. A análise por espectroscopia de massas é uma técnica analítica poderosíssima na caracterização estrutural de biomoléculas. Esta análise pode ser dividida em três estágios: a primeira refere-se à introdução da amostra que pode ser feita diretamente ou por meio do sistema cromatográfico. A segunda consiste na conversão do analito a íons fonte de ionização, por perda ou ganho de carga, protonação ou desprotonação, da formação de adutos ou da ejeção de elétrons. Estes íons gerados são, então, separados em virtude de suas relações massa/carga no analisador e suas intensidades relativas medidas no detector. Por fim, a aquisição e o processamento dos dados geram os espectros de massas que são produzidos em função da intensidade de cada íon *versus* sua razão massa/carga (CARDOZO, 2007).

2.2.5.3 Reologia dos pós

Etimologicamente, a palavra reologia deriva do grego *rheos*, que significa escoamento e, *logos*, conhecimento, portanto, consiste no estudo do escoamento ou, em outras palavras, na deformação do material em estudo, quando submetido a uma pressão. As medições reológicas são utilizadas para caracterizar a facilidade com que um pó ou granulado pode ser despejado

em um frasco, imprensado em um tubo ou outro frasco deformável, manter a forma do produto num frasco, ou após a extrusão, esfregar o produto sobre a pele, ou bombear o produto do equipamento onde se procedeu à mistura, ou enchimento (LACHMAN et al., 2001).

Vale ressaltar a definição de grânulos ou granulados e pós. Grânulos são formas farmacêuticas formada por pó ou mistura de pós umedecidos e submetidos a secagem para a obtenção de grânulos de tamanho desejado. Enquanto que, pós, também, são formas farmacêuticas, composta por uma mistura de fármacos e/ou substâncias finamente divididas e na forma seca (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

2.2.5.3.1 Tamanho e distribuição de tamanho das partículas

Esses dois parâmetros influenciam o fluxo e, até, a eficiência da mistura de pós e granulados, ao qual interfere na homogeneidade da forma farmacêutica sólida. Assim, em larga faixa de distribuição de tamanho de partículas haverá uma dificuldade na mistura dos pós, enquanto que, a constância do tamanho de partículas finas facilita essa mistura, no entanto, pós muito finos, as propriedades de superfície de partículas se sobressaem, tais como, efeito eletrostático e umidade relativa, provocando problemas na fluidez dos mesmos. A granulometria é expressa em termos de compressibilidade, de acordo com a Tabela 1 (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; PRISTA et al., 2002).

Tabela 1 - Granulometria dos pós

Granulometria	Compressão
Diâmetros superiores à 420 µm	Ótima
Diâmetros compreendidos entre 250 e 2000 µm	Boa
Diâmetros compreendidos entre 250 e 2000 µm	Difícil

FONTES: ANSEL; POPOVICH; ALLEN JR., 2000; PRISTA et al., 2002).

2.2.5.3.2 Propriedades de escoamento

O ângulo de repouso é um parâmetro cujo objetivo é avaliar a dificuldade que um pó tem em fluir através de um orifício para uma superfície livre. Vale ressaltar que, os valores dos ângulos contidos na Tabela 2 foi determinado por meio do escoamento de 100 g de pó em

um funil, cuja altura do mesmo encontrava-se a 20 cm da base plana. Em paralelo ao ângulo de repouso, também, é determinado o tempo de escoamento, cujo resultado superior à 10 segundos são considerados com tempo de escoamento infinito (PRISTA et al., 2002).

Tabela 2 - Relação do ângulo de repouso e propriedade de escoamento.

Ângulo de repouso ($\hat{\theta}$)	Propriedades de escoamento
$\hat{\theta} \leq 30^\circ$	Fluxo bom
$\hat{\theta} > 40^\circ$	Fluxo ruim

FONTES: ANSEL; POPOVICH; ALLEN JR., 2000; PRISTA et al., 2002).

2.2.5.3.3 Volume aparente

Sua determinação consiste prever as características de compressibilidade, ou seja, esta grandeza e sua variação (volume real ou final) estão diretamente relacionada com a facilidade de compressão dos pós ou granulados (LACHMAN et al., 2001).

2.2.5.3.4 Densidade

A densidade dos pós pode influenciar no grau de compressão, na porosidade ou na dissolução do fármaco. Para obter comprimidos ou cápsulas com grânulos densos e duros que apresentem baixa porosidade é necessário pressões superior, e, quanto maior a compressão, maiores podem ser os tempos de desintegração e, conseqüentemente, maior o perfil de dissolução (LACHMAN et al. 2001).

2.2.5.3.5 Índice de Carr

Obtido a partir da densidade, o índice de compressibilidade ou índice de Carr caracteriza quanto à capacidade de fluxo e grau de empacotamento do pó. Assim, valores de compressibilidade de 15% originam um bom escoamento, e valores superiores a 25% um baixo escoamento (LACHMAN et al. 2001).

2.2.5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O MEV é uma ferramenta padrão bastante utilizada para inspecionar e analisar diversos produtos, desde a área relacionada a materiais à área biológica. O equipamento é capaz de produzir imagens, altamente ampliadas e com alta resolução. Ressalta-se que, as

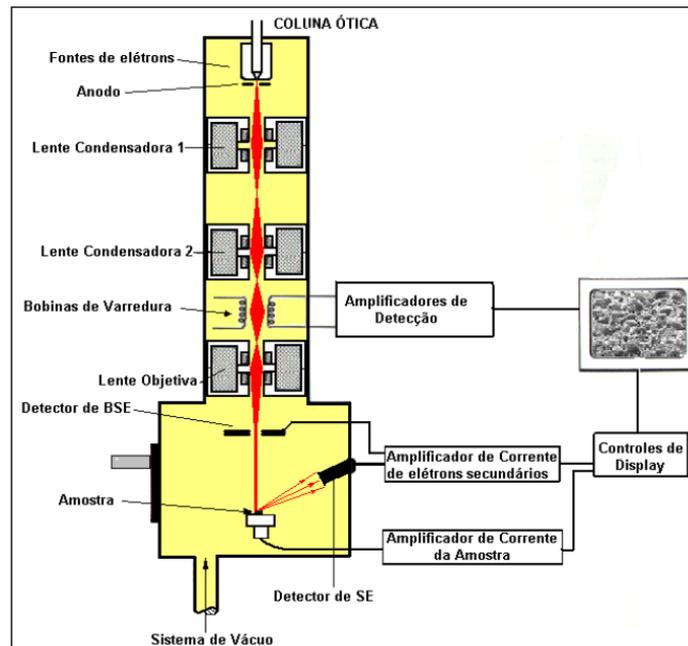
imagens fornecidas possuem caráter virtual, visto que a visualização observada no monitor do aparelho é a transcodificação da energia emitida pelos elétrons (OLIVEIRA, D., 2009).

Tais métodos são fundamentados na interação da matéria da amostra com os elétrons incidentes e a emissão de ondas ou partículas, sejam elas, fótons, elétrons, íons, átomos, nêutrons ou fônons (SANTOS, 2003).

A esquematização da coluna de MEV, está representada na Figura 6. Segundo Oliveira, A., 2003, o princípio de funcionamento do equipamento:

Consiste na emissão de feixes de elétrons, gerados dentro da coluna de alto vácuo, por um filamento capilar de tungstênio (eletrodo negativo), mediante a aplicação de uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 a 30 kV. Essa variação de voltagem permite a variação da aceleração dos elétrons, e também provoca o aquecimento do filamento. A parte positiva em relação ao filamento do microscópio (eletrodo positivo) atrai fortemente os elétrons gerados, resultando numa aceleração em direção ao eletrodo positivo. O feixe gerado passa por lentes condensadoras que reduzem o seu diâmetro e por uma lente objetiva que o focaliza sobre a amostra. Logo acima da lente objetiva existem dois estágios de bobinas eletromagnéticas responsáveis pela varredura do feixe sobre a amostra. Um sistema de bombas proporciona o vácuo necessário tanto na coluna de elétrons como na câmara da amostra. Uma parte importante da câmara da amostra é a que permite mover a amostra debaixo do feixe de elétrons e examinar o ângulo exigido pelo feixe. O feixe de elétrons, feixe primário, interage com a amostra resultando, entre outros efeitos, emissão de elétrons secundários, uma corrente de elétrons refletidos, condução induzida pelo feixe e freqüentemente, cátodo luminescência.

Figura 6 - Esquematização da coluna do MEV



FONTE: NECKEL, 2009.

A técnica de Espectroscopia de Energia Dispersiva (ESD) é um dos recursos do MEV que permite analisar a composição dos materiais, sendo assim, possível quantificar os elementos contidos em porcentagem atômica ou em peso (OLIVEIRA, D., 2009).

2.2.5.5 Ensaios de Dissolução

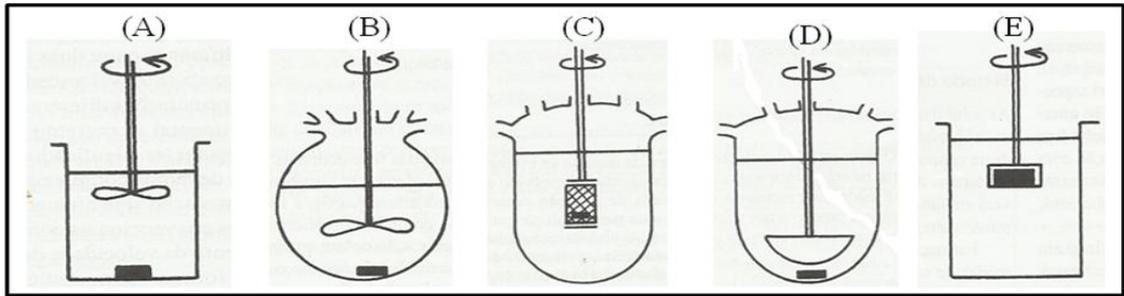
Para obtenção do efeito terapêutico a partir de um medicamento na forma farmacêutica sólida, quando administrado por via oral, é necessário que o fármaco passe da forma de dosificação em que se encontra para outra em que seja absorvível. Este processo, conhecido como liberação, é a etapa antecedente a absorção, e depende, portanto, da dissolução do fármaco nos líquidos orgânicos. Assim sendo, é perceptível a importância dos ensaios de dissolução na avaliação do desempenho dos medicamentos na forma sólida (RODRIGUES et al., 2008).

Em outras palavras, o estudo do processo de dissolução *in vitro*, empregando-se o teste de dissolução e o perfil de dissolução tem sido amplamente difundido como parâmetro crítico para determinar o desempenho e, assim, proporcionar a qualidade da forma farmacêutica, favorecendo, também, como indicador da velocidade de absorção. A correlação dos dados *in vivo* e *in vitro* é, extremamente, valioso para fixar a qualidade biofarmacêutica de um

medicamento, sendo vantajoso no desenvolvimento de formulações, controle de qualidade e determinação de equivalentes farmacêuticos (ARANCIBIA, 1991).

Basicamente, o dissolutor é constituído de recipientes abertos (cilíndricos e fundos hemisférico), conhecidas como cubas, feitos de vidro boro silicato, plástico ou outro material que não prejudique o ensaio; hastes em aço inoxidável para fornecer a agitação do meio; um motor responsável pelo ajuste de velocidade de rotação das hastes e um banho-maria. Há muitos métodos disponíveis para a medição da velocidade de dissolução, Figura 7, são eles, método do béquer, aos quais os comprimidos ou cápsulas são colocados nas cubas; no método do frasco com agitação há a utilização de frasco com fundo arredondado, que evita possíveis problemas com formação de montículos de partículas, como ocorre com o método anterior; o método da cesta rotatória, que consiste no acondicionamento de comprimidos ou cápsulas no interior de uma cesta de aço inoxidável, sujeita a rotação com velocidade fixa, imerso em um meio de dissolução; método de pás, assim, como método de cesta rotatória, é um método oficial, cujo aparato utilizado, também, é uma cuba cilíndrica com fundo esférico e a agitação é realizada com uma pá rotatória, porém as formas farmacêuticas sólidas podem flutuar e, para impedir isto, recorre-se a dispositivos apropriados que permitem que o mesmo direcione ao fundo do recipiente; e, o método de disco rotacional e estático, a forma farmacêutica é comprimida em um disco não desintegrável, colocado em um dispositivo, deixando-se exposta uma face do disco, o dispositivo e o disco são imersos no meio de dissolução e conservado em posição fixa, que refere-se ao método do disco estático, enquanto que, a submissão a uma rotação com uma velocidade, ao método de disco rotacional. As amostras do líquido são retiradas em intervalos de tempo estipulados, filtrados ou não e submetidos a quantificação (AULTON, 2005).

Figura 7 - Métodos de dissolução: (A) Método do béquer, (B) Método do frasco com agitação, (C) Método da cesta rotatória, (D) Método de pás e, (E) Método de disco rotacional e estático.



FONTE: AULTON, 2005.

2.2.5.6 Ensaios microbiológicos

Há dois métodos principais que integram os ensaios microbiológicos, os ensaios de difusão em Ágar e turbimétricos, de modo geral, são operações destinadas a avaliar quali ou quantitativamente a potência e/ou atividade de princípios ativos contidos em matérias-primas e preparações farmacopéicas utilizando reagentes biológicos, tais como, micro-organismos (AULTON, 2005).

O método de difusão em Ágar (poço ou disco) é influenciada pela difusão da substância através de uma camada de ágar solidificado contida em uma extensão tal que o crescimento do micro-organismo seja totalmente inibido em uma área ou zona ao redor do reservatório contendo a substância bioativa, em outras palavras, o método de difusão em ágar determina a possibilidade que um dado microorganismo tem em se multiplicar na presença de agentes antimicrobianos; esses agentes se difundem no meio sólido, em concentrações decrescentes, e a cepa bacteriana inoculada se desenvolve até encontrar uma concentração capaz de inibir seu crescimento (ESMERINO et al., 2004). Portanto, neste ensaio há correlação entre o tamanho da zona de inibição e a dose da substância em questão (AULTON, 2005), ou seja, o halo formado é dose-dependente, isto é, o tamanho do halo é diretamente proporcional à concentração antimicrobiana, em outras palavras, à medida que se aumente a concentração do agente, halos maiores são gerados até que se esgote sua capacidade de difusão (ESMERINO et al., 2004). Há vários fatores que podem interferir no tamanho da zona inibitória, tais como, sensibilidade microbiana, solubilidade do agente antimicrobiano, quantidade de agente liberado nas primeiras horas após sua aplicação, estrutura da micropartícula, bem como, de certa maneira, as micropartículas, por estarem em um meio geleificado, com quantidade de água livre escassa, provavelmente, há um comprometimento na liberação das substâncias bioativas (BRUSCHI et al., 2003).

Através deste método é possível determinar a concentração crítica, considerada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano. Segundo Hewitt, 2007, a concentração crítica é 4 vezes maior em relação a Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Nos ensaios turbimétricos, os padrões antibacterianos são postos em meio de cultura líquido, sob várias concentrações diferentes e, a extensão da inibição do crescimento do micro-organismo é quantificada por meio de escala nefelométrica, espectrofotômetros ou, mesmo, através de indicadores de reação (AULTON, 2005).

A CIM é considerada a menor concentração de uma substância que apresente atividade antibacteriana capaz de inibir o crescimento de um determinado micro-organismo teste. Enquanto que, a Concentração Bactericida Mínima se refere à menor concentração capaz de impedir o crescimento microbiano (AULTON, 2005).

Apesar de fácil execução, reprodutibilidade e análise de diversas concentrações da amostra-teste em uma mesma placa, geram, apenas, dados qualitativos, interpretados como sensíveis, intermediários e resistentes, enquanto que, para se determinar a Concentração Inibitória Mínima, a metodologia mais empregada e aceita é a técnica de diluição, pois geram dados quantitativos. Ainda que, a difusão em Ágar proporcione um valor de halo de inibição, bastante, relevante, não significa, necessariamente, que a substância apresente uma CIM baixa, somente, demonstra que a mesma, além de apresentar atividade contra um determinado microorganismo, tem uma boa difusibilidade no meio de cultura (RODRIGUES, 2008).

2.2.5.7 Validação de metodologias

Estudos de validação viabilizam o desenvolvimento de novos processos, favorecendo a pesquisa de novas tecnologias e assegurando a qualidade das mesmas. Atualmente, a validação é parte integrante do Sistema de Qualidade que visa atingir o nível de excelência, tornando-se assim uma das principais ferramentas da Garantia da Qualidade, segurança e eficácia do produto (OLIVEIRA, A., 2003).

São várias as origens de riscos que podem gerar eventos adversos, ao qual, destacam-se, os riscos decorrentes de produtos defeituosos, cuja qualidade é comprometida. Esses riscos podem ser controlados através do cumprimento das boas práticas de fabricação, incluindo validação de metodologia analítica, do monitoramento e fiscalização por parte de autoridade sanitária (OLIVEIRA, A., 2003).

Os estudos de validação atestam, de modo geral, através de ato documentado, que um processo específico produzirá, consistentemente, um produto de acordo com as especificações pré-determinadas e atributo de qualidade (BRASIL, 2003). Demonstrando que o processo produtivo é lógico e que pode ser comprovado através de estudos validados, e acima de tudo reproduzido, mantendo o nível de excelência de qualidade. Portanto, frisando mais uma vez, a validação constitui parte essencial das Boas Práticas de Fabricação, se tornando ferramenta fundamental para o controle da qualidade dos medicamentos, permitindo avaliar, objetivamente, a qualidade dos medicamentos produzidos, a fim garantir a segurança e eficácia dos mesmos (OLIVEIRA A., 2003). A validação de métodos analíticos e bioanalíticos é um processo dinâmico, que deve ser bem definido e documentado, pois só assim, fornecerá evidências concretas de que o sistema e o método atendem às exigências das aplicações analíticas, desde que, sejam adequados ao uso pretendido. Os parâmetros avaliados na validação de um método são: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação (BRASIL, 2003).

2.2.6 Metodologias analíticas de desenvolvimento de opoterápicos

A secagem é uma operação, considerada tradicional, importantíssima para a conservação de produtos intermediários e acabados, tanto das indústrias farmacêutica quanto alimentícia. Consiste na redução da disponibilidade de água, suficiente, para prevenir o desenvolvimento de microrganismos e de reações bioquímicas deteriorativas. A simplicidade do processo, o aumento do tempo de vida de prateleira, custos e volumes menores de acondicionamento, armazenagem e transporte, maior variedade de produtos alimentícios disponíveis ao consumidor e, até, como operação integrante no processo de encapsulação são algumas vantagens da operação de secagem que a tornam tão utilizada (PARK et al., 2002c).

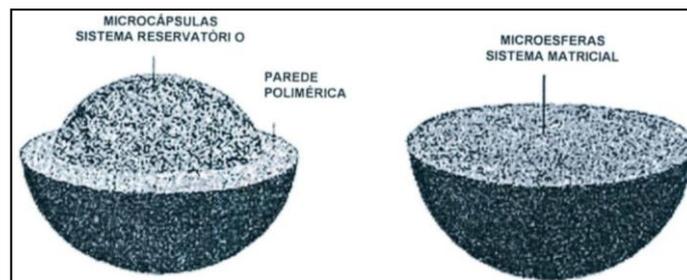
A encapsulação baseia-se na preparação de uma emulsão, dispersão ou solução entre o composto a ser encapsulado e o agente de encapsulação, seguido da secagem (BORGOGNONI, 2005). As cápsulas podem ser classificadas por tamanho em 3 categorias: macro ($>5000 \mu\text{m}$), micro ($0,2-5000 \mu\text{m}$) e nanocápsulas ($<0,2 \mu\text{m}$) (FLEMMING, 2012).

A microencapsulação, tecnologia inovadora, bastante utilizada nas indústrias comestiva, farmacêutica e alimentícia, é um processo de empacotamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em cápsulas muito pequenas e que apresentam diversas vantagens, tais como, capacidade de modificar e melhorar a aparência e as propriedades de uma substância

(BORGOGNONI, 2005), dentre as quais merece destaque, a liberação do conteúdo de forma controlada sob condições específicas (FAVARO-TRINDADE et al., 2008).

Conforme Figura 8, são classificados em microcápsulas, quando o material microencapsulado (núcleo ou fase interna) está envolvido por uma superfície polimérica (parede, revestimento ou membrana) formando um sistema do tipo reservatório; e, microesferas, quando o polímero origina uma rede tridimensional onde o material a ser microencapsulado possa estar adsorvido, incorporado ou, covalentemente, ligado à matriz polimérica, constituindo um sistema matricial, formando, assim, um sistema de dissolução, dispersão ou sistemas porosos (JÚNIOR-SILVA, 2005). No entanto, segundo Depyrere, 2003, citato por Araújo, 2011, o termo encapsulação tem sido utilizado em sentido mais amplo, englobando tanto a formação de micropartículas quanto de microesferas.

Figura 8 - Desenho esquemático de micropartículas e microesferas



FONTE: JÚNIOR-SILVA, 2005.

Há vários métodos de encapsulação e a escolha mais adequada depende de alguns fatores, como por exemplo, tipo de material encapsulante (carboidratos, celulose, gomas, lipídeos e proteínas), tamanho da partícula desejada, concentração de substância bioativa, estabilidade e morfologia da partícula e o custo (AZEREDO, 2005). Estudos descrevem, o *spray-drying* e a liofilização, como duas das técnicas físicas mais empregadas para obtenção de micropartículas com as mais diversas substâncias (MATIOLI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2002; CARVALHO, 2009; MUELLER, 2011).

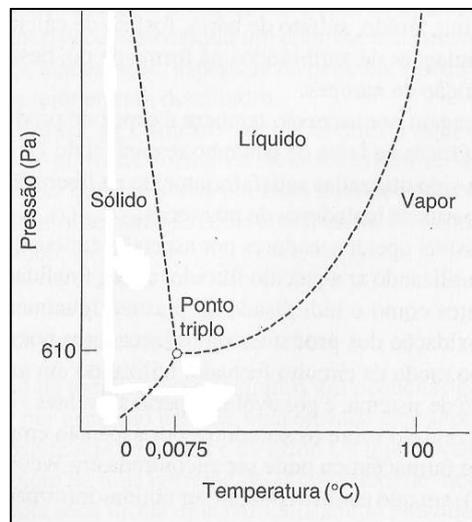
2.6.1 Liofilização

A liofilização é, bastante, empregada na secagem de substâncias termolábeis. Assim sendo, permite secar, sem provocar danos aos produtos como proteínas, derivados de sangue e até, mesmo, micro-organismos (AULTON, 2005). É, também, empregada como método de encapsulação de material ativo (ARAÚJO, 2011).

Nesse processo, primeiramente, a solução, suspensão ou emulsão é congelada, em seguida, a pressão sobre a mistura congelada é reduzida e, finalmente, a água é eliminada por sublimação, então, ocorre uma transição da fase líquida para a fase de vapor (AULTON, 2005).

A liofilização está baseada no ponto triplo da água, pois há a coexistência dos três estados físicos da matéria na temperatura, aproximadamente, de 0 °C e na pressão de 610 Pa. Portanto, é possível a passagem direta do estado sólido para o estado gasoso, processo este, conhecido como sublimação (MARTINS et al., 2011), e demonstrado na Figura 9.

Figura 9 - Diagrama de fases da água



FONTE: Adaptado de Aulton, 2005.

As cápsulas produzidas por liofilização, geralmente, apresentam-se sob formas irregulares, diferentes de outras técnicas (ARAÚJO, 2011).

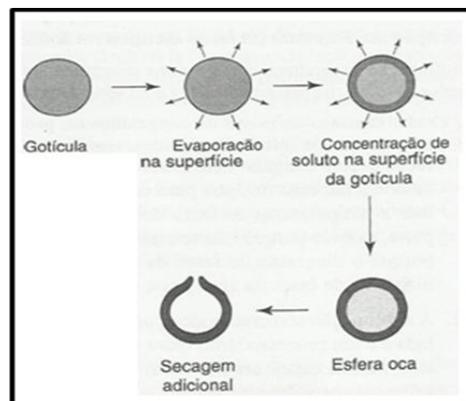
As vantagens a tornam atrativas, pois há inibição da ação enzimática e amenização da degradação química oriundos da utilização de baixas temperaturas; fácil dissolução, pois o produto obtido após liofilização é leve e poroso, em decorrência da etapa de congelamento da solução que, conseqüentemente, o produto final seco será um retículo que preenche o mesmo volume da solução original; a oxidação é minimizada, já que, o processo ocorre sob condições de alto vácuo que impede o contato com o ar. Há duas principais desvantagens a elevada higroscopicidade e longos períodos de liofilização até a obtenção do pó, o que a torna onerosa (AULTON, 2005).

