

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

VALTER ALVINO DA SILVA

**Micropartículas de própolis-polímero para aplicação como produto
cosmético multifuncional**

Maceió

2015

VALTER ALVINO DA SILVA

**Micropartículas de própolis-polímero para aplicação como produto
cosmético multifuncional**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Química e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Adriana Santos
Ribeiro

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Camila Braga
Dornelas

Maceió

2015

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

S586m Silva, Valter Alvino da.
Micropartículas de própolis-polímero para aplicação como cosmético multifuncional / Valter Alvino da Silva. – 2015.
159 f. : il. tabs., graf.

Orientadora: Adriana Santos Ribeiro.
Coorientadora: Camila Braga Dornelas.
Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação Em química e Biotecnologia. Maceió, 2015.

Bibliografia: f. 137-153.
Apêndices: f. 154-156
Anexos: f. 157-159.

1. Própolis vermelha de Alagoas. 2. Produtos multifuncionais.
3. Micropartículas. 4. Spray dryer. I. Título.

CDU: 547.9:615.2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA

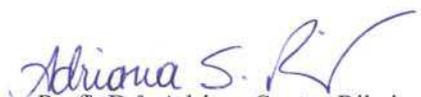


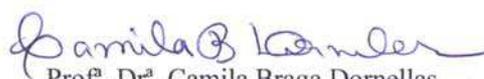
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

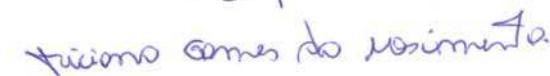
Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando **Valter Alvino da Silva**, intitulada: **“Micropartículas de própolis-polímero para a aplicação em produto multifuncional”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 16 de outubro de 2015, às 09h, na Sala de Reuniões do IQB, na Universidade Federal de Alagoas.

COMISSÃO JULGADORA


Prof.^a. Dr.^a. Adriana Santos Ribeiro
Orientadora (PPGQB/IQB/UFAL)


Prof.^a. Dr.^a. Camila Braga Dornellas
Coorientadora (ESENFAR/UFAL)


Prof.^a. Dr.^a. Rusiene Monteiro de Almeida
PPGQB/IQB/UFAL


Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento
(ESENFAR/UFAL)


Prof. Dr. Iripaldo Diniz Basílio Júnior
(ESENFAR/UFAL)


Prof. Dr. Luciano Meireles Grillo
(ESENFAR/UFAL)

A Deus e a todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha Orientadora e co-orientadora;

Ao Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Feridas, em especial a coordenadora Prof^a. Dr^a. Maria Lysete de Assis Bastos e todos os integrantes;

Ao Centro de Patologia e Medicina Laboratorial da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (CPML/UNCISAL);

Ao Laboratório Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, em especial ao coordenador Prof. Dr. Luciano Meirelles Grillo;

Às minhas queridas companheiras que me auxiliaram Ana Júlia Cavalcante, Anne, Andreza, Jadriane Xavier, Gabriela Corti, Thaís Honório, Regina Célia e tantas outras pessoas que contribuíram para a realização.

Aos órgãos de fomento à pesquisa CNPQ, FAPEAL, CAPES.

A todos os meus amigos pela paciência.

Cada dia que amanhece assemelha-se a uma página em branco, na qual gravamos os nossos pensamentos, ações e atitudes. Na essência, cada dia é a preparação de nosso próprio amanhã.

Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.