2.2.6.2 *Spray-Drying*

O *spray-drying*, operação unitária, através da qual o líquido de alimentação (solução, emulsão ou suspensão) é pulverizada numa corrente ou contra-corrente de gás quente (ar ou nitrogênio), a depender do atomizador, para, instantaneamente, obter um pó. Dependendo do material utilizado na alimentação e das condições da operação, a produção do pó pode atingir dimensões desde muito finas (10-50 μm) a partículas de grande dimensão (2-3 mm) (MARTÍNEZ, et al., 2004).

A Figura 10 mostra as etapas de formação de uma partícula oriundas do processo por *spray-drying*, primeiramente, o material de alimentação de consistência fluída é disperso como gotículas, permitindo o aumento da área superficial, em seguida, ocorre contato destas com uma corrente de ar aquecido, promovendo a secagem do lado externo, remanescendo, ainda, líquido no interior e, por fim, acontece a evaporação deste solvente e o vapor interno formado escapa, forçando a passagem e formando um orifício na partícula esférica (AULTON, 2005).

Figura 10 - Formação de uma partícula esférica por *spray-drying*.



FONTE: Adaptado de Aulton, 2005.

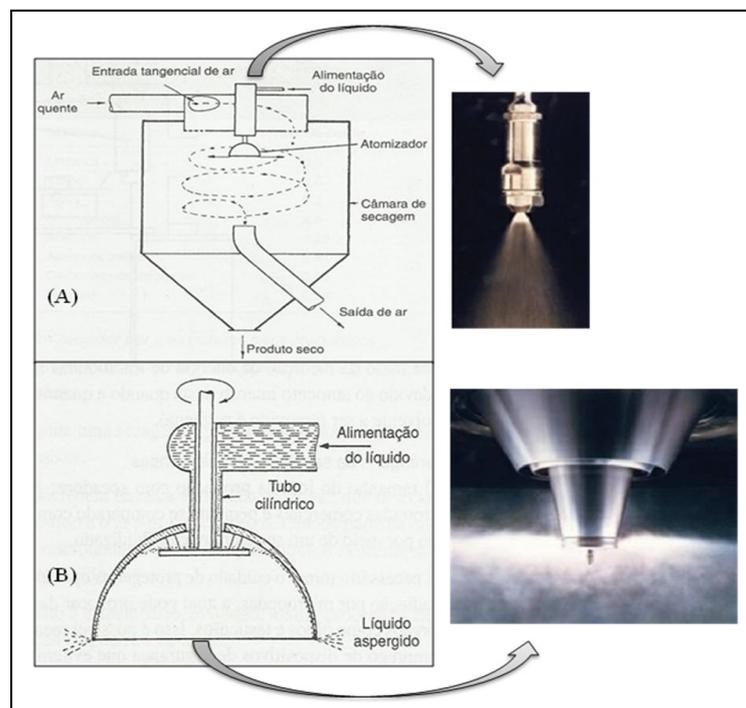
De acordo com Broadhead et al., 1992, citado por Oliveira e Petrovick, 2010, a distribuição e o tamanho de partícula estão, intimamente, ligados ao tamanho das gotículas formadas pelo processo de aspersão. Logo, a escolha apropriada do tipo do aspersor é importante. Os aspersores são divididos em três tipos básicos: de pressão, pneumáticos e de disco giratório, sendo os dois últimos os mais utilizados, Figura 11. Os aspersores pneumáticos e de pressão produzem partículas de tamanhos diversos, que é dependente do diâmetro interno do bocal injetor. Enquanto que, os aspersores de disco giratório ou rotatório, a desintegração do líquido em gotículas é devido a força centrífuga, possuem maior aplicação

na secagem de produtos farmacêuticos, visto que, são efetivos para soluções e suspensões e, até pastas, ou seja, líquido de alimentação com altas viscosidades (RANKELL et al., 2001).

Além da escolha adequada do aspersor, há alguns parâmetros que podem ser otimizados: temperaturas de alimentação e de entrada e saída de ar. Realmente, a temperatura de alimentação interfere na viscosidade do líquido de alimentação e, conseqüentemente, na sua capacidade de secagem homogênea. Quando a temperatura de alimentação é baixa, a viscosidade aumenta, formam gotas inadequadas durante a aspersão, culminando em aumento do tamanho das cápsulas, já, em altas temperaturas podem causar volatilizações ou degradações de alguns ingredientes sensíveis ao calor (SOARES, 2002).

As vantagens giram em torno do período relativamente curto para a secagem; apesar, da presença do ar aquecido, as gotículas não chegam a atingir altas temperaturas; obtenção de partículas características, o que facilita a dissolução, tornando-a rápida; uniformização do tamanho das partículas; e, baixos custos de produção. Enquanto que, as desvantagens estão relacionadas às dimensões do equipamento e, também, a baixa eficiência térmica. (AULTON, 2005).

Figura 11 - Tipos de aspersor (A); (B) aspersor



FONTE: AULTON, 2005.

REFERÊNCIAS

ADELMANN, J. **Própolis: Variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicobiana/antioxidante**. 2005. 186 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

AGÊNCIA SEBRAE DE NOTÍCIAS AL: **Os pequenos negócios em pauta**. Indicação geográfica reconhece a própolis vermelha alagoana: certificação, válida internacionalmente, estabelece o estado como único produtor do mundo, 2012. Disponível em: <<http://www.al.agenciasebrae.com.br/noticia.kmf?canal=647&cod=13587685>>. Acesso em: 10 jun. 2012.

AGUIAR, et al. Caracterização físico-química das própolis originárias da região da Mata Atlântica do Estado de Alagoas. **Mensagem Doce**, São Paulo, v. 72, n. 5, p. 15-21, 2003.

ALBUQUERQUE, et al. Medicinal and magic plants from a public market in Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 76-91, 2007.

ALENCAR, et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.

ALMEIDA, E.C.; MENEZES, H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 8, n. 2, p. 191-212, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-79302002000200002&script=sci_arttext>. Acesso em: 24 de out. 2011.

ALVES, et al. Desenvolvimento De Método Analítico Para Quantificação do Efavirenz por Espectrofotometria no UV-VIS. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1967-1971, 2010.

AMOROS, et al. Synergistic effect of flavones and flavonols against Herpes simplex virus type 1 in cell culture - comparison with the antiviral activity of propolis. **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 1732-1740, 1992.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; JÚNIOR-ALLEN, L. V. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. São Paulo: Artmed, 2000. 775 p.

ARANCIBIA A. Calidad biofarmacéutica estudios *in vitro* e *in vivo*. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 10, n. 2, p. 123-133, 1991.

ARAÚJO, A. L. **Microencapsulação do ferro através da técnica de coacervação complexa**. 2011. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 677 p.

AYRES, D. C.; MARCUCCI, M. C.; GIORGIO, S. Effects of Brazilian propolis on leishmania amazonensis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 2, p. 215–220, 2007.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.

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

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B.G. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissível**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.

BARBOSA, et al. Plantas medicinais: aspectos do uso de fitoterápicos na melhoria de qualidade de vida humana. **X Encontro de Iniciação à Docência**. Universidade Federal da Paraíba, 2007.

BAZO, A. P.; RODRIGUES, M. A. M.; SFORCIN, J. M.; CAMARGO J. L. V.; RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F. Protective action of propolis on the rat colon carcinogenesis. **Teratogen Carcinogen Mutagen**, v. 22, p. 183-194, 2002.

BORGOGNONI, C. M. **Microencapsulação por liofilização de d-limoneno em maltodextrina e quitosana modificada**. 2005. 123 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 17**, de 24 de fevereiro de 2000. Aprova o Regulamento técnico visando normatizar o registro de medicamentos fitoterápicos junto ao sistema de vigilância sanitária. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2000/17_00rdc.htm>. Acesso em: 22 out. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica: Influenza/Variola**. 5. ed. Brasília: Funasa, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº. 132, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o registro de medicamentos específicos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/132_03rdc.htm>. Acesso em: 22 out. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada. Resolução nº 48, de 16 de março de 2004a. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Câmara Técnica de Medicamentos Fitoterápicos, instituída pela Resolução - RDC nº 296, de 29 de novembro de 2004b. Nota sobre o registro de produtos contendo própolis. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/catetf/propolis.htm>>. Acesso em: 12 out. 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006a. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 04 mai 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Diabetes Mellitus**/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica – Brasília : Ministério da Saúde, 64 p. il. – (Cadernos de Atenção Básica, n. 16) (Série A. Normas e Manuais Técnicos), 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Projeto Olhar Brasil**. 2007.

BRASIL, et al. Nutracêuticos, alimentos funcionais e fitoterápicos: O uso das plantas, na promoção, prevenção e restauração da saúde. **XI Encontro de Iniciação à Docência**. Universidade Federal da Paraíba, 2008.

BRAITHWAITE, A.; SMITH, F. J. **Chromatographic Methods**, 5. ed. London: Kluwer Academic Publishers, 1999.

BRUSCHI, et al. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. **International Journal Pharmaceutics**, v. 264, n. 2, p. 45–55, 2003.

BÚFALO, M. C.; CANDEIAS, J. M. G.; SFORCIN, J. M. *In vitro* Cytotoxic Effect of Brazilian Green Propolis on Human Laryngeal Epidermoid Carcinoma (Hep-2) Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, n. 4, p. 483-487, 2009.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicological**, v. 36, n. 4, p. 347-363, 1998.

BURIOL, et al. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: umas alternativa ao estrato etanólico. **Química Nova**, v. 32, p. 296-302, 2009.

CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids, inflammation. **Prostaglandins, Leucotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 75, p. 197-202, 2006.

CARDOZO, K. H. M. **Estudos de compostos fotoprotetores de radiação ultravioleta em algas: Aminoácidos tipo micosporina (MAAs)**, 2007. 173 f. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Universidade de São Paulo, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica), São Paulo, 2007.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, Milão, v. 73, n. 1, p. 1-6, 2002.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. Própolis do Sudeste e Nordeste do Brasil: Influência da Sazonalidade na Atividade Antibacteriana e Composição Fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512-1516, 2007.

CASTRO, et al. Bioassay guided purification of the antimicrobial fraction of a brazilian propolis from Bahia state. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, 2009.

CARVALHO, J. S. R. **Encapsulamento de Óleo Essencial de *Origanum virens* L. em Matrizes de Gelatina e Gelatina/Sacarose**. 2009. 90 f. Dissertação (Mestrado em

Engenharia Alimentar) – Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.

CERUTTI, P. A. Oxidant stress and carcinogenesis. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 21, n. 1, p. 1-5, 1991.

CERUTTI, P. A. Oxy-radicals and cancer. **Lancet**, v. 344, n. 8926, p. 862-863, 1995.

CHIHUAILAF, R. H.; CONTRERAS, P. A.; WITTEWER, F. G. Pathogenesis of oxidative stress: consequences and evaluation in animal health. **Veterinária México**, v. 33, p. 265-283, 2002.

CUNHA, et al.. Antitrypanosomal Activity of Brazilian Propolis from *Apis mellifera*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, p. 602-604, 2004.

DAUGSCH, et al. Própolis Vermelha e sua origem botânica. **Mensagem Doce**, 2006, nº 89. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/89/msg89.htm>>. Acesso em: 20 set. 2012.

DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian red propolis – chemical composition and botanical. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p. 435-441, 2008.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: Um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, 1998.

DIÁRIO DA SAÚDE – SIS SAÚDE. Boletim: **Dicas e notícias e informações apícolas**, Porto Alegre, ano IV, n.51, 2010.

DOTA, K. F.; FARIA, M. G.; BRUSCHI, M. L. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from vaginal exudates. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2010.

ESMERINO, et al. Método microbiológico para determinação da potência de antimicrobianos. **Ciências Biológicas e de Saúde**, v. 10, n. 1, p. 53-60, 2004.

FALCÃO, V. L. C. Política de desenvolvimento territorial: a experiência do fórum territorial do Araripe (Fotear). **Políticas públicas para o semiárido: Experiências e conquistas no nordeste brasileiro**. Fortaleza: Fundação Konrad Adenauer, 2009. p. 67-81.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINTO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11. n. 2, p. 103-112, 2008.

FLEMMING, J. S. **Microencapsulação de nutrientes**. 2012. Disponível em: <<http://pt.engormix.com/MA-avicultura/nutricao/artigos/microencapsulacao-nutrientes-t945/141-p0.htm>>. Acesso em: 20 de Jun de 2012.

FONSECA, et al. Evaluation of the potential of brazilian propolis against UV-Induced oxidative stress. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2010.

FRANCHIN, et al. Comparison of effects of the ethanolic extracts of brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2011.

FREITAS, A. **Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira**. Ministério da Saúde. Núcleo Nacional de Economia da Saúde, Brasília, 2007.

GARDANA, C.; SCAGLIANTI, M.; PIETTA, P.; SIMONETTI, P. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 390-399, 2007.

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

GÓMEZ-CARAVACA, et al. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1220–1234, 2006.

GRAZIANO, R. M.; LEONE, C. R. Problemas oftalmológicos mais frequentes e desenvolvimento visual do pré-termo extremo. **Jornal de Pediatria**, v. 81, n. 1, p. 95-100, 2005.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 2. ed. Oxford, University Press, 1989. 543p.

HEWITT, W. Microbiological assay for pharmaceutical analysis: a rational approach. **INTERPHARM**, 2007, 260 p.

HOSTETTMANN K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Paulo: EDUFSCAR. 2003. 152 p.

INOCUCHI, et al. Brazilian green propolis protects against retinal damage *in vitro* and *in vivo*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, n. 1, p. 71-77, 2006.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER José Alencar Gomes da Silva, INCA. Ministério da Saúde. **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2011. 118 p.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER José Alencar Gomes da Silva, INCA. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Educação. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 2. ed, Rio de Janeiro: Inca, 2012. 129 p.

INPI, INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL. Acesso à informação: Indicação geográfica, 2012. Disponível em: <http://www.inpi.gov.br/acessoainformacao/index.php?option=com_content&view=article&id=737:indicacao-geografica&catid=116:perguntas-frequentes&Itemid=248>. Acesso em: 20 mai. 2012.

ISHIHARA, et al. Growth inhibitory activity of ethanol extracts of Chinese and Brazilian propolis in four human colon carcinoma cell lines. **Oncology Reports**, v. 22, n. 2, p. 349-354, 2009.

JÚNIOR-SILVA, A. A. **Micropartículas biodegradáveis para a liberação prolongada intraocular de fármacos**. 2005. 140 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

JÚNIOR-VIEGAS, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J, Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

KALEGARI, M. **Composição fitoquímica e atividades biológicas de *Rourea induta* Planch, Connaraceae**. 2009. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

KHAYYAL, M. T.; EL-GHAZALY, M. A.; EL-KHATIB, A. S. Mechanism involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. **Drugs Under Experiental and Clinical Research**, v. 19, p. 197-203, 1993.

KLEIN, et al. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.

KOMAROVA, et al. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 45, n. 1, p. 27-31, 2009.

KINDT, T.J.; GOLDSBY, R.A.; OSBORNE, B.A. **Imunologia de Kuby**. 6. ed., Porto Alegre: Editora Artmed, 2008. 704 p.

KROL, et al. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Arzneimittel Forschung**, v. 43, n. 5, p. 607-609, 1993.

LACHMAN, H. A.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisbos: Calouste Gulbekian, 2001. v 2.

LEITÃO, et al. Comparative evaluation of in-vitro effects of brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of streptococcus mutans. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 11, p. 1834-9, 2004.

LIANDA, R. C. P. **Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Avaliação do Potencial Antioxidante**. 2009. 185 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

LUPI, O. Herpes Simples. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 75, n. 3, p. 261- 275, 2000.

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

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. **Mensagem doce**, v. 46, 1998.

MARTINEZ, M. **Espectrofotômetro**. 2010. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/materiais-de-laboratorio/espectrofotometro/>>. Acesso em: 20 mai. 2012.

MARTÍNEZ, et al. Optimal spray-drier encapsulation process of orange oil. **Proceedings of the 14th International Drying Symposium**, v. A, p. 621-627, 2004.

MARTINS, et al. Liofilização como alternativa para conservação de leite humano. **Journal Institute of Health Sciences**, v. 29, n. 2, p. 119-122, 2011.

MARUYAMA, et al. Antihypertensive effects of flavonoids isolated from brazilian green propolis in spontaneously hypertensive rats. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 7, p. 1244-1250, 2009.

MATIOLI, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Licopeno encapsulado em Goma Arábica e Maltodextrina: Estudo de Estabilidade. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 5, p. 197-203, 2002.

MATSUI, et al. Strong antihyperglycemic effects of water-soluble fraction of brazilian propolis and its bioactive constituent, 3,4,5-tri-o-caffeoylquinic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 11, p. 1797-1803, 2004.

MELO, E. B.; GOMES, A. S.; CARVALHO, I. α and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. **Tetrahedron**, v. 62, n. 44, p. 10277-10302, 2006. MERKEN, H. M.; GARY, R. B. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577- 599, 2000.

MIRZOEVA, O. K.; GRISHANIN, R. N.; CALDER, P. C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects of growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiology Research**, v. 152, n. 3, p. 239-246, 1997.

MISHIMA, et al. two related cinnamic acid derivates from brazilian honey bee propolis, baccharin and drupanin, induce growth inhibition in allografted Sarcoma S-180 in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 6, p.1025-1030, 2005.

MONTEIRO, et al. Estudo das condições de saúde das crianças do município de São Paulo (Brasil), 1984/1985: Aspectos epidemiológicos, características sócio-econômicas e ambiente físico. **Revista de Saúde Pública**, v. 20, n. 6, p. 435-445, 1986.

MONTEIRO, et al. **Velhos e Novos Males da Saúde no Brasil: A Evolução do País e de suas Doenças**. São Paulo: Editora Hucitec, 1995. 139 p.

MOURA, et al. Brazilian green propolis inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2009.

MUELLER, P. S.; **Microencapsulação do Óleo Essencial de Laranja**. 2011. 99 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, 2011.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

NECKEL, I. T. **Crescimento e morfologia de ligas de $\text{Co}_x\text{Fe}_{100-x}$ eletrodepositadas sobre Si (111) tipo-n**. 2009. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

NIKAIDO, H. Multidrug resistance in bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 119-178, 2009.

OLDONI, T. L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***. 2007. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Sorocaba, 2007.

OLIVEIRA, A. M. C. **A experiência de um laboratório oficial e o desenvolvimento e validação de uma metodologia para análise de teor de didanosina comprimido: Ferramenta para as Boas Práticas de Fabricação**. 2003. 82 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, São Paulo, 2003.

OLIVEIRA, D. M. F. **Síntese de caracterização de óxidos metálicos nanoestruturados e sua utilização em nanocompósitos com poli(álcool vinílico)**. 2009. 172 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, 2010.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Science & Environment**, v. 21, n. 2, p. 85-90, 2000.

PARK, et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 2, p. 997-1003, 2002a.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2502-2506, 2002b

PARK, K. J.; BIN, A.; BROD, F. P. R. Drying of pear 'd'Anjou' with and without osmotic dehydration. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 97-103, 2002c

PEREIRA, A. L.; PITA, J. R. Alexander Fleming (1881-1955): da descoberta da penicilina (1928) ao Prêmio Nobel. **Revista da Faculdade de Letras**, v. 6, p. 129-151, 2005.

PERKAMPUS, H. H. **UV-VIS Spectroscopy and its applications**, Springer-Verlag: Berlin, 1992.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu, 2000. 309 p.

PRISTA, L. N. ALVES, A. C. MORGADO, R. M. R. **Tecnologia Farmacêutica**. 6. ed., v. 1. Lisboa: Calouste, 2002.

RANKEL, A. S.; LIEBERMAN, H. A.; SCHIFFMAN, R. F. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. 6 .ed., v. 1. Lisboa: Calouste, 2001.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégia para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.

RODRIGUES, L. N. C.; WATANABE, S. P.; FERRAZ, H. G. Perfil de Dissolução *in vitro* de Comprimidos de Primaquina Disponíveis para o Tratamento de Malária no Brasil, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 1, p. 41-45, 2008.

SALATINO, et al. Origin and chemical variation of brazilian propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, p. 33-38, 2005.

SALOMÃO, et al. Brazilian Green Propolis: Effects *in vitro* and *in vivo* on *Trypanosoma cruzi*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2009.

SANTORO, M. I. R. M. **Introdução ao controle de qualidade de medicamentos**, São Paulo: Atheneu, 1988. 121p.

SANTOS, R. E. **Investigação sobre formação e estabilidade térmica dos silicetos de Ni e Ni (Pt) em substratos de Si (100)**. 2003. 99 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

SEBRAE, SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Informações de mercado sobre mel e derivados da colmeia. Série Mercado, Brasília, 2006.**

SFORCIN, et al. Seasonal effect on brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 243-249, 2000.

SFORCIN, J. M.; KANENO, R.; FUNARI, S. R. C. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of brazilian propolis on natural killer activity. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 8, n. 1, p. 19-29, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-79302002000100003&script=sci_arttext>. Acesso em: 25 out. 2011.

SHIMAZAWA, et al. Neuroprotection by brazilian green propolis against *in vitro* and *in vivo* ischemic neuronal damage. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 2, p. 201–207, 2005.

SHIMIZU, et al. Efficacy of brazilian propolis against Herpes Simplex Virus Type 1 infection in mice and their modes of antiherpetic efficacies. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2011.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1994. 387 p.

SIMÕES, et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2007. 1102 p.

SKOOG, et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2006.

SOARES, L. A. L. **Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek - Celastraceae**. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final. 2002. 285p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA/SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO/SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 95, p. 1-51, 2010.

SOUZA, R. F. V.; GIOVANI, W. R. F. **Spectrochim Acta**, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy (SAA), 1985.

TAKAISI-KIKUNI, N. B.; SCHILCHER, H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. **Planta Medica**. v. 60, n. 3, p. 222–227, 1994.

TAKEMURA, et al. 3,4- dicaffeoylquinic acid, a major constituent of brazilian propolis, increases TRAIL expression and extends the lifetimes of mice infected with influenza A virus. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2011.

TEMPORINI E. R.; KARA-JOSÉ N. Níveis de prevenção de problemas oftalmológicos. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 58, n. 3, p. 189-192, 1995.

TEMPORINI E. R.; KARA-JOSÉ N. A perda da visão: Estratégias de prevenção. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 67, n. 4, p. 597-601, 2004.

TREVISAN, M. G.; POPPI, R. J. Química analítica de processos. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p.1065-1071, 2006.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto e Contexto de Enfermagem**, Florianópolis, v. 15, n. 1, p. 115-121, 2006.

VALDÉS, G.; RUIZ, M.; MARTIN, M. Características de los propóleos de los municipios Mariel y Madruga de la provincia La Habana. **Ciencia y Técnica Agricultura-Apicultura**, v. 5, p. 25-37, 1989.

VOLPI, N.; BERGONZINI, G. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, p. 354–361, 2006.

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

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prevention and control of intestinal parasitic infections**. Geneve: WHO, 1987. 88 p.

YAMAMOTO, et al. Controle de Qualidade Microbiológico de Produtos Farmacêuticos, Cosméticos e Fitoterápicos Produzidos na Zona da Mata, MG. 2004. In: 2^o Congresso Brasileiro de Extensão Universitária. 2004, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 2004.

ZHU, et al. Biological activities of chinese propolis and brazilian propolis on streptozotocin-induced type 1 Diabetes Mellitus in rats. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2010.

Caracterização química e tecnológica de microencapsulados de própolis vermelha de Alagoas

*Erika T. C. Almeida*¹, Maria C. D. Silva^{1,2}, José M. S. Oliveira²,*

Rodolfo E. Arruda², Pierre B. Escodro³,

Irinaldo D. B. Júnior^{1,2}, Ticiano G. Nascimento^{1,2}

¹Faculdade de Nutrição - Universidade Federal de Alagoas;

²Escola de Enfermagem e Farmácia – Universidade Federal de Alagoas;

³Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Alagoas

RESUMO: Várias formas farmacotécnicas tem sido desenvolvidas com própolis, em especial, extratos secos de própolis caracterizados como microencapsulados com o intuito de garantir estabilidade dos constituintes químicos, mascarar sabor, facilitar manuseio e preparação, bem como enriquecer constituintes ativos. O presente estudo teve o objetivo de caracterizar microencapsulados de própolis vermelha através de ensaios químicos e tecnológicos estabelecendo especificações de qualidade. A própolis vermelha obtida de Marechal Deodoro foi submetida a processo de extração para obtenção de extrato bruto e, em seguida, incorporado a sistemas dispersos para a obtenção de microencapsulados. Duas principais técnicas, *spray-drying* e liofilização, foram utilizadas na secagem e obtenção desses microencapsulados (MPV) na forma sólida e de liberação controlada. Os MPVs obtidos por *spray-drying* apresentaram problemas técnicos durante processo de secagem, resultando em altos teores de flavonoides o que não aconteceu com a maioria dos MPVs liofilizados. Estudos reológicos mostraram que MPV A-SD, MPV C-SD, MPV C-LF e MPV D-LF podem ser utilizados em formas farmacêuticas sólidas, enquanto as demais, devido a pobre fluidez podem ser aplicadas em formas farmacêuticas/alimentícias dispersas. Os estudos de dissolução dos MPV A-SD e MPV B-SD apresentaram um modelo de liberação modificada, seguindo um perfil curvilíneo, com liberação máxima de 28% em 12 horas de ensaio.

Palavras-chave: própolis vermelha de Alagoas, *spray-drying*, liofilização, microencapsulados, flavonoides, atividade antibacteriana.

Introdução

A evolução tecnológica no desenvolvimento de qualquer produto, especialmente, na produção de medicamentos, cosméticos e alimentos exige a execução de diretrizes (Yamamoto et al., 2004). De acordo com o conceito de Controle de Qualidade Total, a qualidade é construída durante todo o processo de fabricação de um produto, e não, apenas, na inspeção do produto final, portanto, é considerado um processo dinâmico, que evolui, de acordo com as necessidades que vão surgindo (Santoro, 1988).

Adquirir conhecimentos sobre a matéria-prima é, sem dúvida, o ponto inicial para desenvolver e estabelecer especificações de qualidade. Sendo a própolis um produto natural, esse conhecimento é ainda, mais importante, visto que, há fatores que influenciam, diretamente, na composição química da mesma, que vão, desde, fatores próprios da matéria-prima (espécie coletada e das estações do ano) à fatores externos (métodos de coleta, extrações dos compostos bioativos e metodologias de caracterização da amostra) (Souza et al., 2010). E, como, não há um domínio sobre os fatores próprios, as metodologias de caracterização química e tecnológica, desde que, devidamente adequada, consistem em meios de determinar seu potencial para o desenvolvimento de novos produtos.

A caracterização química e tecnológica dos produtos intermediários e finais é importantíssimo, pois após a obtenção de produtos intermediários, como os microencapsulados, obtidos por processos de secagens distintos, *spray-drying* e liofilização, é possível avaliar os prós e contras, por meio das medições reológicas, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), espectrofotometria de ultra-violeta, dissolução e Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE). Os ensaios reológicos são utilizados com o intuito de caracterizar a facilidade com que um pó ou granulado pode ser despejado, impressado e mantido a forma do

frasco, ou após a extrusão, avaliar a facilidade em esfregar o produto sobre a pele, ou bombear o produto do equipamento onde se procedeu à mistura, ou enchimento (Lachman et al., 2001). A Microscopia Eletrônica de Varredura é empregada para verificar tanto a homogeneidade quanto o tamanho das partículas (Oliveira, 2009). Enquanto que, a Espectrofotometria de UV e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência são utilizadas para identificar/quantificar classes químicas e isolar/identificar/ quantificar substâncias bioativas (Hostettmann et al., 2003), respectivamente. Já, os ensaios de dissolução, amplamente difundido, é um parâmetro crítico é aplicado para determinar o desempenho e proporcionar a qualidade da forma farmacêutica, favorecendo, também, como indicador da velocidade de absorção e, assim, através da correlação dos dados *in vivo* e *in vitro* fixar a qualidade biofarmacêutica de um medicamento, sendo vantajoso no desenvolvimento de formulações e controle de qualidade (Arancibia, 1991).

O objetivo principal deste artigo foi caracterizar química e tecnologicamente os microencapsulados contendo própolis vermelha de Alagoas.

Materiais e Métodos

Material vegetal

Uma quantidade de 300 g de própolis vermelha foi coletada em abril de 2012, oriunda do município de Marechal Deodoro, Alagoas, cujas coordenadas geográficas de latitude sul, longitude oeste e altura são: 9° 42.258', 35° 54.391' e 35,5 metros, respectivamente.

Preparo do extrato bruto

O extrato bruto (100 g) foi obtido por maceração à temperatura ambiente de 250 g de própolis, triturada, utilizando 600 mL de solvente extrator (480 mL de álcool etílico a 96°GL, *Gay Lussac*, e 120 mL água destilada). A maceração foi realizada em três ciclos de extração, para cada ciclo adicionava-se 600 mL de solvente extrator à amostra e, após, um intervalo de

48 horas, transferia-se o sobrenadante para um frasco âmbar e adicionava-se, novamente, mais 600 mL de solvente extrator à própolis; repetiu-se o processo até o término das três extrações. Em seguida, o material resultante foi concentrado em rota- evaporador (Fisatom®) acoplado a uma bomba de vácuo (Tecnal®) e banho-maria (Fisatom®), cujas condições usadas foram velocidade de rotação de 80 rpm, temperatura de banho-maria 40-50°C e pressão de 600 mmHg. O material produzido após rota- evaporação foi armazenado em recipiente aberto à temperatura ambiente, a fim de permitir evaporações dos solventes. Em seguida, o extrato bruto foi mantido em temperatura de congelamento até o momento das análises.

Determinação de novos biomarcadores de própolis vermelha usando CLAE-UV

Os biomarcadores da própolis vermelha foram identificados usando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplado a detector de Ultra-Violeta (Shimadzu). A tintura de própolis vermelha foi preparada a 100mg/mL em etanol e, diluído para concentração de 1mg/mL. As condições estão estabelecidas na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros do método otimizado por cromatografia líquida.

Características	Descrição
Fase móvel	Água (0.1% ácido fórmico): Metanol – modo gradiente
Vazão	0,8 mL/min
Coluna	C18 Shimpak (250 x 4,6 mm; 5µm ID)
Temperatura	35°C
Detector de UV	280nm
Volume de injeção	20 µL

Formulações utilizadas para a obtenção dos microencapsulados

Uma quantidade de 120 g de própolis vermelha foi exatamente pesada e submetida a processo de maceração, como descrito anteriormente. O extrato bruto (75 g) obtido foi seco até obter uma massa de consistência mole. Para a preparação dos Microencapsulados de Própolis Vermelha (MPV) foram utilizados como excipientes: carbapol, goma xantana, ácido esteárico, maltodextrina, pectina e dióxido de silício coloidal.

O MPV A apresentou uma composição de: 15 g do extrato bioativo, 1,5 g de carbapol, 1,5 g de goma xantana, 0,5 g de ácido esteárico, 1,0 g de maltodextrina e 0,5 g de dióxido de silício coloidal. O MPV A foi preparado solubilizando 15 g de extrato bioativo em 130 mL de álcool 96°GL em um béquer. Num outro recipiente, o carbapol foi disperso em 250 mL de água destilada para obter um gel de carbapol. Em seguida, foi adicionado, lentamente, goma xantana ao gel de carbapol e, posteriormente, foi adicionado a maltodextrina ao gel. Uma quantidade de 300 mL de água foi adicionada ao gel até que o mesmo tornasse fluido. Uma quantidade de 0,5 g de dióxido de silício coloidal foi incorporada ao gel. Um volume de 250 mL de álcool 96°GL foi adicionado ao sistema disperso.

O MPV B apresentou a seguinte composição: 9,0 g do extrato bioativo, 1,5 g de carbapol, 6,0 g de goma xantana, 1,5 g pectina e 0,9 g de dióxido de silício coloidal. O MPV B foi preparado solubilizando o extrato bioativo em 80 mL de álcool 96°GL em béquer. A pectina foi dispersa em um sistema água destilada a 37°C e 200 mL de álcool 96°GL para formar um gel pouco viscoso. A tintura foi incorporada lentamente ao gel de pectina e, em seguida, foi adicionado 10 mL de álcool 96°GL para lavar as paredes da vidraria contendo tintura de própolis vermelha. Em outro recipiente, foi preparado o gel de carbapol-goma xantana: adicionando 250 mL de água ao carbapol com o intuito de dispersá-lo em água. A goma xantana foi adicionada lentamente sobre o gel de carbapol formado. Ao final da incorporação da goma xantana, observou-se um gel muito viscoso. Esta viscosidade foi controlada adicionando 750 mL de água destilada. Com o auxílio de uma batedeira, usando velocidade mínima, foi incorporado, lentamente, o gel de pectina contendo tintura de própolis ao gel de carbapol-goma-xantana até que o sistema disperso tornasse uniforme. Ao final, foi adicionado o dióxido de silício ao sistema disperso.

O processo de preparação do MPV C foi semelhante e apresentava os mesmos excipientes do MPV A com exceção de ácido esteárico.

A formulação do MPV D consistia de: 2,5 g de extrato bruto de própolis, 0,9 g de pectina, 0,2 g de carboximetilcelulose, 0,05 g de goma xantana e 0,2 g de dióxido de silício. Primeiramente, foi preparado o gel de pectina, solubilizando este polissacarídeo em 100 mL de água destilada e 60 mL de álcool à 96°GL, processo esse facilitado com homogeneização e, também, no banho-maria. Neste gel, foi incorporado, lentamente, a tintura de própolis (0,1 g/mL) sobre agitação constante. Adicionou-se, delicadamente, a goma xantana. Em outro recipiente, o gel de carboximetilcelulose foi obtido, dispersando-o em 30 mL de água estilada. Em seguida, os dois géis foram misturados, e, por fim, adicionado, o dióxido de silício.

Secagem por spray-drying

A secagem dos microencapsulados foi realizada num *spray-dryer* da marca Buchi®, modelo mini *spray-dryer* B-290, cujas condições utilizadas estão mencionadas na Tabela 2.

Tabela 2: Condições de secagem por *Spray-dryer*.

Características	Descrição
Agulha injetora	1mm
Temperatura de entrada	180°C
Temperatura de saída	110°C
Fluxo de ar	85%
Alimentação	17% (5mL/min)

O equipamento foi submetido a um processo de pré-aquecimento por período de 20 minutos até atingir às condições ideais de secagem. Após este período, realizou-se a agitação da amostra em agitador magnético mantendo a amostra sob agitação por todo o período de secagem (2 horas).

Secagem por Liofilização

Os microencapsulados B e C contendo extrato bioativo de própolis vermelha e obtidos por processo de emulsificação foram submetidos a resfriamento em geladeira por 24 horas, em seguida foram submetidos a congelamento a -20° C por mais 24 horas.

Após congelamento em freezer, os microencapsulados foram submetidos à secagem por liofilização em equipamento da Terroni® conectado a uma bomba de alto vácuo (Platinum®) por um período até que se observasse a redução com posterior permanência constante de vácuo. Após secagem em liofilizador, as amostras foram trituradas em grau e submetidas à determinação de umidade em balança de infravermelho.

Obtenção de cápsulas

Os microencapsulados a base de própolis vermelha de Alagoas, referentes, apenas, as formulações A e B nebulizadas foram acondicionadas em cápsulas rígidas. A princípio, fez-se, necessário, a padronização da quantidade de extrato seco de própolis presente em cada invólucro, visto que, as formulações apresentam composições centesimais distintas, assim, padronizou-se, 0,135 g de extrato seco de própolis, portanto, pesou-se, 0,18 g e 0,283 g das formulações A e B, respectivamente.

Método de Cloreto de Alumínio para determinação de flavonóides totais: flavonas e flavonóis dos microencapsulados

Para a quantificação de flavonoides (flavonas e flavonóis) nas amostras de própolis foram utilizados 0,4 mL de solução de cloreto de alumínio à 2,5% e 2 mL de tintura de própolis a 2mg/mL, transferidos para balão volumétrico de 10 mL e avolumado com etanol à 96°GL. A curva de calibração com quercetina dihidratada à 50 µg/mL e cloreto de alumínio à 2,5% foi obtida na faixa de concentração entre 4 a 20µg/mL. Sendo assim, alíquotas de 2 a 10 mL de solução etanólica de quercetina foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL contendo 1 mL de cloreto de alumínio. O volume final de cada balão foi ajustado com etanol. Um branco para o sistema foi realizado com 1 mL da solução aquosa de cloreto de alumínio diluído em balão volumétrico de 25 mL. As soluções foram mantidas em repouso e no escuro

por um período de 30 minutos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de UV no comprimento de onda de 425 nm.

Determinação direta do teor de flavonoides por espectrofotometria de UV nos microencapsulados

Após prévia dessecação de todos os microencapsulados e extrato bruto de própolis vermelha em estufa de infravermelho à 105°C, pesou-se o correspondente a 100 mg de extrato bruto contido nos microencapsulados de própolis e solubilizou-se em balão volumétrico com 10mL etanol hidratado 96°GL, resultando numa concentração de 10mg/mL. As leituras foram realizadas por espectrofotometria de UV (280nm), após prévia diluição das amostras em concentração de 40µg/mL. Os ensaios foram realizados em triplicata e a determinação do teor de flavonoides totais foi baseada na concentração do padrão de catequina (Sigma-Aldrich®), após prévia validação do método.

A validação do método consistiu em ensaios de seletividade, precisão e exatidão, limites de quantificação e curva de calibração. As curvas de calibração foram realizadas nas concentrações 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 µg/mL e 8,5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 µg/mL utilizando padrão de catequina (Sigma-Aldrich®) e extrato bruto, respectivamente. Foram avaliados a precisão e exatidão intradia e precisão intermediária. Os limites de aceitação para a validação de método analítico foi baseado na Resolução RDC 899/2003 da ANVISA (Brasil, 2003).

Avaliação da dissolução de flavonóides inclusos nos microencapsulados de própolis

Como mencionado, anteriormente, uma quantidade correspondente a 135 mg do extrato bioativo presente dos MPV (A e B) foi introduzida em cápsulas de gelatina dura para avaliar a quantidade dissolvida em meio de dissolução (1000 mL) durante o período de 720

minutos. Uma concentração teórica de 135 µg/mL do extrato representou os 100% de dissolução

Os MPV A e B foram submetidos a perfil de dissolução num dissolutor Nova Ética®, modelo 299, usando temperatura de 37°C, velocidade de rotação de 100 rpm e volume do meio de dissolução 1000mL. Os MEPV A e B foram submetidos a condição de pH 7,4 (tampão fosfato). Uma amostra de 5 mL do meio de dissolução era coletada (com reposição) nos tempos de 30, 60, 120, 180, 270, 360, 540 e 720 minutos. Em seguida, armazenadas em refrigerador, e, no dia seguinte, homogeneizadas e analisadas em fotometria com comprimento de onda ajustado à 280 nm.

Reologia

Na determinação do ângulo de repouso e do tempo de escoamento utilizou-se um funil, suporte, papel e régua. Tais parâmetros foram analisados em triplicata. Para tanto, deixou-se o pó fluir livremente através de um orifício sobre uma superfície plana, formando um cone, onde o ângulo da base desse cone é o de ângulo de repouso, ou seja, o ângulo cuja tangente é a relação entre a altura (h) e o raio (r) do cone formado (WELLS, 1988).

As densidades bruta e compactada e o índice de Carr foram calculadas de acordo com as fórmulas abaixo. Para tanto, mediu-se 5 mL (volume aparente) do microencapsulado em proveta, em seguida, pesou-se este volume (peso da amostra). O pó contido na proveta (5 mL) foi submetido a 250 quedas manuais. E o volume real (volume compactado) foi obtido.

$$\text{Densidade aparente} = \frac{\text{peso da amostra}}{\text{volume aparente}}$$

$$\text{Densidade aparente} = \frac{\text{peso da amostra}}{\text{volume real}}$$

$$\text{Índice de Carr} = \frac{\text{densidade aparente} - \text{densidade real}}{\text{densidade aparente}}$$

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das micropartículas contendo os extratos spray-drying de própolis vermelha foram avaliados com o microscópio eletrônico de varredura. Os pós foram fixados á uma fita adesiva dupla-face, revestido com grafite 40 mA, sob vácuo e analisado em equipamento (Hitachi®, modelo TM 3000). O MEV foi operado à 15 kV com aumento de até 1000 vezes.

Resultados e Discussão

Determinação de novos biomarcadores de própolis vermelha usando CLAE-UV

A análise em CLAE-UV por comparação com padrões demonstrou a presença de novas isoflavonas na própolis vermelha. Até o momento, foram identificadas 18 substâncias fenólicas por CLAE-UV, entre elas, pode-se citar, isoflavonas majoritárias tais como, formononetina, liquiritigenina, biochanina A, crisina, pinocembrina, além de flavonóides em menores concentrações, como quercetina, luteonina, isoliquiritigenina, genisteína, daidzeína, pinobanksina, dalbergina. Além de flavonóides e isoflavonas foi detectada a presença de alguns ácidos fenólicos, são eles, ácido ferúlico, ácido caféico e ácido p-coumárico, além de catequina e epicatequina (Figura 1), resultados semelhantes, também, obtidos por Cabral, 2008.

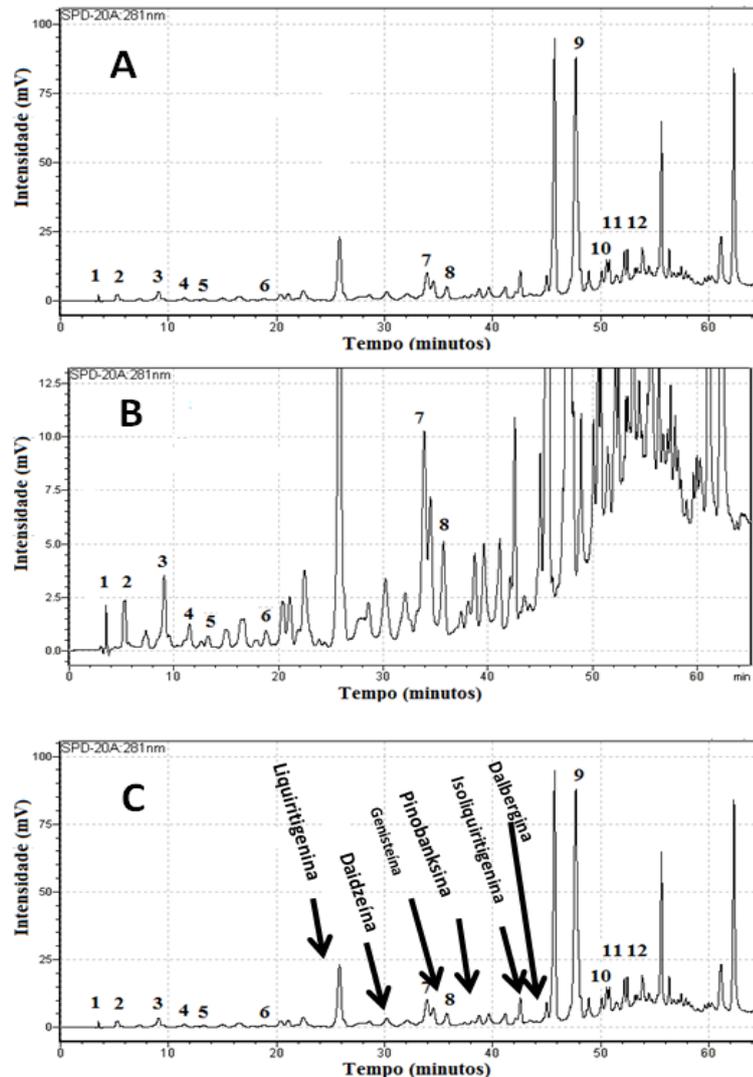


Figura 1: (A) Perfil cromatográfico da tintura de própolis vermelha na concentração de 1 mg/mL. (1) catequina, (2) epicatequina, (3) ácido caféico, (4) ácido p-cumárico, (5) ácido ferúlico, (6) rutina, (7) quercetina, (8) luteolina, (9) formononetina, (10) pinocembrina, (11) biochanina A e (12) crisina; (B) Perfil cromatográfico ampliado do extrato bruto de própolis vermelha; (C) Perfil cromatográfico da tintura de própolis vermelha com a identificação de novas isoflavonas. cumarina e chalcona presente na própolis vermelha.

Caracterização físico-química dos microencapsulados de própolis vermelha

Os microencapsulados de própolis vermelha (MPV) apresentaram características organolépticas de um pó com coloração vermelho intenso à marrom, com redução do cheiro característico de própolis. Com relação à solubilização, o extrato de própolis contido nos microencapsulados apresentaram boa solubilidade em etanol e tampão fosfato pH 7,4, apesar da insolubilidade dos excipientes. Quanto à umidade relativa (UR%), os resultados variaram entre 4,34 % a 9,76% para os microencapsulados obtidos por liofilização e 3,45% a 4,00% para os microencapsulados obtidos por *spray-drying* (Tabela 3). Apesar da alta

variação de umidade relativa obtido no processo de liofilização, os pós mantiveram-se estáveis e ainda dentro de um conteúdo de água considerado bom para a formulação. Permite-se que pós contendo amido podem apresentar umidade relativa de até 15%. Já, as composições nebulizadas foram observadas uma menor variabilidade e, portanto com conteúdo de água adequada para formas farmacêuticas sólidas, como comprimidos e cápsulas, em que se permite um teor entre 2,5 a 3,0 % (BRASIL, 1999). Todas as formulações se mantiveram estáveis e não coalescentes por período de até nove meses após sua obtenção.

Os pós demonstraram diferenças nas características reológicas, expostas na Tabela 5. Todos os microencapsulados obtidos por *spray-drying* e liofilizados apresentaram ângulo de repouso bom à excelente. Em relação ao tempo de escoamento, um único microencapsulados obtido por *spray-drying*, MPV D-SD, e dois microencapsulados obtidos por liofilização, MPV A-LF e MPV B-LF, resultaram em tempo de escoamento superior a 10 segundos (tempo limite).

Em relação ao parâmetro Índice de Carr, que relaciona densidade real e densidade aparente, pode-se observar que, apenas a formulação MPV A-SD foi caracterizada com bom fluxo de escoamento. Outras quatro formulações, MPV C-LF, MPV C-SD, MPV A-LF e MPV D-LF, foram consideradas com fluxo entre regular e pobre, podendo ser ajustadas através de adição de adjuvantes apropriados. Três composições demonstraram características de fluxo de pó inadequadas, MPV B-SD, MPV B-LF e MPV D-SD. (WELLS, 1998). Dentre as formulações os MPV A-SD, MPV C-SD, MPV C-LF, MPV D-LF e MPV A-LF foram os que apresentaram características reológicas mais aceitáveis.