Chico Xavier

RESUMO

A própolis vermelha de Alagoas ganhou destaque por possuir uma constituição química diferenciada e superioridade em relação às atividades biológicas quando comparada a outros tipos de própolis, a qual foi conferida selo de indicação geográfica. Ultimamente vem crescendo a busca por produtos que promovam a proteção da pele, associando além do efeito fotoprotetor outros benefícios biológicos, chamados de produtos multifuncionais e dentre as muitas funções biológicas da própolis, destacam-se aquelas que proporcionam a proteção da pele. As micropartículas facilitam a manipulação de certas formulações onde *spray drying* é um dos métodos de obtenção que vem se destacando. O objetivo do trabalho foi desenvolver micropartículas própolis-polímero para avaliação das atividades fotoprotetora, antioxidante, cicatrizante e antimicrobiana em preparações de uso tópico. Foi obtido extrato hidroalcoólico e frações de própolis onde foram determinados os marcadores utilizando cromatografia líquida de alta eficiência. Foi avaliado o fator de proteção solar (FPS) *in vitro*, atividade antioxidante, atividade cicatrizante *in vivo*, atividade antimicrobiana *in vitro* e toxicidade *in vivo*. Utilizando o polímero quitosana pela técnica *spray drying* foram obtidas micropartículas as quais foram avaliadas quanto aos marcadores, teor de umidade, granulometria, FPS *in vitro*, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana *in vitro*. O extrato hidroalcoólico e frações de própolis apresentaram-se como uma mistura complexa de substâncias, das quais foram identificadas: ácido gálico, ácido felúrico, daidizeína, quercetina e formononetina. A fração de média alta polaridade (FMAP) apresentou melhor FPS, 2,32 na concentração de 1% e desempenho superior na atividade cicatrizante quando comparada aos controles. O tratamento tópico não alterou perfil glicêmico, lipídico, renal, concentração de íons, proteínas totais e frações, fosfatase alcalina nem lactato desidrogenase. Também não houve alteração dos hormônios tireoidianos nem hipofisários. Foi evidenciada atividade bacteriostática/bactericida e antioxidante. Foi possível obter micropartículas da FMAP com quitosana com superfície uniforme, lisas, tamanho predominante entre 1 e 3µm e baixo teor de umidade. Não houve perda no teor de formononetina para os microparticulados e as atividades biológicas foram preservadas. Assim, foi possível obter micropartículas da FMAP utilizando o polímero quitosana com ação fotoprotetora, antioxidante, cicatrizante e antimicrobiana que podem ser utilizadas para fins cosméticos na prevenção de injúrias na pele como um produto multifuncional.

Palavras-chave: Própolis vermelha de Alagoas. Produto multifuncional. Micropartículas. *Spray drying*.

ABSTRACT

The red propolis of state of Alagoas was highlighted by having a different chemical constitution and to outperform biological activities compared to other types of propolis, which was given geographical indication seal. Lately has been growing the search for products that promote skin protection, associating beyond the effect sunscreen other biological benefits, called multifunction products and among the many biological functions of propolis, we highlight those that provide skin protection. The microparticles facilitate manipulation of certain formulations where spray drying is one of methods to obtaining it. The objective was to develop microparticles propolis-polymer for evaluation of photoprotective activities, antioxidant, antimicrobial and healing in topical preparations. Was obtained hydroalcoholic extract and propolis fractions were the highlight compounds where identifying using HPLC. Was evaluated the Sun Protection Factor-SPF *in vitro*, antioxidant activity, healing activity *in vivo*, antimicrobial activity *in vitro* and toxicity *in vivo*. Were obtained microparticles by *spray drying* using biocompatible polymers. This microparticles were analyzed for markers, and characterization analyzes evaluating moisture content, particle size and Scanning Electron Microscope-SEM. The biological activities were also analyzed in microparticulate. The hydroalcoholic extract and propolis fractions were presented as a complex mixture of substances, which have been identified: gallic acid, feluric acid, daidizein, quercetin and formononetin. The Medium-High Polarity Fraction (MHFP) showed the best SPF 2,32 in 1% of concentration and it was better than controls in the healing tests. Topical treatment did not alter glycemic, lipid, renal profile, ion concentration, total proteins and fractions, alkaline phosphatase or lactate dehydrogenase. There was also no change of thyroid or pituitary hormones. The samples showed bacteriostatic/bactericidal and antioxidant activity. It was possible to obtain microparticles of MHFP with chitosan with smooth and uniform surface that was 1 e 3 μm with low moisture content. There was no loss in formononetin content for microparticulate and the biological activities have been preserved. Thus, it was possible to obtain microparticles of MHFP using chitosan polymer with photoprotective action, antioxidant, antimicrobial and wound healing which can be used for cosmetic purposes to prevent skin damage as a multifunctional product.