Tabela 3: Parâmetros físico-químicos de caracterização dos microencapsulados de própolis vermelha

Amostra	Cor	UR (%)	Tempo Escoamento (seg.)	Ângulo Repouso (θ°)	Densidade Aparente (g/mL)	Densidade real (g/m)	Porosidade (índice Carr) (%)
Ext. bruto	Vermelho	8,63	-	-	-	-	-

MPV A-SD	Vermelho	3,68	0,45 ± 0,08	18,02 ± 0,17	0,119	0,142	16 (bom)
MPV B-SD	Marrom	4,00	4,74 ± 1,35	19,28 ± 0,90	0,123	0,185	33,33 (+ pobre)
MPV C-SD	Vermelho	3,8	5,31 ± 0,90	20,48 ± 1,24	0,090	0,125	28 (pobre)
MPV D-SD	Vermelho	3,45	20,55 ± 5,63	25,55 ± 2,54	0,051	0,092	44 (++)pobre)
MPV A-LF	Vermelho	6,94	19,60 ± 0,63	26,30 ± 0,91	0,229	0,327	30 (pobre)
MPV B-LF	Vermelho	9,76	39,80 ± 6,45	23,60 ± 2,17	0,130	0,203	36 (+ pobre)
MPV C-LF	Vermelho	9,14	5,54 ± 0,29	20,69 ± 0,96	0,407	0,509	20 (regular)
MPV D-LF	Alaranjado	4,34	3,50 ± 0,87	23,69 ± 0,10	0,219	0,305	28 (pobre)

Determinação do Teor de flavonoides na tintura e microencapsulados de própolis vermelha

A quantificação do teor de flavonoides pela espectrofotometria de UV foi baseada na leitura direta em comprimento de onda específico e sem a necessidade de reações química de complexação e/ou derivatização como nos ensaios de quercetina. A tintura, extratos de própolis vermelha e seus microencapsulados, bem como as frações clorofórmicas apresentaram comprimento de onda máximo em 280nm, semelhante ao padrão de catequina, enquanto o padrão de quercetina apresentou comprimento de onda máximo em 250 e 370nm. Desta forma, o padrão de catequina por apresentar perfil espectrofotométrico semelhante (específico) à tintura, vem demonstrando maior especificidade em relação a quercetina para método de leitura direta na espectrofotometria de UV. Uma das explicações para maior especificidade da catequina pode estar relacionado a grande quantidade não só de isoflavonas, mas também, de isoflavanas presentes na própolis vermelha, com absorção máxima em 280nm, dentre elas, podemos citar violona, vestitol, vestitona (Righi, 2008)

A tintura de própolis vermelha e o padrão de catequina apresentaram boa correlação entre a absorbância e a faixa de concentração estudada. A tintura de própolis apresentou uma equação de reta de ($y = 0,0017833x + 0,00133$; $r^2 = 0,9997$), enquanto a catequina apresentou equação de reta de ($y = 0,0011267x + 0,005933$; $r^2 = 0,9999$) demonstrando que o método pode ser utilizado para ensaios de quantificação de flavonoides/substâncias fenólicas presentes em extratos, tintura, frações e microencapsulados de própolis vermelha.

O método UV de leitura direta mostrou-se boa precisão e exatidão na faixa de concentração estabelecida. Os dados de precisão e exatidão para o extrato bruto de própolis a 10% (tintura de própolis a 10%) apresentou uma variabilidade de 6,90% para precisão intermediária e 7,06% para teste de exatidão. Para o padrão de catequina observou-se uma precisão intermediária de 2,67% e exatidão de 3,53%. A maior variabilidade nos dados da tintura de própolis se deve a maior presença de interferentes em solução (presença de várias classes de metabólitos secundários como terpenos, ácidos fenólicos, flavonoides, isoflavonoides e propolonas), já que o analito se trata de um fitocomplexo.

Os valores de precisão obtidos para tintura e microencapsulados de própolis durante ensaio de quantificação do teor de flavonoides pelo método de leitura, mostrou uma variação de até 4,43%, 3,51% para os microencapsulados obtidos por liofilização e *spray-drying*, respectivamente, e, 0,95% para a tintura de própolis. Enquanto que, pelo método de cloreto de alumínio, os resultados mostram uma variação de até 6,70% para os microencapsulados liofilizados, 11,46% para os nebulizados e 5,51% para a tintura.

A Tabela 4 mostra os valores do teor de flavonoides na tintura e microencapsulados de própolis vermelha. Os dados mostram que o método de complexação usando quercetina como padrão de quantificação de flavonóide, não é adequado para quantificação de flavonóide nas amostras de tintura e microencapsulados de própolis vermelha. Os valores foram muito reduzidos em relação a grande quantidade de isoflavonas presentes na própolis. E este pode ser a justificativa para os valores reduzidos a própolis vermelha apresenta pequena quantidade de flavonóis e flavonas (subclasse de flavonóide semelhante à quercetina e luteolina) presentes na própolis vermelha.

Tabela 4: Determinação da quantidade de flavonoides/substâncias fenólicas na tintura e microencapsulados de própolis vermelha

Amostra	Método UV (complexação)*			Método UV (leitura direta)**		
	Conc. (µg/mL)	Fator diluição	Conc.(mg) /100mg Extrato seco	Conc. (µg/mL)	Fator diluição	Conc.(mg) /100mg Extrato seco

Tintura	0,5150	400	0,206	87,05	250	21,76
MPV A-SD	0,9610	400	0,384	123,17	250	30,79
MPV B-SD	1,1207	400	0,448	163,17	250	40,79
MPV C-SD	0,9845	400	0,394	144,49	250	36,12
MPV D-SD	0,8624	400	0,345	74,97	250	18,74
MPV A-LF	0,6230	400	0,249	82,00	250	20,50
MPV B-LF	0,9610	400	0,384	95,81	250	23,95
MPV C-LF	0,5667	400	0,227	92,87	250	23,22
MPV D-LF	0,8624	400	0,345	126,44	250	31,61

* Padrão utilizado quercetina, $\lambda = 425\text{nm}$; ** Padrão utilizado catequina, $\lambda = 280\text{nm}$.

A comparação entre os processos de secagem mostra que a secagem por liofilização demonstrou ser um método mais adequado do ponto de vista da uniformidade de conteúdo e do teor de flavonoides. Os resultados foram próximos aos valores de tintura. Já o processo de secagem por *spray-drying* mostrou que durante processo de secagem ocorre perda de excipientes por volatilização/sucção e/ou aderência nas paredes do equipamento resultando em teor maior em relação à tintura de própolis vermelha. Nas formulações MPVA-SD, MPVB-SD e MPVC-SD observa-se um aumento no teor com percentagens maiores que 100%, MPV B-SD em relação ao valor teórico (valor inicial). Porém, outros estudos de validação e padronização do processo de secagem podem ser realizados no sentido de avaliar a reprodutibilidade dessa etapa de obtenção dos microencapsulados.

Estudos de Dissolução dos microencapsulados de própolis vermelha

As composições obtidas pelo processo de secagem por *spray-drying* (MPV A-SD e MPV B-SD) foram submetidas ao ensaio de perfil de dissolução para avaliar a solubilidade, a extensão de liberação e a velocidade de dissolução das substâncias fenólicas. A Figura 2 retrata a velocidade de dissolução dos microencapsulados A e B. O MPV B vem apresentando menor velocidade de dissolução em relação ao MPV A, provavelmente devido a maior percentagem de goma xantana nesta composição. Os estudos de dissolução dos MPV A-SD e

MPV B-SD apresentaram um modelo de liberação modificada, seguindo um perfil curvilíneo, com liberação máxima de 28% em 12 horas de ensaio para o microencapsulado A nebulizado.

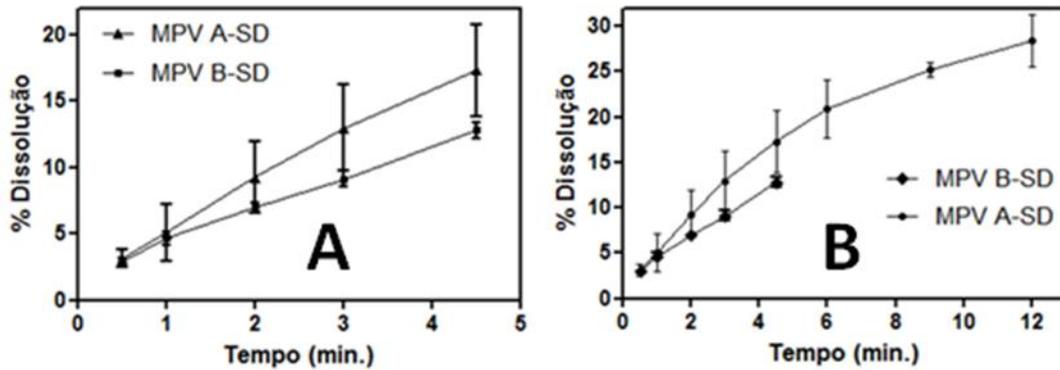


Figura 2: Perfil de dissolução dos microencapsulados A e B em tampão fosfato pH 7.4. Velocidade de rotação dos cestos 100 rpm sob temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$

Microscopia Eletrônica de Varredura

Os microencapsulados obtidos por *spray-drying* apresentaram na forma de partículas esféricas, porém com uma grande variabilidade de tamanho de partícula. Observou-se faixa de tamanho entre < 10 e $30\mu\text{m}$ para MPV A-SD, faixa entre < 10 e $30\mu\text{m}$ para MPV B-SD e faixa entre < 10 e $40\mu\text{m}$ para MPV A-SD. Obtenção de partículas esféricas foi um requisito tecnológico importante neste processo de secagem.

Os microencapsulados obtidos por liofilização apresentaram partículas com formato irregular e não esferonizadas. No processo de secagem por liofilização, as micropartículas sofrem processo de fusão, ou seja, unem-se em placas formando grandes agregados (MPV C-LF e MPV D-LF) dificultando o processo de determinação de tamanho de partículas. Apenas o MPV A-LF apresentou-se na forma de micropartículas de formato irregular com tamanho de partículas que varia entre 20 e $120\mu\text{m}$ (Figura 3).

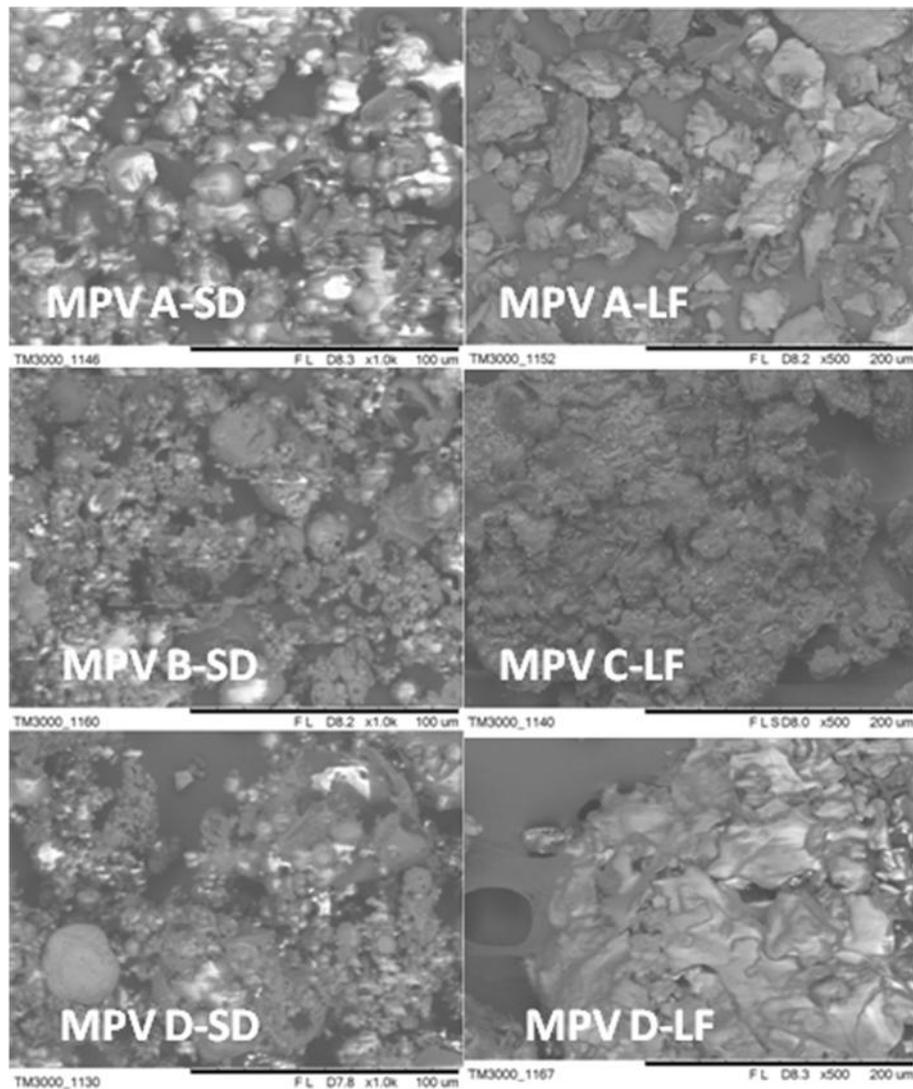


Figura 3: Fotomicroscopia de Varredura Eletrônica dos Microencapsulados A, B, C e D da própolis vermelha de Alagoas obtidos por *spray-drying* e liofilização. Fotomicrografias dos microencapsulados MPV A-SD, MPV B-SD, MPV D-SD obtidos por Spray-Dryer com ampliação de 1000 vezes (escala 100 μ m) e Microencapsulados MPV A-LF, MPV C-LF e MPV D-LF obtidos por liofilização com ampliação de 500 vezes (escala 200 μ m).

Agradecimentos

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao laboratório de Nanociências da Universidade Federal de Alagoas (LNN-UFAL) pelo MEV

(Hitachi®, TM 3000) sob à coordenação do Professor Mário Vermelho.

Referências

Arancibia A 1991. Calidad biofarmacéutica estudios *in vitro* e *in vivo*. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 10:(123-133).Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 899, de 29 de maio de 2003 Determina a publicação do “Guia

para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. *Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 jun de 2003.*

Hostettmann K, Queiroz EF, Vieira PC 2003. *Princípios ativos de plantas superiores*, São Paulo: EDUFSCAR. 152 p.

Lachman HA, Lieberman HA, Kanig JL 2001. *Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica*, Lisboa: Calouste Gulbekian, v 2.

Oliveira, DMF 2009. *Síntese de caracterização de óxidos metálicos nanoestruturados e sua utilização em nanocompósitos com poli(álcool vinílico)*, Maringá, 172 f. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá.

Santoro MIR 1988. *Introdução ao controle de qualidade de medicamentos*, São Paulo: Atheneu, 121p.

Souza LS, Alves RMO, Carvalho CAL, Souza LS, JÚNIOR, CAL 2010. Produção de geoprópolis sob diferentes métodos de coletas em colônias de *Melipona scutellaris* Latreille (Hymenoptera:Apidae). *Magistra*, 23:(10-13).

Wells JI 1988. *Pharmaceutical preformulation: The Physicochemical Properties of Drugs Substances*, England.

Yamamoto CH, Pinto TJA, Meurer VM, Carvalho AM, Rezende P 2004. Controle de Qualidade Microbiológico de Produtos Farmacêuticos, Cosméticos e Fitoterápicos Produzidos na Zona da Mata, MG. *II Congresso Brasileiro de Extensão Universitária*. Belo Horizonte, Brasil.

***Correspondência**

Erika Tayse da Cruz Almeida
Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas
Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro dos Martins
CEP:57072-900 - Maceió – AL, Brasil

.....

Caracterização química e microbiológica de tintura e extratos secos de própolis vermelha

Erika T. C. Almeida^{*1,2}, Maria C. D. Silva^{1,2}, Zenaldo P. Silva¹, Regianne U. Kamiya²
José M. S. Oliveira², Rodolfo E. Arruda², Danilo A. Vieira², Pierre B. Escodro²,
Irialdo D. B. Júnior^{1,2}, David G. Watson³, Ticiano G. Nascimento^{1,2,3}

¹ *Laboratório de Controle de Qualidade e Análise de Fármacos, Medicamentos e Alimentos, Curso de Farmácia, Escola de Enfermagem e Farmácia, Universidade Federal de Alagoas, Campus A.C. Simões, BR 104 Norte - Km 97, Maceió-AL. CEP:57072-970. Phone/Fax: + 55 021 82 3214 1155. E-mail: ticianogn@yahoo.com.br;*

² *Laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico de Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Alagoas, Campus A.C. Simões, BR 104 Norte/Km 97, Maceió-AL. CEP:57072-970. Phone/Fax: +5502182 3214 1155;*

³ *University of Strathclyde, Department of Pharmaceutical Sciences, Strathclyde Institute of Pharmacy and Biomedical Science, 27 Taylor Street, Glasgow, G4 0NR, UK. Tel.: +44 1415482707; Fax: +44 1415526399. E-mail: d.g.watson@strath.ac.uk (D.G. Watson)*

RESUMO: Própolis é um produto natural com enfoque mundial em pesquisa, que, em virtude de sua composição química, em especial de flavonoides e ácidos fenólicos, é responsável por diversas atividades biológicas. As indústrias fitoterapêuticas brasileira estão desenvolvendo extratos secos de própolis, cuja concentração de flavonoides tem sido padronizada, no entanto há uma necessidade de desenvolver novos métodos químicos e físico-químicos e ensaios microbiológicos pra garantir a sua qualidade. O objetivo do estudo foi caracterizar os extratos secos de própolis vermelha por métodos químicos e microbiológicos. Quatro extratos secos nebulizados e quatro extratos liofilizados contendo tintura de própolis vermelha foram estudados. Os flavonóides e as isoflavonoides da própolis vermelha foram caracterizados por CL-UV-FTEM e UV para a identificação e determinação de flavonóides total foi também efetuado. A técnica de microdiluição em caldo foi usada para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Foi

possível identificar os flavonóides, isoflavonas, flavanas, flavonóis e chalconas em extratos de própolis utilizando CLAE-UV em comparação com padrões autênticos e confirmação também foi realizada por meio de espectrometria de massa de alta resolução. A determinação de flavonóides total mostrou concentração de 21,76 mg/100 mg de flavonóides na tintura. Os extractos liofilizados mostraram menor variação em relação ao teor de flavonóides na tintura (20,50-31,61 mg/100 mg), enquanto os extratos secos por pulverização apresentaram uma maior variação no teor de flavonóides (29,99–40,79mg/100mg). Os CIMs dos extratos secos foram de 135,87-271,74 µg/mL para *Staphylococcus aureus* e de 271,74-543,48 µg/mL para *Pseudomonas aeruginosa* em 75% (6/8) das formulações.

Palavras-chave: Própolis vermelha, extratos secos, flavonoides totais, isoflavonas, CL-UV-FTEM, atividade antibacteriana.

Introdução

Própolis é um produto natural com enfoque mundial em pesquisa, que, em virtude de sua composição química, em especial de flavonoides e ácidos fenólicos, é responsável por diversas atividades biológicas. A própolis brasileira é classificada em grupos de acordo com suas propriedades físico-químicas (Park et al., 2000). A própolis vermelha está incorporada no grupo 13 e é encontrada nos estados do Nordeste do Brasil (Bahia, Paraíba, Sergipe, Pernambuco e Alagoas) (Daugusch et al., 2008).

A própolis vermelha que é produzido no Estado de Alagoas-Brasil recebeu um selo de indicação geográfica, devido às suas actividades biológicas distintas e um programa de investigação está em curso, a fim de padronizar o processo de produção, envolvendo diferentes organizações governamentais e não-governamentais. As indústrias fitoterapêuticas brasileira estão desenvolvendo extratos secos de própolis que após seu processamento podem resultar em um produto intermediário cuja concentração de flavonoides tem sido padronizada,

no entanto há uma necessidade de desenvolver novos métodos químicos e físico-químicos e ensaios microbiológicos pra garantir a sua qualidade.

A composição química da própolis têm sido investigada e a presença de isoflavonas (Park et al., 2000), chalconas (Righi et al., 2011), isoflavanas, flavonóis, pterocarpanas (Alencar et al., 2007), terpenos and benzofenonas (Trusheva et al., 2006) têm sido identificadas. A grande quantidade de diferentes classes de metabólitos secundários combinados nesta matéria-prima tem despertado interesse na pesquisa sobre sua atividade biológica já que é uma fonte de fitoquímicos concentrados onde a necessidade de extração de materiais vegetais primários tem sido removido. Além disso, as abelhas coletam a própolis como um anti-infeccioso já têm, por tentativa e erro, realizado rastreio biológico prejudicial.

O método UV-Vis é uma alternativa simples e de baixo custo para métodos analíticos mais complexos e é importante para a garantia da própolis e seus bioprodutos qualidade. O UV-vis pode ser utilizado para a determinação de flavonóides e ácidos fenólicos, utilizando reações de derivatização com agentes complexantes ou por leitura direta utilizando um padrão adequado (Lopes et al., 2000). A Cromatografia Líquida acoplada a diferentes detectores (CL-UV-DAD CL e CL-EM) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-EM), são amplamente utilizados na análise complexa para alimentos, bebidas, produtos farmacêuticos e cosméticos. CL-UV e CL-EM, podem ser boas estratégias para análise de flavonóides e ácidos fenólicos e terpenos, especialmente para a determinação dos compostos presentes na própolis e outros produtos das abelhas em uma análise global (Merk & Gary, 2000; Gómez-Caravaca et al., 2006; Watson et al., 2006). Alguns métodos biológicos têm sido usados para avaliar a eficácia de própolis. Ensaio contra *Artemia salina* (Nunes et al., 2009) e *Saccharomyces cerevisiae Pdr5p* (Lotti et al., 2011) foram citados, mas, métodos microbiológicos, principalmente, têm usado métodos de difusão e microdiluição em ágar, que são utilizados para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). O método de

microdiluição é um barato e altamente reprodutível, sensível e requer uma quantidade menor de amostra e, também, permite um registo permanente (Ostrosky et al., 2008). Os principais objetivos deste trabalho foram caracterizar os extratos secos de própolis vermelha usando ensaios químicos, físicos e microbiológicos na criação de ferramentas de controle de qualidade para a tintura e preparações secas a granel de própolis vermelha.

Materiais e Métodos

Químico e biológicos

Os flavonóides crisina, catequina, pinocembrina, campferol, daidzeína, genisteína, raringenina, galangina, formononetina and biochanina A e catequina, ácido caféico, ácido ferúlico e ácido p-cumárico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e epicatequina e liquiritigenina foram adquiridas da Extrasynthese (Lyon Nord, France) como padrões analíticos. Os flavonóides quercetina, luteolina, rutina foram compradas como padrões secundários da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte/Brasil.

Etanol grau PA, fosfato de potássio dibasic e fosfato de dipotássico monobásico, ácido fórmico e metanol grau CLAE foram comprados da J T Baker (Mallinckrodt, Mexico), acetronitrila grau CLAE foram adquiridos da Fisher Scientific (Leicestershire, UK) e água grau Mili-Q foram produzidas no laboratório.

As cepas de bactérias padronizadas foram da American Type Culture Collection (ATCC) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25293) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Ágar Mueller Hinton, Ágar BHI, Ágar nutriente e resazurina foram os meios de cultura utilizados nos testes microbiológicos.

Própolis vermelha

O material bruto de própolis vermelha (300 g) foram coletados em abril de 2012, em Marechal Deodoro-Alagoas-Brasil, o apiário Ilha do Porto (Própolis A) com coordenadas geográficas de latitude sul: 9° 44.555', latitude oeste: 35° 52.080' e altura de 18.1 metros e apiário Primavera (Própolis B) com coordenadas geográficas de latitude sul: 9° 42.258', latitude oeste: 35° 54.391' e altura de 35.5 metros.

Preparação do extrato bruto

250g de própolis bruta *in natura* foram utilizados para extrair os componentes ativos, através de método de maceração com etanol a 80% (600 ml), com 3 ciclos de extração, em seguida, a amostra foi concentrada em rotaevaporador (Fisatom®), obtendo-se 100 g de extrato bruto de própolis. O extrato bruto foi armazenado em freezer a -20°C até análise. Extratos de clorofórmio (A) e (B) foram obtidos utilizando extração líquido-líquido.

Determinação de biomarcadores de Própolis usando CLAE-UV e CL-Orbitrap-FT-EM

Os marcadores de qualidade da própolis vermelha foram identificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a um detector de ultra-violeta (Shimadzu®). A tintura de própolis foi preparado à 100mg/mL em etanol e em seguida diluída até uma concentração de 1mg/ml.

O sistema de CLAE consistiu de uma bomba LC-10AD, um forno CTO-10AD, um detector de UV SPD-10AD, um controlador CMB-10AD acoplado a um computador através de um software CL-Solução da Shimadzu®. A fase móvel consistiu de um sistema gradiente. Como segue: Solvente A ácido fórmico / água (1:19 v/v) e solvente B metanol grau CLAE (JT Baker, Mallinckrodt, Mexico). A separação foi conseguida utilizando uma coluna C18

Shimpak® (250mm × 4,6mm id, 5µm) equipado com uma coluna de segurança C18 Phenomenex® (4,0mm × 3,0mm i.d.; 5 µm) e mantida a uma temperatura de 35°C. A taxa de fluxo foi de 0,80 mL/min e comprimento de onda do detector de UV ajustado para 281 nm. O sistema a gradiente foi programado como segue: 30% de B no intervalo entre 0 and 7 minutos, 40% B em 15 minutos, 45% em 30 minutos, 60% B em 40 minutos, 80% B em 50 minutos, 90% B em 60 minutos, reduzido para 30% B em 65 minutos e mantido nesta condição isocrática até ao momento de 70 minutos. As amostras foram introduzidas em CLAE usando o injetor Rheodyne com o volume de injeção de 20µL.

A CL-orbitrap-FTEM de Thermo Scientific® foi usada com as seguintes condições: a fase estacionária foi a coluna C18 da ACE® (100 x 4.6 mm; 5µm) e taxa de fluxo foi de 300 µL/min. A fase móvel consistiu de (A) 0,1% ácido formic em água: 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (B) (v:v) em modo gradiente. A coluna foi eluída em modo gradiente, como se segue: começando com 30% de (B) e aumentando para 45% de (B) em 6 min., então aumentando para 60% de (B) em 10 min. e aumentando para 75% em 14 min., em seguida aumentando para 90% em 18 min. e aumentando para 100% em 22 minutos e mantido 100% de (B) entre 22-47 min. e diminuindo para 30% de (B) em 52 min., então mantido em 30% de (B) entre 52-58min. O FTEM foi criado para adquirir íons em modo negativo com uma tensão de 4,0 kV e fluxos de gás auxiliares de 50 e 10 unidades arbitrárias. O instrumento foi verificado na gama de 50-1200 amu. Um volume de 10 mL foi injetado no LC-Orbitrap-FTEM.

Extratos secos de Própolis vermelha

Quatro composições (A, B, C e D) foram preparadas contendo tintura de própolis com algumas variações nas proporções de excipientes utilizados (resultados não publicados). As composições foram submetidos a dois processos de secagem usando *spray-drier* e liofilizador

para obter 8 formulações, que foram, previamente caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Resultados não publicados). Os extratos secos de própolis vermelha obtidos por *spray-drying* (ESPV A-SD, ESPV B-SD, ESPV C-SD e ESPV D-SD) e extratos secos obtidos por liofilização (ESPV A-LF, ESPV B- LF, ESPV C- LF e ESPV D- LF) foram submetidos à determinação do teor de flavonóides totais e teste de atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Determinação de Flavonoides Totais

Os extratos secos foram, previamente, submetidos à secagem em forno de infravermelho à 105°C durante 15 minutos. Os extratos secos de própolis vermelho contendo 100mg de extrato bruto de própolis foram pesados e solubilizados com etanol à 96° GL em balão volumétrico (10mL) para obter uma concentração de 10mg/mL. As leituras foram tomadas em espectrofotômetro de UV (280 nm) após prévia diluição da amostra para uma concentração de 40µg/mL. Os ensaios foram realizados em triplicate e a determinação de flavonoides totais foram baseada em concentração de padrão de catequina. O método foi previamente validado no laboratório (Oliveira e col. 2011).

Teste preliminar da Atividade Antibacteriana

A tintura de própolis vermelha padronizada (10%) foi preparada em balão volumétrico (10 mL) usando etanol à 96°GL para uma concentração de 100.000 µg/mL. Os extratos secos de própolis vermelha foram preparados na mesma concentração da tintura. As soluções de trabalho foram diluídas em tampão fosfato (pH 7.4) para concentrações de 50, 100, 200, 400, 800, 1.500, 1.000 e 2.000 µg/mL e ensaiadas contra cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizadas usando o método de difusão em ágar (Bauer et al, 1966). As cepas padronizadas foram inoculadas em placas de Petri

contendo 20 mL de ágar Mueller Hinton utilizando *swabs* estéreis. 100 μ L da solução de trabalho dos extratos de própolis vermelha foram transferidas para poços de 8 mm diâmetro, que foram preparadas manualmente com ponteiros estéreis. As placas de Petri foram incubadas à 36°C por 24 horas e, em seguida, a leitura dos resultados foram realizadas medindo o diâmetro dos halos formados ao redor dos poços (Figura 1).

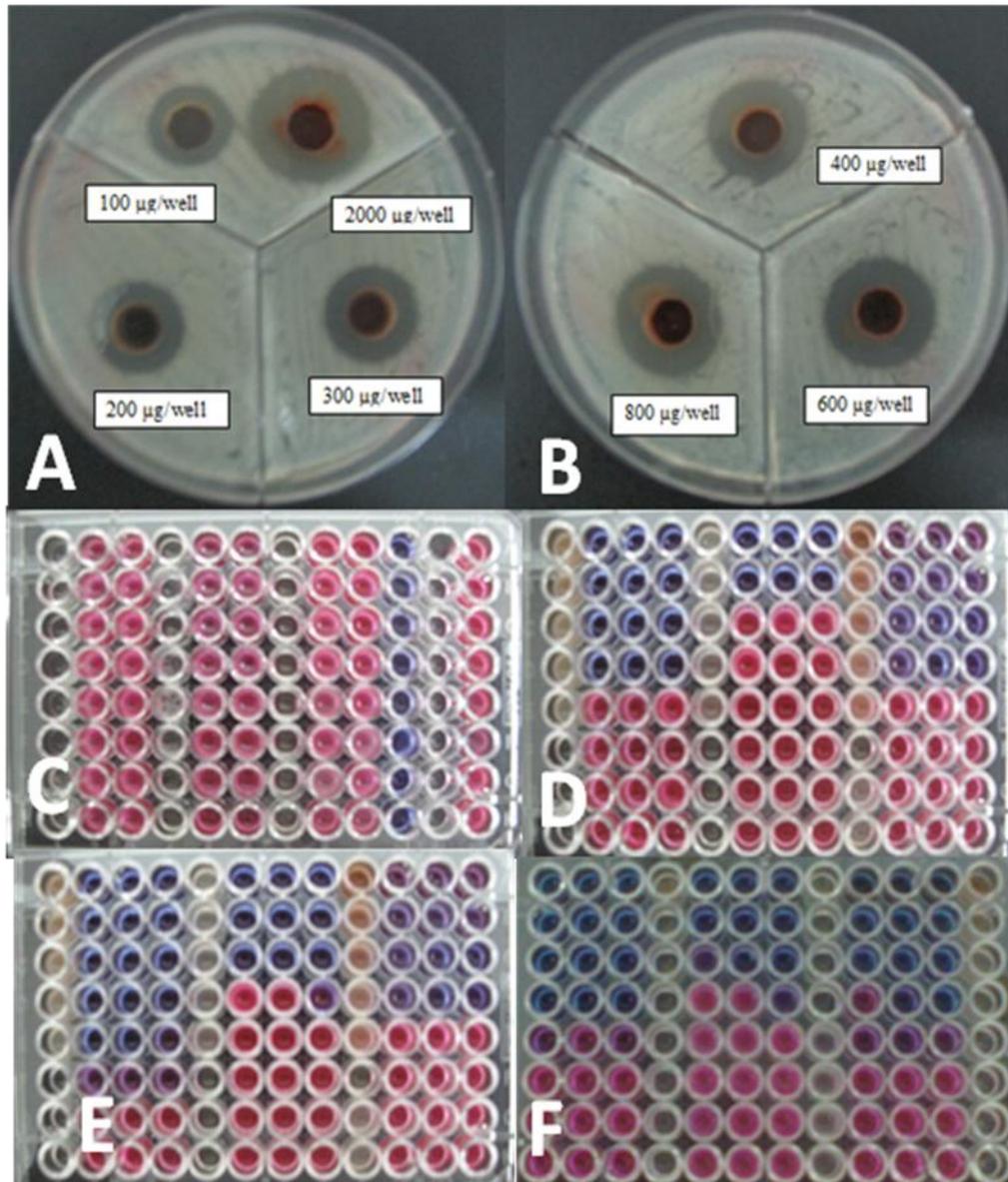


Figura 1 Ensaio de atividade antimicrobiana da tintura de própolis vermelha contra *Staphylococcus aureus* (A) e (B). Concentração Inibitória Mínima (CIM) usando microplacas de 96 poços para *S. aureus* e *P. aeruginosa* (C) controle, (D) tintura, (E) ESPV D-FD e (F) ESPV D-SD. Pontos azuis mostram crescimento de *S. aureus* e *P. aeruginosa* e pontos rosas nas microplacas mostram ausência de crescimento bacteriano.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM) ou ensaio de microdiluição em caldo foi realizado usando microplacas de cultura (96 poços) contendo 100 µl/poço de caldo de Muller Hinton, seguindo o procedimento descrito por CLSI (2006), com algumas modificações. Uma solução estoque foi preparada à 10 mg/mL usando etanol à 96° GL e diluída em caldo Muller Hinton (1250 µg/ml). Diluições seriadas (na razão de 1:2) foi preparada em concentrações variando de 9,765 à 1250 µg/mL, em microplacas. Cerca de 30 µL de suspensão bacteriana (aproximadamente 1.5×10^6 UFC/mL) foi adicionada aos poços contendo 100 µL de caldo Muller Hinton com diferentes concentrações finais de própolis (concentrações variando de 8,91 à 1086,96 µg/mL). As microplacas foram incubadas 36 °C por 24 horas. Os resultados foram observados após adição de 40 µL de solução de resazurina (100µg/mL) e reincubação à 36 °C por 2 horas. Pontos azuis na microplaca mostram crescimento de *S. aureus* e *P. aeruginosa* e pontos rosas mostram ausência de crescimento bacteriano. Diluições seriadas de etanol 96 °GL em caldo Muller Hinton broth foram realizadas como controle negativo (Figura 1). Os valores de CIM foram definidos como a menor concentração que inibiu o crescimento bacteriano. O teste foi realizado em triplicata.

Resultados e Discussão

Determinação de marcadores de própolis usando CLAE-UV e CLAE- Orbitrap-FTEM

O método de CLAE-UV apresentados indicaram a presença de muitos picos cromatográficos no extrato de própolis vermelha demonstrando a complexidade da análise deste material bruto fitofarmacêutico, mas foi possível obter resolução relativa entre os picos usando o método cromatográfico proposto e para fazer novos ajustes para o método gradiente CLAE-FTEM baseado sobre este primeiro. As análises CLAE-UV demonstrou a presença de ácido fenólicos, flavans, flavones, chalconas e isoflavonas em composição de própolis

vermelha. Os picos cromatográficos foram identificados na tintura de própolis vermelha por comparação com padrões nas concentrações de 0,1 à 1,0 mg/mL (Figura 2).

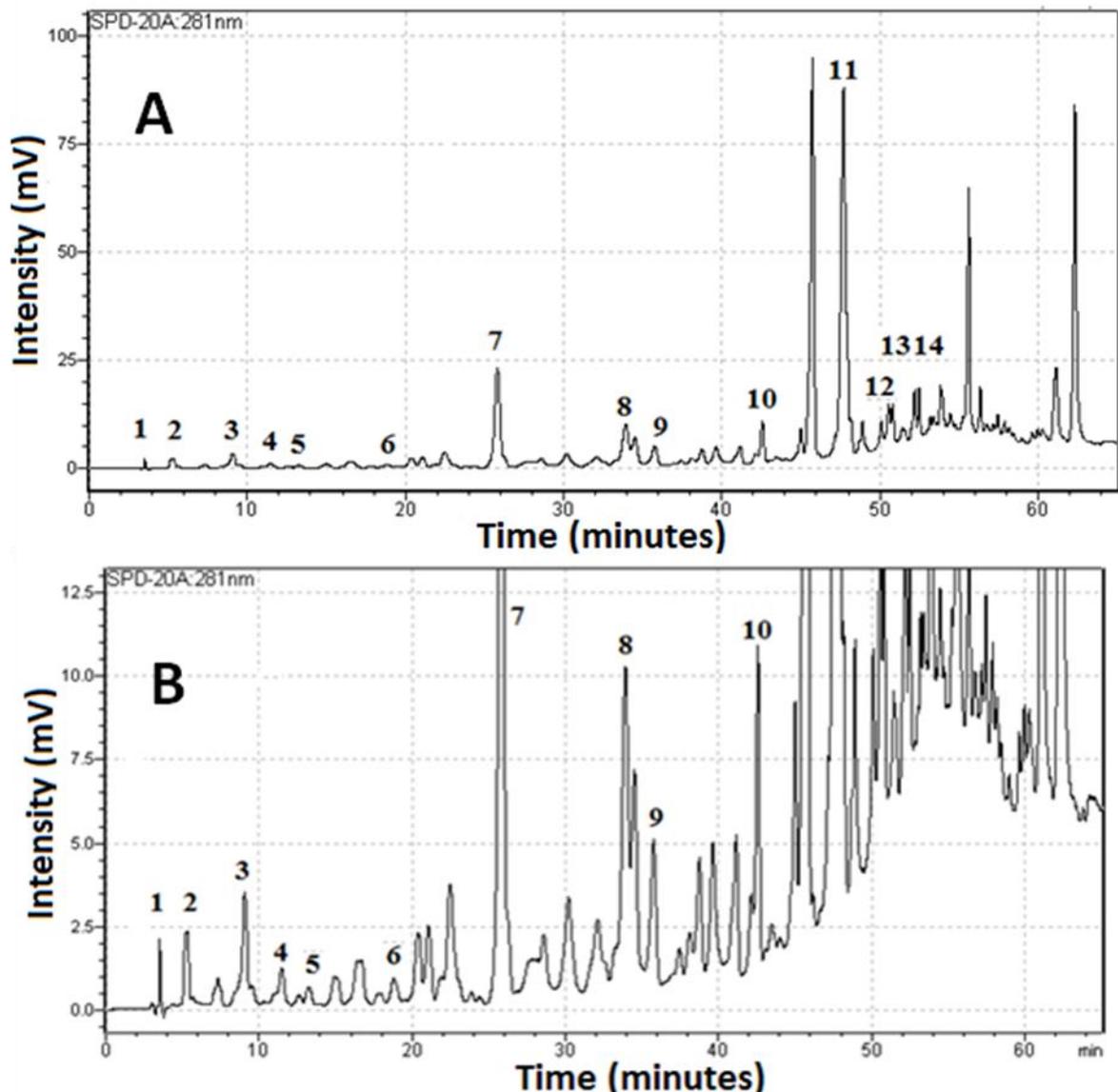


Figura 2: (A) Perfil cromatográfico da tintura de própolis vermelha na concentração de 1 mg/mL. (1) catequina, (2) epicatequina, (3) ácido caféico, (4) ácido p-cumárico, (5) ácido ferúlico, (6) rutina, (7) liquiritigenina, (8) quercetina, (9) luteonina, (10) isoliquiritigenina, (11) formononetina, (12) pinocembrina, (13) biochanina A e (14) crisina; (B) Perfil cromatográfico ampliado do extrato bruto de própolis vermelha.

O mesmo extrato bruto foi utilizado para preparar as tinturas A e B da própolis vermelha, que foram depois injetados no CLAE-Orbitrap-FTEM (figura 3). A confirmação da presença de isoflavonóides, chalconas, flavans, flavonóis, flavonas, ácido fenólico presente na própolis vermelha foram realizados por detecção de íon usando modo negativo do CLAE-

Orbitrap-FTEM e fórmulas foram geradas usando software Xcalibur da Thermo Scientific® (Tabela 1). Outras classes de compostos menos estudadas da própolis vermelha foram também detectadas. No intervalo de 24,0-50,0 minutos foi possível detectar a presença de propolonas e gutifernoas na própolis vermelha. Há um interesse particular nas gutiferoas devido ao sua atividade antimicrobiana, Anti-HIV e anti-câncer e foi possível identificar Omo compostos majoritários as gutiferoas E (MW 602.8) e fórmula ($C_{38}H_{50}O_6$) no tempo de retenção de 32,9 minutos.

Figura 3: Perfil cromatográfico da (A) tintura A e (B) tintura B da própolis vermelha na concentração de 1 mg/mL usando CLAE-Orbitrap-FTEM.

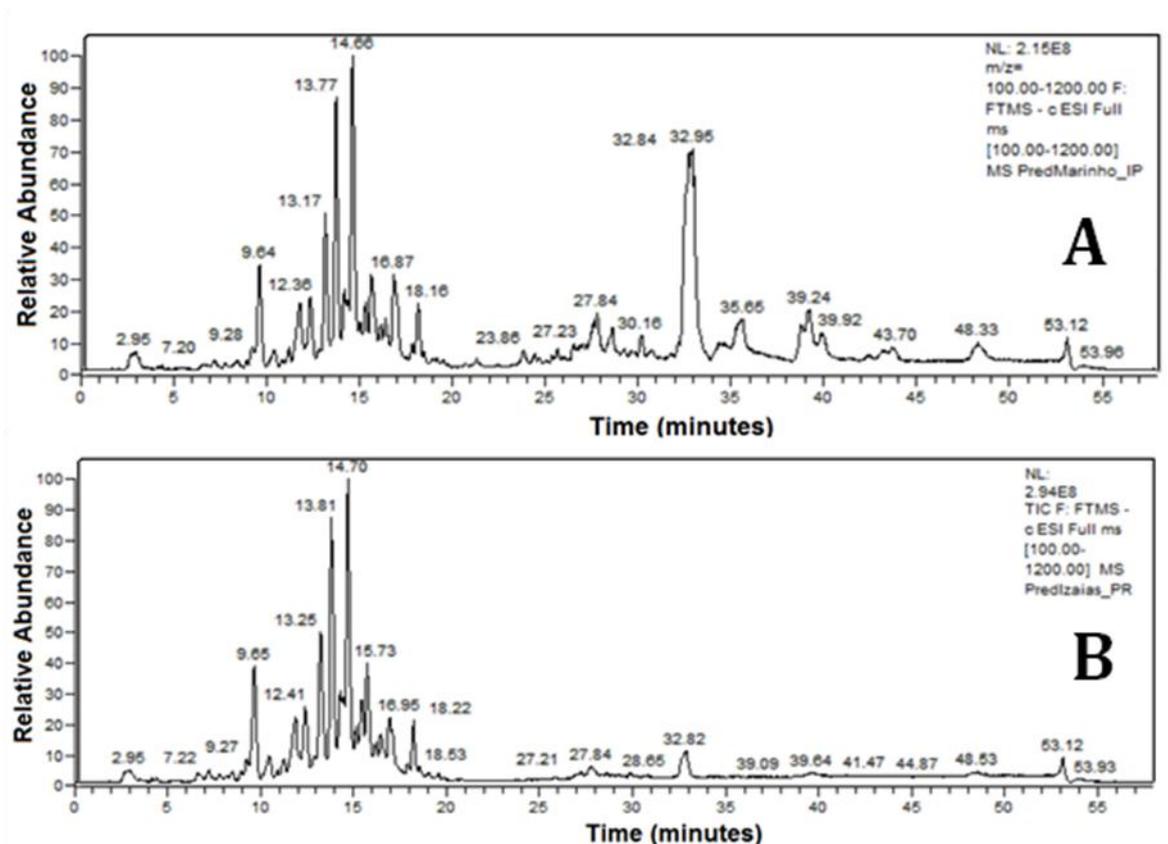


Tabela 1: Identificação e confirmação de alguns biomarcadores da própolis vermelha brasileira em tintura usando CLAE-Orbitrap-FTEM

Pico	t _R (min.)	Formula	[M-H] ⁻ (m/z)	MW	Identificação	Referência
1	2.95	C ₉ H ₈ O ₄	179.0556	180.16	Ácido caféico	authentic standard
2	2.98	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.0502	194.18	Ácido ferúlico	Alencar (2007)
3	3.04	C ₉ H ₈ O ₃	163.0243	164.16	Ácido p-cumárico	authentic standard
4	7.05	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.0811	270.24	Genisteína	authentic standard
5	7.35	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	285.0395	286.24	Kaempferol	authentic standard
	7.82	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299.0550	300.28	Kaempferida	*
6	8.04	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0711	290.27	Catequina	authentic standard
7	8.28	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	287.0553	288.25	Dalbergioidin	*
8	8.83	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0711	290.27	Epicatequina	authentic standard
9	8.95	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	253.0499	254.24	Daidzeína	authentic standard
10	9.34	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271.0602	272.25	Naringenina	authentic standard
11	9.43	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0758	286.24	Luteolina	Daugisch (2008)
12	9.64	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	255.0654	256.27	Liquiritigenina	Daugisch (2008)
13	9.67	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.0593	302.27	Quercetina	Alencar (2007)
14	11.88	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271.0603	271.25	Naringenin	authentic standard
15	11.88	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271.0603	272.26	Pinobanksina	Daugisch (2008)
16	15.79	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.0459	270.24	Galangina	authentic standard
17	13.14	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	255.0654	256.25	Isoliquiritigenina	Daugisch (2008)
18	13.77	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	267.0655	268.28	Formononetina	Daugisch (2008)
19	14.66	C ₁₆ H ₁₆ O ₄	271.0603	272.29	Vestitol	Righi (2011)
20	15.73	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	253.0865	254.25	Crisina	Alencar (2007)
21	16.42	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.0603	284.26	Biochanina A	Daugisch (2008)
22	16.87	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	255.1019	256.27	Pinocembrina	Daugisch (2008)
23	32.88	C ₃₈ H ₅₀ O ₆	601.3517	602.80	Guttiferona E	authentic standard

Fonte: Autor, 2012.

Usando CLAE-Orbitrap-FTEM foi possível observar similaridades entre as tinturas A e B no tempo de retenção entre 2,0 à 22,0 minutos que corresponde ao tempo de eluição dos ácidos fenólicos e flavonóides, no entanto, observou-se diferenças para a tintura B em relação à tintura A com a gama de menor intensidade dos picos de 24,0 à 50,0 minutos e, principalmente para o pico particular em 32,9 minutos (identificado como a Gutiferona E) e detectado em ambas tinturas. CLAE-UV e CLAE-Orbitrap-FTEM foram ferramentas úteis na caracterização química dos extratos de própolis vermelha.

Determinação de Flavonóides Totais na tintura e extratos secos de própolis vermelha

O cromatograma, figura 2 e 3, mostra a ampla gama de compostos fenólicos presentes na própolis vermelha e a grande possibilidade em identificar novos compostos. A própolis vermelha de Alagoas-Brasil é um caso atípico em conta da presença de flavonóides. É possível encontrar muitos metabólitos secundários, tais como, as flavanas (catequina) e isoflavanas (vestitol) presentes na própolis vermelha sem absorção na região do visível e, também, compostos que possuem uma baixa reatividade com os reagentes específicos, como o cloreto de alumínio nas reacções clássicas para a determinação total de flavonóides. Assim, a espectrofotometria de UV para a determinação total de flavonoides, que se baseou na leitura direta em comprimento de onda específico, sem a presença de reacções químicas complexantes e/ou reagentes de derivatização.

Em estudos prévios, foi observado que a tintura, extratos, extratos clorofórmicos, formulações de xaropes e de extratos secos de própolis vermelha tem absorvância no comprimento de onda máximo de 280 nm, semelhante ao padrão de catequina e de forma diferente do padrão quercetina, que mostrou comprimento de onda máximo de 250 e 370nm. Assim, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um método rápido de leitura direta no UV para determinação de flavonóides totais (Oliveira e col. 2011). O padrão catequina apresenta um perfil espectrofotométrico (específica), semelhante à tintura de própolis vermelha e demonstraram uma maior especificidade do que a quercetina para a determinação total de flavonóides. Uma das explicações para uma maior especificidade de catequina pode está relacionado com a grande quantidade de isoflavonas e isoflavanas presentes na própolis vermelha, para os quais a absorção máxima ocorre em 280nm (Righi, 2008).

A tintura de própolis vermelha e o padrão catequina mostrou boa correlação entre a absorção e a faixa de concentração estudada. A tintura de própolis apresentaram uma equação da reta de ($y = 0.0017833x + 0.0133$; $r^2 = 0.9997$), enquanto a catequina apresentou equação

de reta ($y = 0.0011267x + 0.005933$; $r^2 = 0.9999$), demonstrando que o método pode ser utilizado para ensaios de quantificação de flavonóides/fenólicos presentes nos extratos, frações e tintura e microencapsulados de própolis.

Os valores de precisão obtidos para a tintura e de extratos secos de própolis durante o ensaio de quantificação do teor de flavonóides, mostraram uma variação de até 4,3%, 3,51% para os extratos secos obtidos por liofilização e nebulização, respectivamente, e 0,95% para tintura de própolis.

A tabela 2 mostra os valores do teor de flavonóides na tintura e nos extractos secos de própolis. A tintura apresentou teor de flavonóides que corresponde a 21,76 mg de flavonoids/100mg de extrato seco. Enquanto que os extractos secos obtidos por pulverização apresentaram maiores níveis de flavonóides em relação à tintura de própolis e em relação aos extratos secos obtidos por liofilização.