Key words: Red propolis of Alagoas. Multifunctional product. Microparticulates. *Spray drying*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais constituintes encontrados na maioria dos tipos de própolis.	26
Figura 2 – Estrutura básica de um flavonóide.	27
Figura 3 – Fluxograma simplificado do processo.	43
Figura 4 – Reação de desacetilação da quitina formando quitosana.	46
Figura 5 – Estrutura química da carboximetilcelulose.	48
Figura 6 – Estrutura da molécula de alginato.	49
Figura 7 – Fluxograma com as etapas para obtenção das micropartículas de própolis vermelha de Alagoas.....	52
Figura 8 – Fluxograma de obtenção do extrato hidroalcoólico e frações de própolis vermelha.	54
Figura 9 – Estrutura do radical livre DPPH.....	60
Figura 10 – Variação de tonalidades das amostras de própolis vermelha diluídas em etanol P.A. na concentração de 1,0 %.	61
Figura 11 – Amostras de própolis vermelha reagindo com o radical DPPH.	61
Figura 12 – Esquema de ajuste do equipamento para granulometria.	74
Figura 13 – Rendimento do extrato hidroalcoólico e frações de própolis vermelha de Alagoas.....	77
Figura 14 – Cromatogramas do EHA e frações de própolis vermelha de Alagoas na concentração de 10mg/mL (max.281 nm). Compostos identificados e tempo de retenção (1) Ácido Gálico, (2) Ácido Felúrico, (3) Daidizeína, (4) Quercetina e (5) Formononetina.....	79
Figura 15 – Varredura das absorvâncias do extrato hidroalcoólico e frações de própolis vermelha de Alagoas na concentração de 0,1%.	82
Figura 16 – Estrutura química de alguns flavonóides presentes na própolis.....	83
Figura 17 – Curva do padrão ácido gálico.	84
Figura 18 – Teor de fenóis totais em mgEAG/100mg de extrato seco para os grupos experimentais.	85
Figura 19 – Capacidade de captura do radical DPPH para os grupos experimentais.	87
Figura 20 – Cinética da atividade sequestradora do radical livre DPPH (ASR).	88
Figura 21 – Peso médio dos animais utilizados nos experimentos.	90
Figura 22 – Temperatura média dos animais para cada grupo durante o período experimental.	91

Figura 23 – Medida das lesões dos animais experimentais separadas por grupos de tratamento.....	92
Figura 24 – Glicose sérica para os grupos experimentais.....	102
Figura 25 – Concentrações séricas de colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicérides para os grupos experimentais.....	103
Figura 26 – Concentrações séricas de magnésio e fósforo para os grupos experimentais.	104
Figura 27 – Concentrações séricas de ácido úrico, ureia e creatinina para os grupos experimentais.	105
Figura 28 – Concentrações séricas de proteínas totais, albumina e globulina para os grupos experimentais.....	107
Figura 29 – Concentrações séricas de fosfatase alcalina e lactato desidrogenase para os grupos experimentais.....	108
Figura 30 - Concentrações séricas de ALT e AST para os grupos experimentais.	110
Figura 31 – Concentrações séricas de ALT e AST no decorrer do experimento.	111
Figura 32 – Concentrações séricas de TSH, T3 total e T4 total para os grupos experimentais.	111
Figura 33 – Concentrações séricas de FSH, LH e prolactina para os grupos experimentais.	113
Figura 34 – (A) Micropartículas de própolis vermelha + quitosana (10:1p/p); (B) Micropartículas de própolis vermelha + quitosana (10:1p/p) + glutaraldeído; (C) Micropartículas de própolis vermelha + quitosana (10:2p/p); (D) Micropartículas de própolis vermelha + quitosana (10:2p/p) + glutaraldeído.	116
Figura 35 – Gel de alginato com solução etanólica de própolis vermelha.....	117
Figura 36 – (A) EHA de própolis vermelha solubilizado em alginato em meio ácido; (B) EHA de própolis vermelha solubilizado em meio básico.	118
Figura 37 – (A) EHA de própolis vermelha solubilizado em alginato em meio ácido observado em microscópio óptico (aumento 200X); (B) EHA de própolis vermelha solubilizado em meio básico observado em microscópio óptico (aumento 400X).	118
Figura 38 – Incorporação de própolis vermelha em carboximetilcelulose.	119
Figura 39 – Formação de grémulo com as micropartículas de própolis vermelha e carboximetilcelulose.	120