Tabela 2: Determinação de flavonóides totais e substâncias fenólicas na tintura de própolis e extratos secos.

Amostras	UV Method (direct reading)*		
	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Fator de diluição	Conc.(mg) /100mg extrato seco
Tintura	87,05	250	21,76
ESPV A-SD	123,17	250	30,79
ESPV B-SD	163,17	250	40,79
ESPV C-SD	144,49	250	36,12
ESPV D-SD	74,97	250	29,99
ESPV A-LF	82,00	250	20,50
ESPV B- LF	95,81	250	23,95
ESPV C- LF	92,87	250	23,22
ESPV D- LF	126,44	250	31,61

Atividade antibacterina e determinação da Concentração Inibitória Mínima de tintura e extratos secos de própolis vermelha

O teste de suscetibilidade mostrou que a tintura B e as formulações começaram a exibir atividade contra o *Staphylococcus aureus* ATCC 25293 e *Pseudomonas aeruginosa*

ATCC 27853, em concentrações entre 100 e 400 µg/mL. No entanto, o ensaio de confirmação (CIM), utilizando ensaio de microdiluição em caldo foi de 135,87-271,74 µg/mL para *S. aureus* e 271,74-543,48 µg/mL para *P. aeruginosa* (Tabelas 3-4). Eloff et al. (1998) demonstraram que a sensibilidade da microdiluição para determinação da CIM é 32 vezes maior do que a técnica de difusão em disco e, assim, o método de microdiluição em caldo é considerado o padrão ouro (Nader, 2010).

Tabela 3: Atividade antimicrobiana da tintura (B) e extratos clorofórmico (A) and (B) de própolis vermelha contra *S. aureus* e *P. aeruginosa* obtidas usando o ensaio de difusão em ágar.

Conc. (µg/poço)	Diâmetro do halo de inibição (mm) <i>Staphylococcus aureus</i>			Diâmetro do halo de inibição (mm) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
	Tintura B	E.C. A	E.C. B	Tintura B	E.C. A	E.C. B
100	8 mm	15 mm	12 mm	8 mm	20 mm	18 mm
200	8 mm	17 mm	14 mm	8 mm	24 mm	18 mm
400	10 mm	19 mm	15 mm	12 mm	24 mm	22 mm
600	12 mm	20 mm	18 mm	14 mm	26 mm	24 mm
800	12 mm	21 mm	-	16 mm	28 mm	26 mm
1000	12 mm	19 mm	18 mm	16 mm	28 mm	28 mm
2000	14 mm	22 mm	-	18 mm	28 mm	30 mm

*E.C. extrato clorofórmico

A menor atividade de extratos secos pode ser explicada como sendo devido o uso da tintura de própolis vermelha B obtida diretamente do extrato bruto, pois contém baixa quantidade de benzofenonas poliisoprenilada e grande quantidade de outras substâncias sem atividade antibacteriana (graxas e ceras). Trabalhos anteriores utilizando extrato clorofórmio da própolis vermelha (tintura A) enriquecido em flavonóides e benzofenonas poliisoprenilada mostraram faixa de concentração crítica de 80-100µg/mL para *S. aureus* e *P. aeruginosa* (Tabela 3). Trabalhos anteriores relataram atividade anti-bacteriana de alguns gutiferas e propolonas contra cepas Gram-positivos e Gram-negativos (Monzote et al, 2011; Naldoni et al, 2009).

Tabela 4: Atividade Antimicrobiana de diferentes extratos secos de própolis contra *S. aureus* e *P. aeruginosa* obtidas usando ensaios de difusão em ágar e CIM dos extratos secos de própolis vermelha (ESPV) usando o ensaio de microdiluição.

Conc. (µg/poço)	Diâmetro do halo de inibição (mm) <i>Staphylococcus aureus</i>							
	ESPV A*	ESPV B*	ESPV C*	ESPV D*	ESPV A**	ESPV B**	ESPV C**	ESPV D**
50	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm
100	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm
200	10 mm	10 mm	10 mm	8 mm	10 mm	8 mm	10 mm	10 mm
400	12 mm	12 mm	12 mm	10 mm	12 mm	12 mm	12 mm	12 mm
800	14 mm	14 mm	14 mm	12 mm	14 mm	14 mm	14 mm	14 mm
1000	16 mm	14 mm	14 mm	12 mm	14 mm	16 mm	14 mm	14 mm
1500	16 mm	14 mm	16 mm	12 mm	14 mm	16 mm	14 mm	16 mm
2000	16 mm	16 mm	16 mm	14 mm	16 mm	18 mm	16 mm	16 mm
CIM (µg/mL)	135,87- 271,74	135,87- 271,74	135,87- 271,74	271,74- 543,48	135,87- 271,74	271,74- 543,48	135,87- 271,74	135,87- 271,74
Conc. (µg/poço)	Diâmetro do halo de inibição (mm) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>							
	ESPV A*	ESPV B*	ESPV C*	ESPV D*	ESPV A**	ESPV B**	ESPV C**	ESPV D**
50	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm
100	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm
200	10 mm	12 mm	10 mm	8 mm	10 mm	8 mm	10 mm	10 mm
400	12 mm	14 mm	12 mm	8 mm	12 mm	8 mm	12 mm	12 mm
800	14 mm	16 mm	14 mm	10 mm	14 mm	10 mm	14 mm	14 mm
1000	16 mm	16 mm	16 mm	12 mm	16 mm	10 mm	16 mm	16 mm
1500	18 mm	20 mm	18 mm	14 mm	18 mm	14 mm	16 mm	18 mm
2000	20 mm	22 mm	20 mm	16 mm	20 mm	16 mm	18 mm	20 mm
CIM (µg/mL)	271,74- 543,48	271,74- 543,48	271,74- 543,48	543,48- 1086,96	271,74- 543,48	543,48- 1086,96	271,74- 543,48	271,74- 543,48

* Spray-drying ; ** Liofilização

Analisando os dados da CIM foi observado que as formulações de ESPV D-SD e ESPV B-LF foram maiores. No caso de ESPV-SD, pode ser devido ao menor teor de flavonóides totais. Observa-se que (6/8), 75% das formulações mostrou um CIM de 135,87-271,74µg/mL para *S. aureus* e 271,74–543,48 µg/mL para *P. aeruginosa*, estabelecendo-se, assim, uma ordem de susceptibilidade: *S. aureus* > *P. aeruginosa*, e, assim, as concentrações mais baixas foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus* (Gram-positiva), em relação à *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negativo). Esta observação tem sido relatada antes na literatura (Stepanovic et al., 2003).

Bruschi (2006) mostrou zonas de inibição contra *S. aureus* (16.33 ± 0.58 mm) e *P. aeruginosa* (11.00 ± 0.00 mm) com uma suspensão padronizada contendo 2.5×10^7 UFC/mL com tintura à 30% (p/p), mas os extratos secos não mostraram atividade inibitória.

A variação nos resultados microbiológicos pode ser explicado com os fatores associados à técnica de extração, ao local de origem da própolis (flora), a temporada em que foi coletada e quaisquer contaminantes presentes (Bianchini & Bebendo, 1998). Os métodos microbiológicos, meios de cultura e carga microbiológica, também, podem influenciar os resultados obtidos.

Embora não tenha havido, alguns autores sugerem que o efeito inibidor é devido a um efeito sinérgico entre os ácidos fenólicos, flavonóides e outros compostos orgânicos, especialmente pinocebrina, pinobanksina e galangina (Burdock et al., 1998). É provável que os compostos fenólicos atuem ou aumentem a atividade da lisozima, enzima responsável pela desestabilização da parede celular bacteriana, mas estas ações podem variar em função da sensibilidade de cada grupo bacteriano (Andrade, 2010) e esta sensibilidade está ligada, provavelmente, as diferenças estruturais entre as paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As bactérias gram-positivas são consideradas mais sensíveis aos agentes antibacterianos, já que só tem uma parede celular composta, principalmente, por peptideoglicanos, enquanto que as bactérias Gram-negativas, mais resistentes, além de peptideoglicanos, existem uma camada adicional que é rica em lipopolissacáridos, o que dificulta a lise dessas bactérias (Mizoerva et al., 1997). Outros possíveis mecanismos de atividade antibacteriana pode está relacionada com a inibição da motilidade celular (Mizoerva et al., 1997), ação sobre o potencial de membrana; inibição do RNA polimerase, inativação da bomba de efluxo e inibição da síntese de proteínas (Takaisi-Kikuni & Schilcher, 1994; Mizoerva et al., 1997).

Agradecimentos

Os autores agradecem à CNPq/CAPES/FAPEAL a bolsa de estudos do curso de Mestrado em Nutrição e ao CNPq pelo apoio financeiro com o número de concessão 478390/2010-6 do financiamento da pesquisa 14/2010-Universal/MCT/CNPq. Ao Laboratório de Controle de Qualidade Microbiológica para análise de Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas. Aos Apicultores, José Marinho de Lima e José Izaias Zacarias dos Santos, pelo apoio na coleta de matéria-prima e as doações de própolis vermelha.

References

Alencar SM, Oldoni TLC, Castro ML, Cabral ISR, Costa-Neto CM, Cury JA, Rosalen PL, Ikegaki M. 2007. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *J Ethnopharmacol* 113: 278-283.

Andrade UVC. 2010. *Potencial antibacteriano do extrato hidrossolúvel de própolis obtido por hidrólise alcalina para a inibição de cultivos de Staphylococcus aureus e higienização de pré e pós – imersão de tetos de vacas leiteiras*. Curitiba. 85 p. Tese de Doutorado, Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná.

Bauer AW, Kirby WM Sherris, SC, Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American J Clin Pathol* 45: 493-96.

Bianchin LE, Bedendo IP. 1998. Efeito antibiótico da própolis sobre bactérias fitopatogênicas. *Sci agric* 55:149-152.

Bruschi ML. 2006. *Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação de própolis intrabolsa periodontal*. Ribeirão Preto, 320 p. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Burdock GA. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol* 36:347–363.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. NCCLS document M7-A7 26:1-64.

Daugusch A, Moraes CS, Fort P, Park YK. 2008. Brazilian red propolis – chemical composition and botanical. *Evid Based Complement Alternat Med* 5:435-441.

Eloff JN. 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med* 64: 711-713.

Gómez-Caravaca AM, Gómez-Romero M, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. 2006. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharm Biomed Anal* 41:1220-1234.

Lopes RM, Oliveira TT, Nagem TJ, Pinto AS. 2000. Farmacologia de Flavonoides no Controle Hiperlipidêmico em Animais Experimentais. *Biotec Ciência & Desenvol* 17: 18-22.

Lotti C, Castro GMM, Sá LFR, Silva BAFS, Tassis AC, Piccinelli AL, Rastrelli L. 2011. Ferreira-Pereira, A. Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* Pdr5p by a natural compound extracted from Brazilian Red Propolis. *Braz J Pharmacog* 21:901-907.

Merke HM, Gary RB. 2000. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a Review. *J Agr Food Chemistry* 48: 577- 599.

Mirzoeva OK, Grishanin RN, Calder PC. 1997. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects of growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol Res*, 152: 239-246.

Monzote L, Cuesta-Rubio O, Matheussen A, Van Assche T, Maes L, Cos P. 2011. Aantimicrobial evaluation of the polyisoprenylated benzophenones nemorosone and guttiferone A, *Phytother Res* 25: 458-462.

Nader TT. 2010. *Potencial da atividade antimicrobiana in vitro de extratos vegetais do cerrado frente a estirpes de Staphylococcus aureus*. Jaboticabal. 68 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista.

Naldoni F.J., Claudino A.L.R., Cruz, Jr. J.W., Chavasco J.K., Faria e Silva P.M., Veloso M.P., and Dos Santos M.H. 2009. Antimicrobial Activity of Benzophenones and Extracts from the Fruits of *Garcinia brasiliensis*. *J Med Food* 12: 403-407.

Nunes LCC, Galindo AB, Deus ASO Rufino DA, Randau KP.; Xavier HS, Citó AMGL, Neto PJR. 2009. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. *Braz J Pharmacog* 19:524-529.

Oliveira JMS, Silva LR, Neto JC, Nascimento TG, Basilio Junior ID. 2011. Validation of a spectrophotometric method (uv-vis) for determination of total flavonoids of the red propolis from alagoas: use of catechin as biomarker. *International Symposium of Pharmaceutical Sciences* 1:34.

Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. 2008. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacog* 18:301-307.

Park YK, Ikegaki M, Alencar SM. 2000. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. *Science & Environment* 21:85-90.

Righi AA, Alves TR, Negri G, Marques LM, Breyer H and Salatino A. 2011. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *J Sci Food Agric* 91: 2363–2370.

Stepanovic S, Antic N, Dakic I, Svabic VM. 2003. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microb Res* 158:353-57.

Takaisi-Kikuni NB, Schilcher H. 1994. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med* 60:222–227.

Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL, Pasin FR, Tsvetkova I. 2006. Bioactive constituents of brazilian red propolis. *Evid Based Complement Alternat Med* 3: 249-254.

Watson DG, Peyfoon E, Zheng L, Lu D, Seidel V, Johnston B, Parkinson JA, Fearnley J. 2006. Application of Principal Components Analysis to ¹H-NMR Data Obtained from Propolis Samples of Different Geographical Origin. *Phytochem Anal* 17: 323-331.

***Correspondência**

Ticiano Gomes do Nascimento
Faculdade de Nutrição
Escola de Enfermagem e Farmácia
Universidade Federal de Alagoas
Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro dos Martins
CEP: 57072-900 - Maceió – AL, Brasil

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desenvolveu-se microencapsulados de própolis vermelha de liberação controlada através de técnicas de emulsificação/dispersão auxiliados por processo de secagem de liofilização e *spray-drying*.

Os microencapsulados obtidos por *spray-drying* apresentaram problemas técnicos durante processo de secagem, resultaram em altos teores de flavonóides o que não aconteceu com os microencapsulados que sofreram secagem por liofilização.

Estudos reológicos mostraram que MPV A-SD, MPV C-SD, MPV C-LF e MPV D-LF podem ser utilizados em formas farmacêuticas sólidas, enquanto as demais, devido a pobre fluidez podem ser aplicadas em formas farmacêuticas/alimentícias dispersas.

Os estudos de dissolução dos MPV A-SD e MPV B-SD apresentaram um modelo de liberação modificada, seguindo um perfil curvilíneo, com liberação máxima de 38% em 12 horas de ensaio.

Os microencapsulados apresentaram atividade para todos os micro-organismo estudados, porém com diferenças na Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima. Bactérias gram-positivas foram mais susceptíveis que bactérias gram-negativas.

A análise global através de atributo demonstra que das oito formulações estudadas, apenas três são candidatas a etapas de otimização dos microencapsulados de liberação controlada.

REFERÊNCIAS

ADELMANN, J. **Própolis**: Variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicobiana/antioxidante. 2005. 186 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

AGÊNCIA SEBRAE DE NOTÍCIAS AL: Os pequenos negócios em pauta. Indicação geográfica reconhece a própolis vermelha alagoana: certificação, válida internacionalmente, estabelece o estado como único produtor do mundo, 2012. Disponível em: <<http://www.al.agenciasebrae.com.br/noticia.kmf?canal=647&cod=13587685>>. Acesso em: 10 jun. 2012.

AGUIAR, et al. Caracterização físico-química das própolis originárias da região da Mata Atlântica do Estado de Alagoas. **Mensagem Doce**, São Paulo, v. 72, n. 5, p. 15-21, 2003.

ALBUQUERQUE, et al. Medicinal and magic plants from a public market in Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 76-91, 2007.

ALENCAR, et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethonopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.

ALMEIDA, E.C.; MENEZES, H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 8, n. 2, p. 191-212, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-79302002000200002&script=sci_arttext>. Acesso em: 24 de out. 2011.

ALVES, et al. Desenvolvimento De Método Analítico Para Quantificação do Efavirenz por Espectrofotometria no UV-VIS. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1967-1971, 2010.

AMOROS, et al. Synergistic effect of flavones and flavonols against Herpes simplex virus type 1 in cell culture - comparison with the antiviral activity of propolis. **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 1732-1740, 1992.

ANDRADE, U. V. C. **Potencial antibacteriano do extrato hidrossolúvel de própolis obtido por hidrólise alcalina para a inibição de cultivos de Staphylococcus aureus e higienização de pré e pós – imersão de tetos de vacas leiteiras**. 2010. 85 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; JÚNIOR-ALLEN, L. V. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. São Paulo: Artmed, 2000. 775 p.

ARANCIBIA A. Calidad biofarmacéutica estudios *in vitro* e *in vivo*. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 10, n. 2, p. 123-133, 1991.

ARAÚJO, A. L. **Microencapsulação do ferro através da técnica de coacervação complexa**. 2011. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 677 p.

AYRES, D. C.; MARCUCCI, M. C.; GIORGIO, S. Effects of Brazilian propolis on leishmania amazonensis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 2, p. 215–220, 2007.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.

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

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B.G. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissível**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.

BARBOSA, et al. Plantas medicinais: aspectos do uso de fitoterápicos na melhoria de qualidade de vida humana. **X Encontro de Iniciação à Docência**. Universidade Federal da Paraíba, 2007.

BAUER, et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-96, 1966.

BAZO, et al. Protective action of propolis on the rat colon carcinogenesis. **Teratogen Carcinogen Mutagen**, v. 22, p. 183-194, 2002.

BIANCHIN, L. E.; BEDENDO, I. P. Efeito antibiótico da própolis sobre bactérias fitopatogênicas. **Scientia agrícola**, v. 55, p.149-152, 1998.

BORGOGNONI, C. M. **Microencapsulação por liofilização de d-limoneno em maltodextrina e quitosana modificada**. 2005. 123 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 17, de 24 de fevereiro de 2000. Aprova o Regulamento técnico visando normatizar o registro de medicamentos fitoterápicos junto ao sistema de vigilância sanitária. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2000/17_00rdc.htm>. Acesso em: 22 out. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica: Influenza/Variola. 5. ed. Brasília: Funasa, 2002. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº. 132, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o registro de medicamentos específicos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/132_03rdc.htm>. Acesso em: 22 out. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 899, de 29 de maio de 2003 Determina a publicação do “Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada. Resolução nº 48, de 16 de março de 2004a. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Câmara Técnica de Medicamentos Fitoterápicos, instituída pela Resolução - RDC nº 296, de 29 de novembro de 2004b. Nota sobre o registro de produtos contendo própolis. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/catfef/propolis.htm>>. Acesso em: 12 out. 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006a. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 04 mai 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Diabetes Mellitus**/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica – Brasília : Ministério da Saúde, 64 p. il. – (Cadernos de Atenção Básica, n. 16) (Série A. Normas e Manuais Técnicos), 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Projeto Olhar Brasil**. 2007.

BRASIL, et al. Nutracêuticos, alimentos funcionais e fitoterápicos: O uso das plantas, na promoção, prevenção e restauração da saúde. **XI Encontro de Iniciação à Docência**. Universidade Federal da Paraíba, 2008.

BRAITHWAITE, A.; SMITH, F. J. **Chromatographic Methods**, 5. ed. London: Kluwer Academic Publishers, 1999.

BRUSCHI, et al. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. **International Journal Pharmaceutics**, v. 264, n. 2, p. 45–55, 2003.

BRUSCHI, M. L. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação de própolis intrabolsa periodontal**. 2006. 320 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2006.

BÚFALO, M. C.; CANDEIAS, J. M. G.; SFORCIN, J. M. *In vitro* Cytotoxic Effect of Brazilian Green Propolis on Human Laryngeal Epidermoid Carcinoma (Hep-2) Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, n. 4, p. 483-487, 2009.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicological**, v. 36, n. 4, p. 347–363, 1998.

BURIOL, et al. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova**, v. 32, p. 296-302, 2009.

CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids, inflammation. **Prostaglandins, Leucotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 75, p. 197-202, 2006.

CARDOZO, K. H. M. **Estudos de compostos fotoprotetores de radiação ultravioleta em algas: Aminoácidos tipo micosporina (MAAs)**, 2007. 173 f. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Universidade de São Paulo, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica), São Paulo, 2007.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, Milão, v. 73, n. 1, p. 1-6, 2002.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. Própolis do Sudeste e Nordeste do Brasil: Influência da Sazonalidade na Atividade Antibacteriana e Composição Fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512-1516, 2007.

CASTRO, et al. Bioassay guided purification of the antimicrobial fraction of a brazilian propolis from Bahia state. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, 2009.

CARVALHO, J. S. R. **Encapsulamento de Óleo Essencial de *Origanum virens* L. em Matrizes de Gelatina e Gelatina/Sacarose**. 2009. 90 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) – Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.

CERUTTI, P. A. Oxidant stress and carcinogenesis. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 21, n. 1, p. 1-5, 1991.

CERUTTI, P. A. Oxy-radicals and cancer. **Lancet**, v. 344, n. 8926, p. 862-863, 1995.

CHIHUAILAF, R. H.; CONTRERAS, P. A.; WITTEWER, F. G. Pathogenesis of oxidative stress: consequences and evaluation in animal health. **Veterinária México**, v. 33, p. 265-283, 2002.

CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standard. NCCLS document M7-A7 26:1-64, 2006.

CUNHA, et al. Antitrypanosomal Activity of Brazilian Propolis from *Apis mellifera*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, p. 602-604, 2004.

DAUGSCH, et al. Própolis Vermelha e sua origem botânica. **Mensagem Doce**, 2006, n° 89. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/89/msg89.htm>>. Acesso em: 20 set. 2012.

DAUGSCH, et al. Brazilian red propolis – chemical composition and botanical. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p. 435-441, 2008.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: Um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, 1998.

DIÁRIO DA SAÚDE – SIS SAÚDE. Boletim: **Dicas e notícias e informações apícolas**, Porto Alegre, ano IV, n.51, 2010.

DOTA, K. F.; FARIA, M. G.; BRUSCHI, M. L. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from vaginal exudates. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2010.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, p. 711-713, 1998.

ESMERINO, et al. Método microbiológico para determinação da potência de antimicrobianos. **Ciências Biológicas e de Saúde**, v. 10, n. 1, p. 53-60, 2004.

FALCÃO, V. L. C. Política de desenvolvimento territorial: a experiência do fórum territorial do Araripe (Fotear). **Políticas públicas para o semiárido: Experiências e conquistas no nordeste brasileiro**. Fortaleza: Fundação Konrad Adenauer, 2009. p. 67-81.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINTO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11. n. 2, p. 103-112, 2008.

FLEMMING, J. S. **Microencapsulação de nutrientes**. 2012. Disponível em: <<http://pt.engormix.com/MA-avicultura/nutricao/artigos/microencapsulacao-nutrientes-t945/141-p0.htm>>. Acesso em: 20 de Jun de 2012.

FONSECA, et al. Evaluation of the potential of brazilian propolis against UV-Induced oxidative stress. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2010.

FRANCHIN, et al. Comparison of effects of the ethanolic extracts of brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2011.

FREITAS, A. **Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira**. Ministério da Saúde. Núcleo Nacional de Economia da Saúde, Brasília, 2007.

GARDANA, et al. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 390-399, 2007.

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

GÓMEZ-CARAVACA, et al. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1220–1234, 2006.

GRAZIANO, R. M.; LEONE, C. R. Problemas oftalmológicos mais frequentes e desenvolvimento visual do pré-termo extremo. **Jornal de Pediatria**, v. 81, n. 1, p. 95-100, 2005.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 2° ed. Oxford, University Press, 1989. 543p.

HEWITT, W. Microbiological assay for pharmaceutical analysis: a rational approach. **Interpharm**, 2007, 260 p.

HOSTETTMANN K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Paulo: EDUFSCAR. 2003. 152 p.

INOCUCHI, et al. Brazilian green propolis protects against retinal damage *in vitro* and *in vivo*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, n. 1, p. 71-77, 2006.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER José Alencar Gomes da Silva, INCA. Ministério da Saúde. **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2011. 118 p.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER José Alencar Gomes da Silva, INCA. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Educação. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 2. ed, Rio de Janeiro: Inca, 2012. 129 p.

INPI, INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL. Acesso à informação: Indicação geográfica, 2012. Disponível em: <http://www.inpi.gov.br/acesoainformacao/index.php?option=com_content&view=article&id=737:indicacao-geografica&catid=116:perguntas-frequentes&Itemid=248>. Acesso em: 20 mai. 2012.

ISHIHARA, M.; NAOI, K.; HASHITA, M.; ITOH, Y.; SUZUI, M. Growth inhibitory activity of ethanol extracts of Chinese and Brazilian propolis in four human colon carcinoma cell lines. **Oncology Reports**, v. 22, n. 2, p. 349-354, 2009.

JÚNIOR-SILVA, A. A. **Micropartículas biodegradáveis para a liberação prolongada intraocular de fármacos**. 2005. 140 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

JÚNIOR-VIEGAS, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J, Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

KALEGARI, M. **Composição fitoquímica e atividades biológicas de *Rourea induta* Planch, Connaraceae**. 2009. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

KHAYYAL, M. T.; EL-GHAZALY, M. A.; EL-KHATIB, A. S. Mechanism involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. **Drugs Under Experiental and Clinical Research**, v. 19, p. 197-203, 1993.

KLEIN, et al. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.

KOMAROVA, et al. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 45, n. 1, p. 27-31, 2009.

KINDT, T.J.; GOLDSBY, R.A.; OSBORNE, B.A. **Imunologia de Kuby**. 6. ed., Porto Alegre: Editora Artmed, 2008. 704 p.

KROL, et al. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Arzneimittel Forschung**, v. 43, n. 5, p. 607-609, 1993.

LACHMAN, H. A.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. **Teoria e Prática na Industria Farmacêutica**. Lisbos: Calouste Gulbekian, 2001. v 2.

LEITÃO, et al. Comparative evaluation of in-vitro effects of brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of streptococcus mutans. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 11, p. 1834-9, 2004.

LIANDA, R. C. P.; Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Avaliação do Potencial Antioxidante. 2009. 185 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

LOPES, et al. Farmacologia de Flavonóides no Controle Hiperlipidêmico em Animais Experimentais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 17, p. 18-22, 2000.

LOTTI, et al. Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* Pdr5p by a natural compound extracted from Brazilian Red Propolis. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, p. 901-907, 2011.

LUPI, O. Herpes Simples. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 75, n. 3, p. 261- 275, 2000.

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

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. **Mensagem doce**, v. 46, 1998.

MARTINEZ, M. Espectrofotômetro. 2010. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/materiais-de-laboratorio/espectrofotometro/>>. Acesso em: 20 mai. 2012.

MARTÍNEZ, et al. Optimal spray-drier encapsulation process of orange oil. **Proceedings of the 14th International Drying Symposium**, v. A, p. 621-627, 2004.

MARTINS, et al. Liofilização como alternativa para conservação de leite humano. **Journal Institute of Health Sciences**, v. 29, n. 2, p. 119-122, 2011.

MARUYAMA, et al. Antihypertensive effects of flavonoids isolated from brazilian green propolis in spontaneously hypertensive rats. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 7, p. 1244-1250, 2009.

MATIOLI, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Licopeno encapsulado em Goma Arábica e Maltodextrina: Estudo de Estabilidade. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 5, p. 197-203, 2002.

MATSUI, et al. Strong antihyperglycemic effects of water-soluble fraction of brazilian propolis and its bioactive constituent, 3,4,5-tri-o-caffeoylquinic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 11, p. 1797-1803, 2004.

MELO, E; B.; GOMES, A. S.; CARVALHO, I. α and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. **Tetrahedron**, v. 62, n. 44, p. 10277-10302, 2006.

MERKEN, H. M.; GARY, R. B. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577- 599, 2000.

MIRZOEVA, O. K.; GRISHANIN, R. N.; CALDER, P. C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects of growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiology Research**, v. 152, n. 3, p. 239-246, 1997.

MISHIMA, et al. Two related cinnamic acid derivates from brazilian honey bee propolis, baccharin and drupanin, induce growth inhibition in allografted Sarcoma S-180 in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 6, p.1025-1030, 2005.

MONTEIRO, et al. Estudo das condições de saúde das crianças do município de São Paulo (Brasil), 1984/1985: Aspectos epidemiológicos, características sócio-econômicas e ambiente físico. **Revista de Saúde Pública**, v. 20, n. 6, p. 435-445, 1986.

MONTEIRO, C., et al. **Velhos e Novos Males da Saúde no Brasil: A Evolução do País e de suas Doenças**. São Paulo: Editora Hucitec, 1995. 139 p.

MONZOTE, et al. Antimicrobial evaluation of the polyisoprenylated benzophenones nemorosone and guttiferone A. **Phytotherapy research**, v. 25, p. 458-462, 2011.

MOURA, et al. Brazilian green propolis inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2009.

MUELLER, P. S.; **Microencapsulação do Óleo Essencial de Laranja**. 2011. 99 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, 2011.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

NADER, T. T. **Potencial da atividade antimicrobiana in vitro de extratos vegetais do cerrado frente a estirpes de Staphylococcus aureus**. 68 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Estadual Paulista, 2010.

NALDONI, et al. Antimicrobial Activity of Benzophenones and Extracts from the Fruits of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, p. 403-407, 2009.

NECKEL, I. T. **Crescimento e morfologia de ligas de $\text{Co}_x\text{Fe}_{100-x}$ eletrodepositadas sobre Si (111) tipo-n**. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11. ed.. São Paulo: Atheneu, 2005.

NIKAIDO, H. Multidrug resistance in bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 119-178, 2009.

NUNES, et al. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, p. 524-529, 2009

OLDONI, T. L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***. 2007. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Sorocaba, 2007.

OLIVEIRA, A. M. C. **A experiência de um laboratório oficial e o desenvolvimento e validação de uma metodologia para análise de teor de didanosina comprimido: Ferramenta para as Boas Práticas de Fabricação**. 2003. 82 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, São Paulo, 2003.

OLIVEIRA, D. M. F. **Síntese de caracterização de óxidos metálicos nanoestruturados e sua utilização em nanocompósitos com poli(álcool vinílico)**. 2009. 172 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, 2010.

OLIVEIRA, et al. Validation of a spectrophotometric method (uv-vis) for determination of total flavonoids of the red propolis from alagoas: use of catechin as biomarker. **International Symposium of Pharmaceutical Sciences**. 1: 34, 2011.

OSTROSKY, et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.301-307, 2008.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Science & Environment**, v. 21, n. 2, p. 85-90, 2000.

PARK, et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 2, p. 997-1003, 2002a.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2502-2506, 2002b

PARK, K. J.; BIN, A.; BROD, F. P. R. Drying of pear 'd'Anjou' with and without osmotic dehydration. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 97-103, 2002c

PEREIRA, A. L.; PITA, J. R. Alexander Fleming (1881-1955): da descoberta da penicilina (1928) ao Prêmio Nobel. **Revista da Faculdade de Letras**, v. 6, p. 129-151, 2005.

PERKAMPUS, H. H. **UV-VIS Spectroscopy and its applications**, Springer-Verlag: Berlin, 1992.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu, 2000. 309 p.

PRISTA, L. N. ALVES, A. C. MORGADO, R. M. R. **Tecnologia Farmacêutica**. 6 ed., v. 1. Lisboa: Calouste, 2002.

RANKEL, A. S.; LIEBERMAN, H. A.; SCHIFFMAN, R. F. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. 6 ed., v. 1. Lisboa: Calouste, 2001.

RIGHI, et al. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 2363–2370, 2011.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégia para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.

RODRIGUES, L. N. C.; WATANABE, S. P.; FERRAZ, H. G. Perfil de Dissolução *in vitro* de Comprimidos de Primaquina Disponíveis para o Tratamento de Malária no Brasil, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 1, p. 41-45, 2008.

SALATINO, et al. Origin and chemical variation of brazilian propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, p. 33-38, 2005.

SALOMÃO, et al. Brazilian Green Propolis: Effects *in vitro* and *in vivo* on *Trypanosoma cruzi*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2009.

SANTORO, M. I. R. M. **Introdução ao controle de qualidade de medicamentos**, São Paulo: Atheneu, 1988. 121p.

SANTOS, R. E. **Investigação sobre formação e estabilidade térmica dos silicetos de Ni e Ni (Pt) em substratos de Si (100)**. 2003. 99 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

SEBRAE, SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Informações de mercado sobre mel e derivados da colmeia**. Série Mercado, Brasília, 2006.

SFORCIN, et al. Seasonal effect on brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 243-249, 2000.

SFORCIN, J. M.; KANENO, R.; FUNARI, S. R. C. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of brazilian propolis on natural killer activity. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 8, n. 1, p. 19-29, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-79302002000100003&script=sci_arttext>. Acesso em: 25 out. 2011.

SHIMAZAWA, et al. Neuroprotection by brazilian green propolis against *in vitro* and *in vivo* ischemic neuronal damage. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n.2, p. 201–207, 2005.

SHIMIZU, et al. Efficacy of brazilian propolis against Herpes Simplex Virus Type 1 infection in mice and their modes of antiherpetic efficacies. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2011.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1994. 387 p.

SIMÕES, et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre:UFRGS, 2007. 1102 p.

SKOOG, et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2006.

SOARES, L. A. L. **Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek - Celastraceae**. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final. 2002. 285p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA/SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO/SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 95, p. 1-51, 2010.

SOUZA, R. F. V.; GIOVANI, W. R. F. **Spectrochim Acta**, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy (SAA), 1985.

SOUZA, et al. Produção de geoprópolis sob diferentes métodos de coletas em colônias de *Melipona scutellaris* Latreille (Hymenoptera:Apidae). **Magistra**, v. 23, p. 10-13, 2010.

STEPANOVIC, et al. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. **Microbiological Research**, v. 158, p. 353-57, 2003.

TAKAISI-KIKUNI, N. B.; SCHILCHER, H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. **Planta Medica**. v. 60, n. 3, p. 222–227, 1994.

TAKEMURA, et al. 3,4- dicaffeoylquinic acid, a major constituent of brazilian propolis, increases TRAIL expression and extends the lifetimes of mice infected with influenza A virus. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2011.

TEMPORINI E. R.; KARA-JOSÉ N. Níveis de prevenção de problemas oftalmológicos. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 58, n. 3, p. 189-192, 1995.

TEMPORINI E. R.; KARA-JOSÉ N. A perda da visão: Estratégias de prevenção. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 67, n. 4, p. 597-601, 2004.

TREVISAN, M. G.; POPPI, R. J. Química analítica de processos. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p.1065-1071, 2006.

TRUSHEVA, et al. Bioactive constituents of brazilian red propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.3, p. 249-254, 2006.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto e Contexto de Enfermagem**, Florianópolis, v. 15, n. 1, p. 115-121, 2006.

VALDÉS, G.; RUIZ, M.; MARTIN, M. Características de los propóleos de los municipios Mariel y Madruga de la provincia La Habana. **Ciencia y Técnica Agricultura-Apicultura**, v. 5, p. 25-37, 1989.

VOLPI, N.; BERGONZINI, G. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, p. 354-361, 2006.

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

WATSON, et al. Application of Principal Components Analysis to ¹H-NMR Data Obtained from Propolis Samples of Different Geographical Origin. **Phytochemical Analysis**, v. 17, p. 323-331, 2006.

WELLS, J. I. **Pharmaceutical preformulation: The Physicochemical Properties of Drugs Substances**, England, 1988.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prevention and control of intestinal parasitic infections**. Geneve: WHO, 1987. 88 p.

YAMAMOTO, et al. Controle de Qualidade Microbiológico de Produtos Farmacêuticos, Cosméticos e Fitoterápicos Produzidos na Zona da Mata, MG. 2004. In: 2^o Congresso Brasileiro de Extensão Universitária. 2004, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 2004.

ZHU, et al. Biological activities of chinese propolis and brazilian propolis on streptozotocin-induced type 1 Diabetes Mellitus in rats. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2010.

APÊNDICES

Tabela1 - Composição geral das formulações A e B.

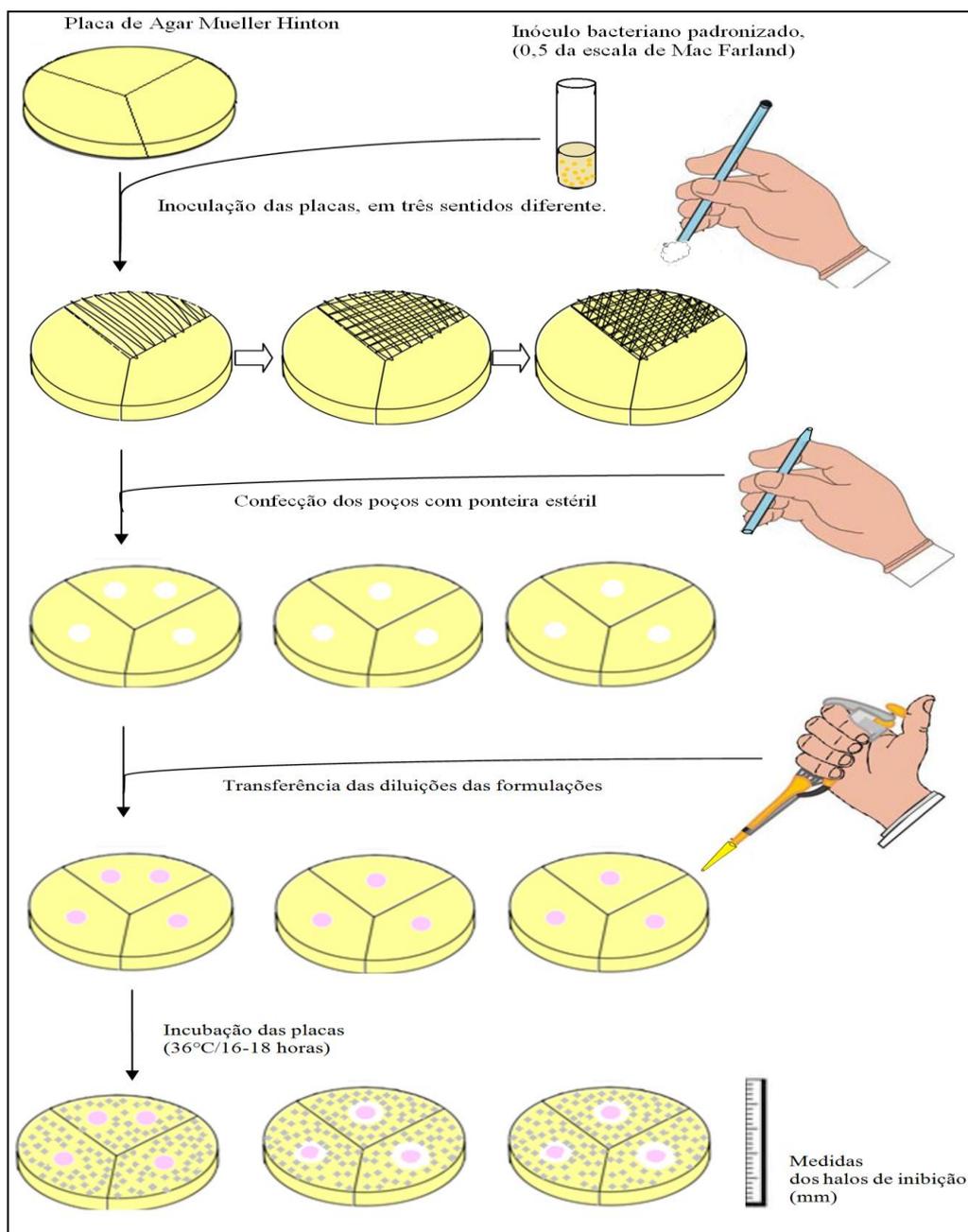
Formulações	Microencapsulado (própolis + excipientes)	Extrato bruto de própolis	Peso padronizado de pó
MPV A	20 g	15 g	0,18 g
MPV B	18,9 g	9,0 g	0,283 g

Fonte: Autora, 2012.

Tabela 2 – Obtenção das diluições de formulações intermediárias de própolis vermelha de Alagoas obtidas a partir das soluções estoque

$C_{(inicial)}$	$V_{(transferido)}$	$C_{(final)}$	$V_{(final)} = V_{(transferido \text{ de tintura})} + V_{(tampão)}$	Micro-organismo-teste
1.000µg/mL	25 µL	50 µg/mL	500 µL = 25 µL + 475 µL	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>
1.000µg/mL	50 µL	100 µg/mL	500 µL = 50 µL + 450 µL	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>
1.000µg/mL	100 µL	200 µg/mL	500 µL = 100 µL + 400 µL	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>
1.000µg/mL	200 µL	400 µg/mL	500 µL = 200 µL + 300 µL	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>
10.000µg/mL	40 µL	800 µg/mL	500 µL = 40 µL + 460 µL	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>
10.000µg/mL	50 µL	1.000 µg/mL	500 µL = 50 µL + 450 µL	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>
10.000µg/mL	75 µL	1.500 µg/mL	500 µL = 75 µL + 425 µL	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>
10.000µg/mL	100 µL	2.000 µg/mL	500 µL = 100 µL + 400 µL	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>
10.000µg/mL	125 µL	2.500 µg/mL	500 µL = 125 µL + 375 µL	<i>E.coli</i>
10.000µg/mL	150 µL	3.000 µg/mL	500 µL = 150 µL + 350 µL	<i>E.coli</i>
10.000µg/mL	200µL	4.000 µg/mL	500 µL = 200 µL + 300 µL	<i>E.coli</i>
10.000µg/mL	250µL	5.000 µg/mL	500 µL = 250 µL + 250 µL	<i>E.coli</i>

Fonte: Autora, 2012.

Figura 1 - Esquema para obtenção da CIM preliminar.

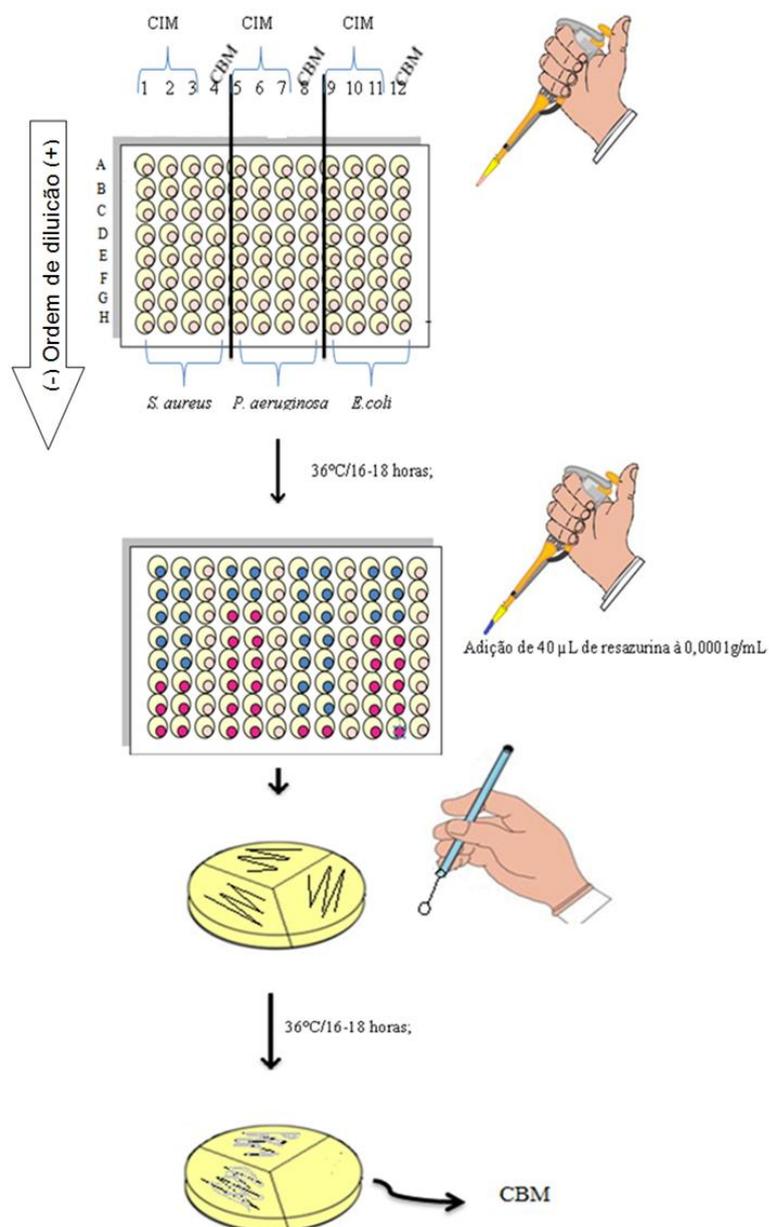
Fonte: Autora, 2012.

Quadro 1 - Esquematização das concentrações em cada poço

	<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				<i>Escherichia coli</i>			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1086,96 µg/mL				1086,96 µg/mL				3478,26 µg/mL			
B	543,48 µg/mL				543,48 µg/mL				1739,13 µg/mL			
C	271,74 µg/mL				271,74 µg/mL				869,57 µg/mL			
D	135,87 µg/mL				135,87 µg/mL				434,78 µg/mL			
E	67,93 µg/mL				67,93 µg/mL				217,39 µg/mL			
F	33,97 µg/mL				33,97 µg/mL				108,7 µg/mL			
G	16,98 µg/mL				16,98 µg/mL				54,35 µg/mL			
H	8,91 µg/mL				8,91 µg/mL				27,17 µg/mL			

Fonte: Autora, 2012.

Figura 2 - Em cada placa será avaliada uma formulação frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. As colunas 4, 8 e 12 servirão de suporte para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM). Nas linhas (A a H) ocorrerão as diluições seriadas.



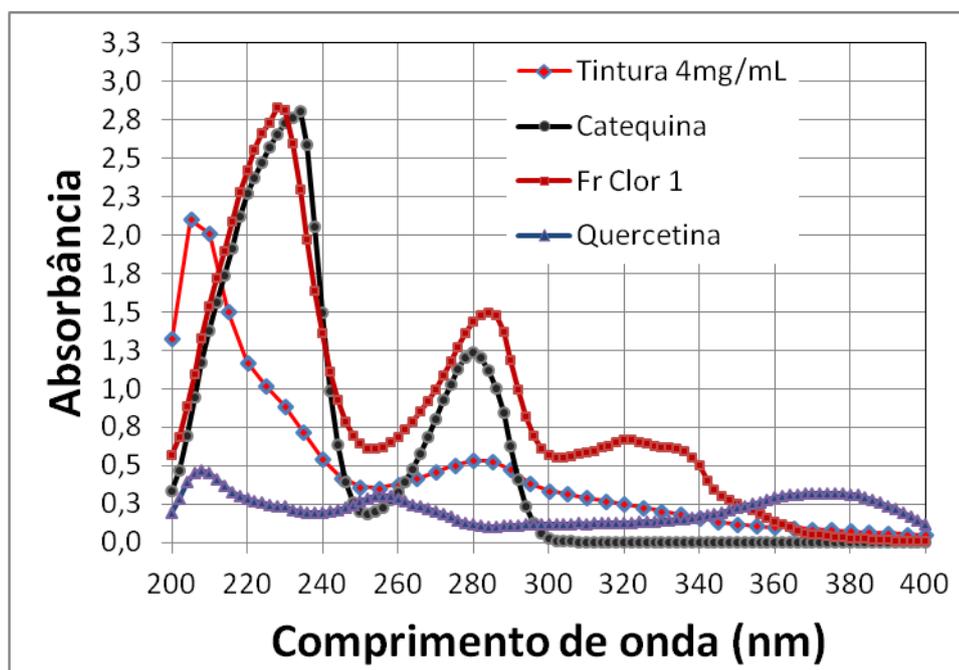
Fonte: Autora, 2012.

Figura 3 - A) Microencapsulados obtidos por liofilização; B) Microencapsulados obtidos por *spray-drying*;



Fonte: Autora, 2012.

Figura 4 – Ensaio comparativo de seletividade entre padrão catequina e extrato de própolis vermelha.



Fonte: Autora, 2012.