- Figura 40** - Cromatogramas das micropartículas de própolis com quitosana na concentração de 10mg/mL (max.281 nm). (1) Ácido Gálico, (2) Ácido Felúrico, (3) Daidizeína, (4) Quercetina e (5) Formononetina..... 121
- Figura 41** – Curva de distribuição do tamanho das partículas obtidas do EHA com quitosana. 123
- Figura 42** – Imagens das micropartículas de EHA com quitosana capturadas por microscópio óptico aumento 400X..... 123
- Figura 43** – Curva de distribuição do tamanho das partículas obtidas da FMAP com quitosana. 124
- Figura 44** – Imagens das micropartículas de FMAP com quitosana capturadas por microscópio óptico aumento 400X..... 124
- Figura 45** – MEV das micropartículas de EHA com quitosana. (A) Aumento de 200x; (B) Aumento de 500x; (C) Aumento de 1000x; (D) Aumento de 1500x; (E) Aumento de 2000x; (F) Aumento de 2500x. 125
- Figura 46** – MEV das micropartículas da FMAP com quitosana. (A) Aumento de 200x; (B) Aumento de 500x; (C) Aumento de 1000x; (D) Aumento de 1500x; (E) Aumento de 2000x; (E) Aumento de 2500x. 126
- Figura 47** – Difrátograma de raios X para amostras de quitosana, EHA e FMAP microparticulados..... 127
- Figura 48** – Espectros FTIR –ATR de quitosana, EHA e EHA Microparticulado. 129
- Figura 49** – Espectros FTIR –ATR de quitosana, FMAP e FMAP Microparticulado. 130
- Figura 50** – Teor de fenóis totais em mg EAG/ 100 mg de extrato seco para o EHA e FMAP microparticulados comparados às amostras fluidas. 132
- Figura 51** – Atividade sequestradora do radical DPPH para o EHA e FMAP microparticulados comparados às amostras fluidas. Os valores obtidos estão expressos em média \pm desvio padrão, aceitando um nível de significância com $p < 0,05$ 133
- Figura 52** – Cinética da atividade sequestradora do radical DPPH (ASR) para o EHA e FMAP microparticulados comparados às amostras fluidas. 134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estrutura química das classes de flavonoides presentes na própolis.	28
Tabela 2 – Classificação das própolis brasileiras.	31
Tabela 3 – Características de alguns sistemas microparticulados da indústria farmacêutica.	42
Tabela 4 – Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação.	58
Tabela 5 – Determinação do FPS <i>in vitro</i> das amostras de própolis vermelha e metoxicinamato de octila.	83
Tabela 6 – Determinação da CE ₅₀ para amostras de própolis vermelha.	89
Tabela 7 – Avaliação macroscópica das lesões. Intensidade dos achados em porcentagem.	95
Tabela 8 – Avaliação microscópica das lesões. Intensidade dos achados em porcentagem.	99
Tabela 9 – Concentração Inibitória Mínima do EHA e fração de própolis vermelha de Alagoas.	114
Tabela 10 – Concentração Bactericida Mínima do EHA e fração de própolis vermelha de Alagoas.	115
Tabela 11 – Teor dos marcadores da própolis nas micropartículas. Os valores obtidos estão expressos em média ± desvio padrão.	121
Tabela 12 – Teor de umidade das micropartículas de própolis vermelha.	122
Tabela 13 – Determinação do FPS <i>in vitro</i> das micropartículas de própolis vermelha e metoxicinamato de octila comparados ao FPS das amostras fluidas.	131
Tabela 14 – Determinação da CE ₅₀ para os microparticulados de própolis vermelha comparados às amostras fluidas.	134
Tabela 15 – CIM e CBM para os microparticulados de própolis vermelha comparados às amostras fluidas.	135

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A – Gráficos utilizados para a determinação do EC50 das amostras fluidas de própolis vermelha e dos padrões.....	154
Apêndice B – Gráficos utilizados para a determinação do EC50 das amostras microparticuladas de própolis vermelha.....	156

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Formulário utilizado para análise macroscópica das feridas tratadas com própolis vermelha.....	157
Anexo B – Formulário utilizado para análise microscópica das feridas tratadas com própolis vermelha.....	158
Anexo C – Parecer de aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da UFAL na experimentação com Animais e Humanos.	159

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ABS** – Absorvância
- ALG** – Alginato
- ALT** – Alanina Aminotransferase
- ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AST** – Aspartato Aminotransferase
- C.N.** – Controle Negativo
- C.P.** – Controle Positivo
- Catec** – Câmera Técnica de Cosméticos
- CBM** – Concentração Bactericida Mínima
- CIM** – Concentração Inibitória Mínima
- CMC** – Carboximetilcelulose
- DPPH** – 2-difenil-1-picrilidrazil
- EAG** – Equivalente de Ácido Gálico
- EEP** – Extrato Etanólico de Própolis
- EHA** – Extrato Hidroalcoólico
- ERO** – Espécie Reativa de Oxigênio
- FA** – Fosfatase Alcalina
- FAP** – Fração de Alta Polaridade
- FBP** – Fração de Baixa Polaridade
- FMAP** – Fração de Média Alta polaridade
- FMP** – Fração de Média Polaridade
- FPS** – Fator de Proteção Solar
- FSH** – Hormônio Folículoestimulante
- IG** – Indicação Geográfica
- LDH** – Lactato Desidrogenase
- Metox** – Metoxicinamato de Octila
- MEV** – Microscopia Eletrônica de Varredura
- PVA** – Própolis vermelha de Alagoas
- PVDF** – fluoreto de polivinilideno
- QUI** – Quitosana
- TSH** – Hormônio Tireoideestimulante
- TTC** – cloreto de 2, 3, 5-trifeniltetrazólio