Tabela 3 - Precisão e exatidão para ensaio de determinação do teor de flavonoides pelo método UV (alternativo) nos extrato bruto de própolis a 10%.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão intermediária						Exatidão (%)
	1º Dia	2º Dia	3º Dia	Média	DP	% CV	(% Bias)
70	70,53	70,12	75,88	72,18	3,22	4,46	3,11
60	62,06	58,41	65,29	61,92	3,44	5,56	3,20
50	53,12	48,29	55,35	52,25	3,61	6,90	4,51
40	39,71	38,82	43,41	40,65	2,43	5,99	1,62
30	30,65	30,06	32,47	31,06	1,26	4,05	3,53
20	19,53	19,82	21,76	20,37	1,21	5,96	1,86
10	10,47	11,18	10,47	10,71	0,41	3,81	7,06
5	5,53	5,00	4,94	5,16	0,32	6,28	3,14

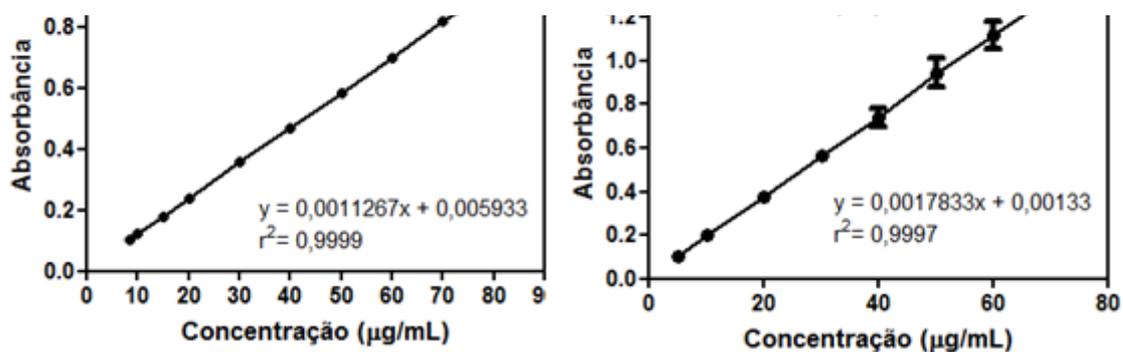
Fonte: Autora, 2012.

Tabela 4 - Precisão e exatidão para ensaio de determinação do teor de flavonoides pelo método UV (alternativo) no padrão de catequina.

Concentração (µg/mL)	Precisão intermediária						Exatidão (% Bias)
	1º Dia	2º Dia	3º Dia	Média	DP	% CV	
80	80,00	82,27	82,09	81,45	1,26	1,55	1,82
70	71,82	72,82	72,09	72,24	0,52	0,72	3,20
60	61,36	61,82	61,45	61,55	0,24	0,39	2,57
50	50,73	51,18	51,27	51,06	0,29	0,57	2,12
40	41,36	41,00	40,73	41,03	0,32	0,78	2,58
30	31,36	31,27	30,55	31,06	0,45	1,44	3,53
20	20,45	20,45	20,55	20,48	0,06	0,28	2,42
15	15,09	15,00	15,27	15,12	0,14	0,91	0,80
10	10,27	10,09	10,36	10,24	0,14	1,34	2,40
5	8,45	8,91	8,64	8,67	0,23	2,67	1,96

Fonte: Autora, 2012.

Figura 5 - Curva de calibração da catequina e tintura de própolis 10% para ensaios quantitativos.



FONTE: Autora, 2012.

Tabela 5 - Obtenção dos dados de absorbância pelo método de reação colorimétrica usando quercetina como padrão para flavonoide.

Amostra	ABS 1	ABS 2	ABS 3	Média	DP	%CV
Tintura	0,046	0,043	0,048	0,046	0,0025	5,51
MPV A-SD	0,075	0,079	0,078	0,077	0,0021	2,69
MPV B-SD	0,085	0,090	0,091	0,089	0,0032	3,63
MPV C-SD	0,077	0,085	0,075	0,079	0,0053	6,70
MPV D-SD	0,055	0,055	0,048	0,070	0,0021	2,96
MPV A-L	0,052	0,060	0,048	0,053	0,0061	11,46
MPV B-L	0,055	0,051	0,058	0,077	0,0021	2,69
MPV C-L	0,051	0,050	0,047	0,049	0,0021	4,22
MPV D-L	0,071	0,072	0,068	0,070	0,0021	2,96

Fonte: Autora, 2012.

Tabela 6 - Obtenção dos dados de absorbância pelo método leitura direta em UV usando catequina como padrão para flavonóide

Amostra	ABS 1	ABS 2	ABS 3	Média	DP	%CV
Tintura	0,961	0,979	0,967	0,969	0,0092	0,95
MPV A-SD	1,397	1,347	1,366	1,370	0,0252	1,84
MPV B-SD	1,822	1,890	1,730	1,814	0,0803	4,43
MPV C-SD	1,560	1,665	1,595	1,607	0,0535	3,33
MPV D-SD	0,858	0,834	0,813	0,835	0,0225	2,70
MPV A-L	0,921	0,922	0,896	0,913	0,0147	1,61
MPV B-L	1,068	1,042	1,089	1,066	0,0235	2,21
MPV C-L	1,051	1,036	1,014	1,034	0,0186	1,80
MPV D-L	1,396	1,46	1,363	1,406	0,0493	3,51

Fonte: Autora, 2012.

Tabela 7 - Ensaio de dissolução da composição MPV A-SD com leitura em absorbância.

Tempo (horas)	Cuba 1	Cuba 2	Cuba 3	Média	DP
0,5	0,106	0,086	0,074	0,089	0,016
1	0,193	0,104	0,107	0,135	0,051
2	0,309	0,197	0,198	0,235	0,064
3	0,412	0,282	0,275	0,323	0,077
4,5	0,518	0,399	0,361	0,426	0,082
6	0,591	0,494	0,445	0,510	0,074
9	0,615	0,63	0,591	0,612	0,020
12	0,662	0,763	0,631	0,685	0,069

Fonte: Autora, 2012.

Tabela 8 - Determinação da concentração (%) nas cubas de dissolução da composição MPV B-SD.

Tempo (horas)	Cuba 1	Cuba 2	Cuba 3	Média	DP
0,5	2,70	2,82	3,24	2,92	0,28
1	4,42	4,33	5,17	4,64	0,46
2	6,68	6,85	7,39	6,97	0,37
3	8,46	9,29	9,59	9,11	0,59
4,5	12,16	12,95	13,29	12,80	0,58
6	*	*	*	*	*
9	*	*	*	*	*
12	*	*	*	*	*

* Dados excluídos do ensaio por conta de falha mecânica do dissolutor

Fonte: Autor, 2012.

Tabela 9 - Determinação da concentração ($\mu\text{g/mL}$) nas cubas de dissolução da composição MPV A-SD

Tempo (horas)	Cuba 1	Cuba 2	Cuba 3	Média	DP
0,5	5,22	4,09	3,42	4,24	0,91
1	10,12	5,12	5,29	6,84	2,84
2	16,67	10,36	10,42	12,49	3,63
3	22,53	15,18	14,79	17,50	4,36
4,5	28,59	21,82	19,68	23,36	4,65
6	32,82	27,25	24,49	28,19	4,24
9	34,33	35,01	32,80	34,05	1,13
12	37,14	42,65	35,20	38,33	3,86

Fonte: Autor, 2012.

Tabela 10 - Determinação da concentração (%) nas cubas de dissolução da composição MPV A-SD

Tempo (horas)	Cuba 1	Cuba 2	Cuba 3	Média	DP
0,5	3,86	3,03	2,53	3,14	0,67
1	7,50	3,80	3,92	5,07	2,10
2	12,35	7,68	7,72	9,25	2,69
3	16,69	11,25	10,95	12,96	3,23
4,5	21,18	16,16	14,58	17,31	3,44
6	24,31	20,19	18,14	20,88	3,14
9	25,43	25,94	24,30	25,22	0,84
12	27,51	31,59	26,08	28,39	2,86

Fonte: Autor, 2012.

Tabela 11 - Ensaio de dissolução da composição MPV B-SD com leitura em absorvância.

Tempo (horas)	Cuba 1	Cuba 2	Cuba 3	Média	DP
0,5	0,078	0,081	0,091	0,083	0,0068
1	0,119	0,117	0,137	0,124	0,0110
2	0,173	0,177	0,19	0,180	0,0089
3	0,215	0,235	0,242	0,231	0,0140
4,5	0,303	0,322	0,33	0,318	0,0139
6	*	*	*	*	*
9	*	*	*	*	*
12	*	*	*	*	*

* Dados excluídos do ensaio por conta de falha mecânica do dissolutor.

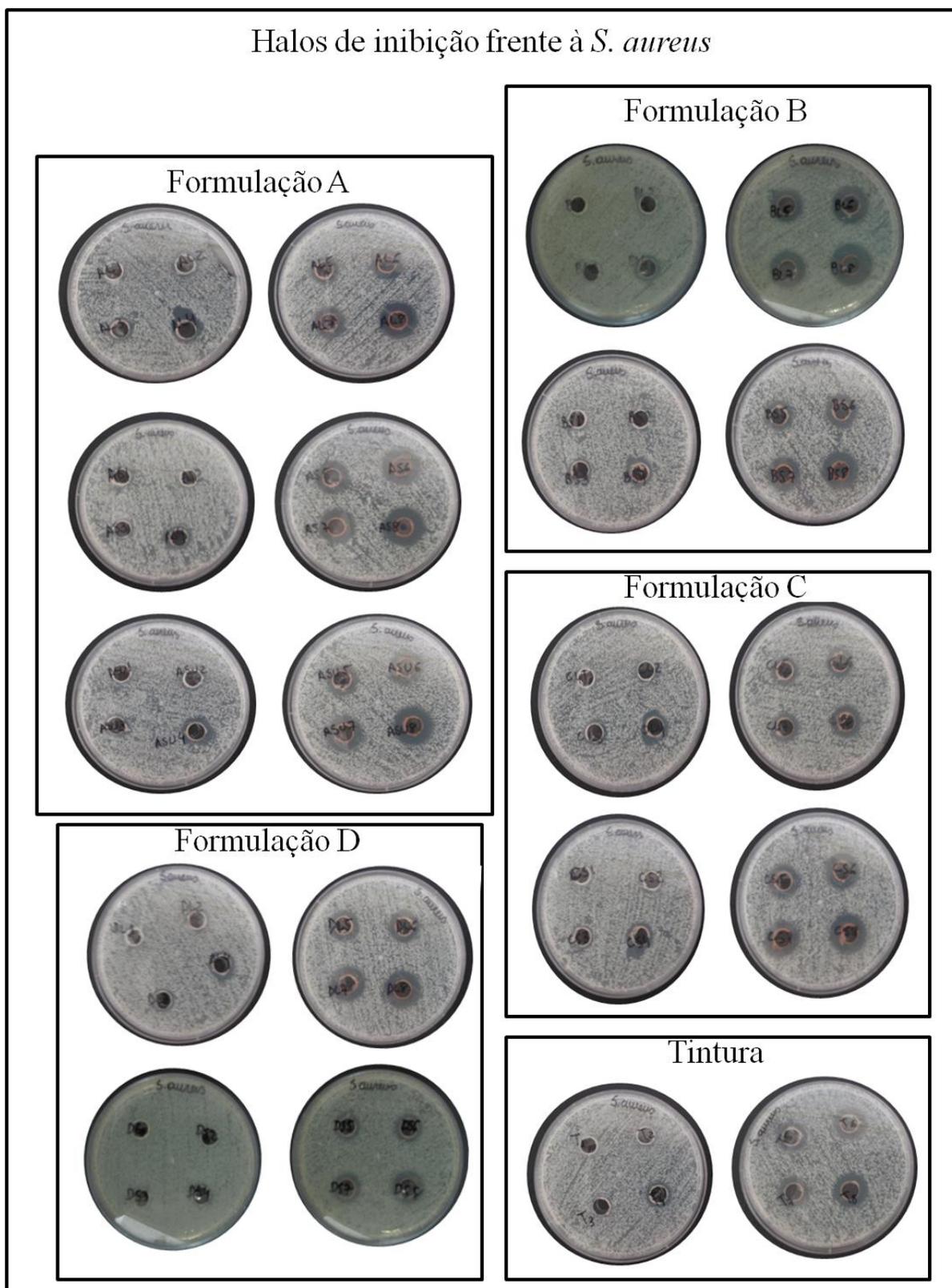
Fonte: Autor, 2012.

Tabela 12 - Determinação da concentração ($\mu\text{g/mL}$) nas cubas de dissolução da composição MPV B-SD.

Tempo (horas)	Cuba 1	Cuba 2	Cuba 3	Média	DP
0,5	3,64	3,81	4,37	3,94	0,38
1	5,96	5,85	6,98	6,26	0,62
2	9,02	9,24	9,98	9,42	0,50
3	11,42	12,54	12,95	12,30	0,79
4,5	16,41	17,48	17,95	17,28	0,79
6	*	*	*	*	*
9	*	*	*	*	*
12	*	*	*	*	*

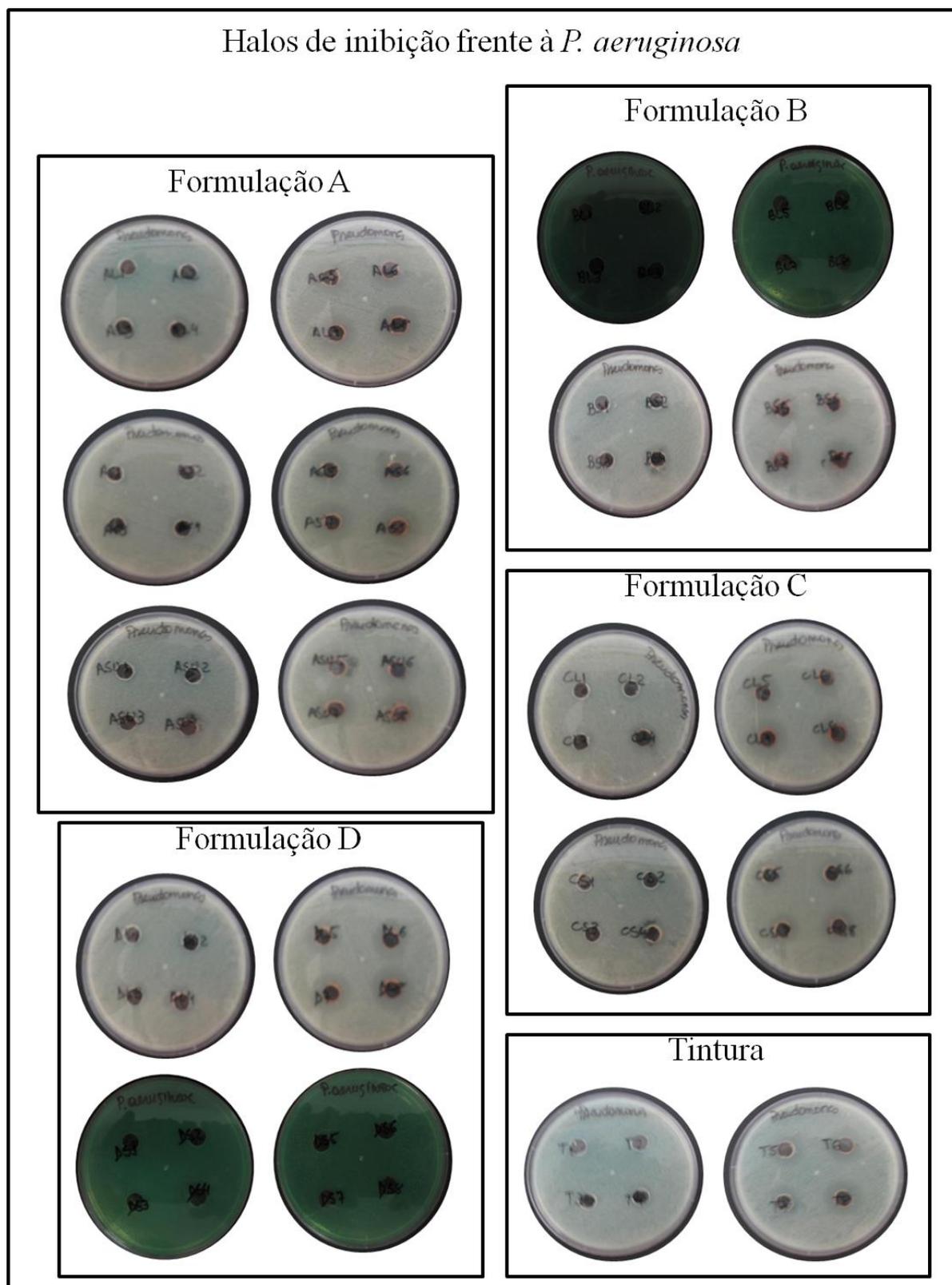
* Dados excluídos do ensaio por conta de falha mecânica do dissolutor

Fonte: Autor, 2012.

Figura 6 – Halos de inibição frente à *S. aureus*

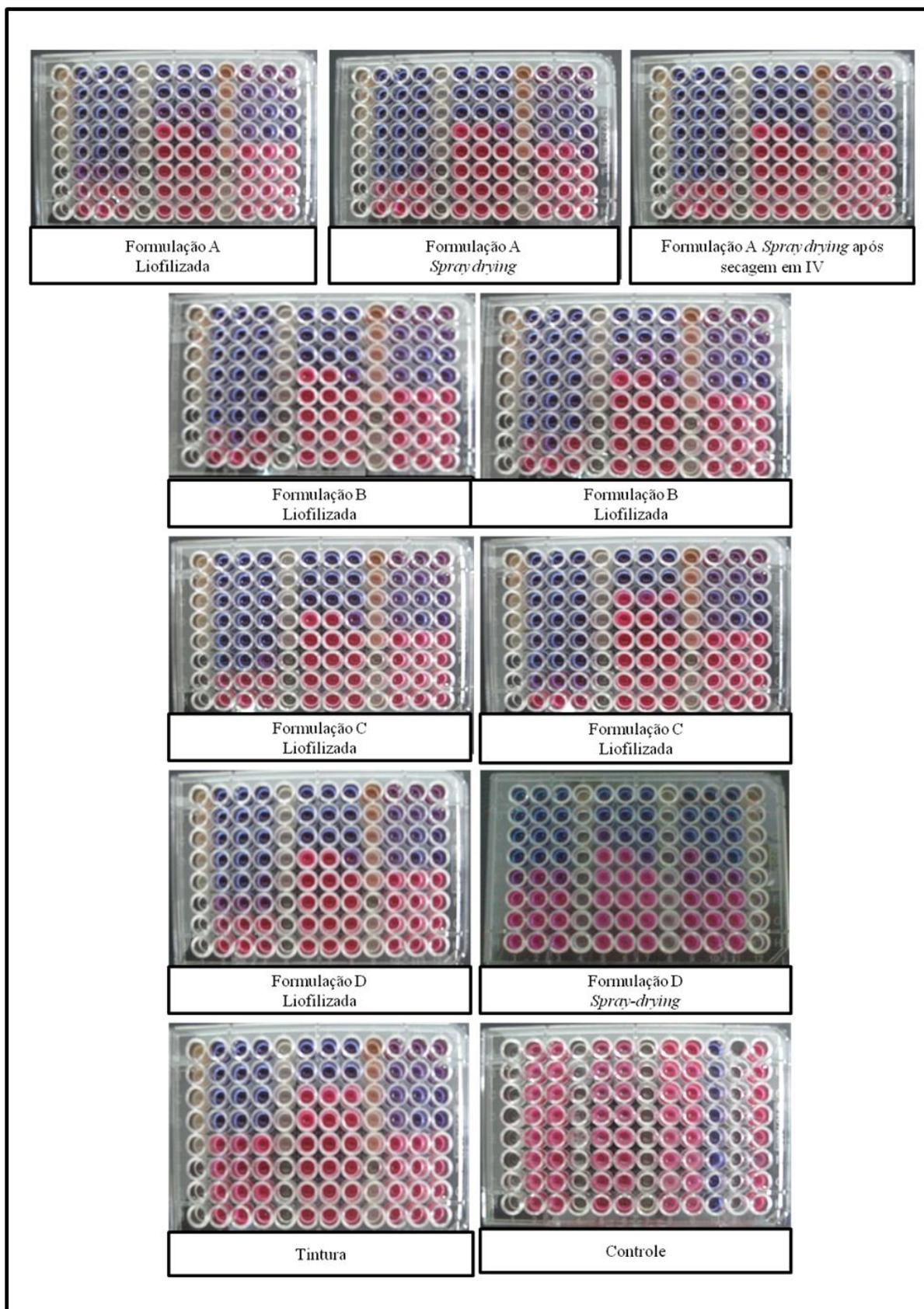
Fonte: Autor, 2012.

Figura 7 – Halos de inibição frente à *P. aeruginosa*



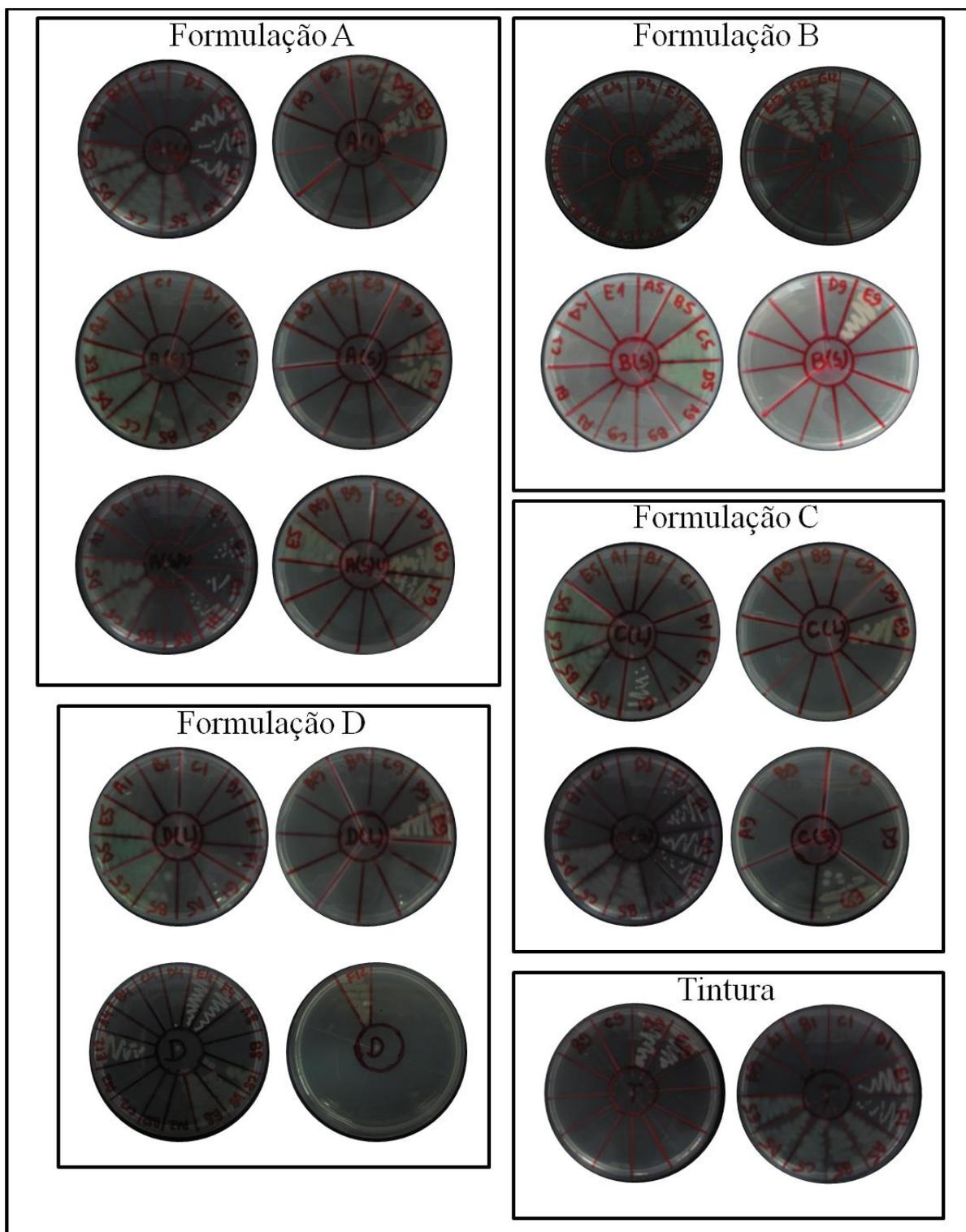
Fonte: Autor, 2012.

Figura 8 – Determinação da CIM



Fonte: Autor, 2012.

Figura 9 – Determinação da CBM



Fonte: Autor, 2012.