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Cálculo do fator de proteção solar (FPS) <i>in vitro</i>	58
Equação 2 – Percentual de redução do DPPH.....	62
Equação 3 – Cálculo do tamanho de partícula.....	74

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	Produtos Naturais	22
2.2	Própolis	23
2.2.1	Histórico	23
2.2.2	Composição Química	25
2.2.3	Tipos de Própolis	29
2.2.4	Atividade Biológica da Própolis	31
2.2.4.1	Atividade Antibacteriana	31
2.2.4.2	Atividade Antifúngica	32
2.2.4.3	Atividade Antiinflamatória	33
2.2.4.4	Atividade Anticancerígena	33
2.2.4.5	Atividade Antiprotozoário	34
2.2.4.6	Atividade Imunomodulatória	35
2.2.4.7	Atividade Antioxidante	36
2.2.4.8	Atividade Cicatrizante	37
2.2.4.9	Outras Atividades Biológicas	38
2.3	Produtos Multifuncionais	39
2.3.1	Origem dos Cosméticos	39
2.3.2	Definição de Cosméticos	39
2.3.3	Definição de Produtos Multifuncionais	40
2.3.4	Cosméticos à Base de Produtos Naturais	41
2.4	Sistema Microparticulado	42
2.4.1	Microencapsulação	42
2.4.2	<i>Spray Drying</i>	43
2.4.3	Biopolímeros	46
2.4.3.1	Quitosana	46
2.4.3.2	Aplicações da Quitosana	47
2.4.3.3	Carboximetilcelulose	48
2.4.3.4	Alginato de Sódio	49
3.	OBJETIVOS	51

3.1	Objetivo Geral	51
3.2	Objetivos Específicos	51
4.	METODOLOGIA	52
4.1	Obtenção do Extrato Hidroalcoólico e Frações de Própolis Vermelha	53
4.2	Marcadores da Própolis Vermelha	54
4.3	Seleção das Frações de Própolis Vermelha	55
4.3.1	Formulação de Própolis Vermelha	55
4.3.2	Determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) <i>in vitro</i>	56
4.3.3	Atividade Antioxidante	58
4.3.4	Atividade Cicatrizante <i>in vivo</i>	63
4.3.4.1	Animais Utilizados no Experimento	63
4.3.4.2	Procedimento Cirúrgico	64
4.3.4.3	Análise Macroscópica	65
4.3.4.4	Análise Microscópica.....	66
4.3.5	Perfil Bioquímico e Hormonal	67
4.3.6	Atividade Antimicrobiana	67
4.3.7	Análise Estatística dos Resultados	69
4.4	Obtenção das Micropartículas de Própolis Vermelha.....	69
4.4.1	Própolis com Quitosana	69
4.4.2	Própolis com Alginato.....	70
4.4.3	Própolis com Carboximetilcelulose.....	71
4.4.4	Spray drying	72
4.5	Marcadores nas Micropartículas de Própolis Vermelha	72
4.6	Caracterização das Micropartículas de Própolis Vermelha	73
4.6.1	Teor de Umidade.....	73
4.6.2	Granulometria.....	73
4.6.3	Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV.....	74
4.6.4	Difração de Raios X – DRX.....	75
4.6.5	Espectroscopia de Infravermelho - FTIR.....	75
4.7	Atividades Biológicas das Micropartículas	76
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
5.1	Obtenção do EHA e Frações de Própolis Vermelha	77
5.2	Marcadores da Própolis Vermelha	78
5.3	Seleção das Frações de Própolis Vermelha	81

5.3.1	Determinação do FPS	81
5.3.2	Atividade Antioxidante	84
5.3.3	Atividade Cicatrizante	89
5.3.3.1	Análise Macroscópica	91
5.3.3.2	Análise Microscópica	96
5.3.4	Perfil Bioquímico e Hormonal	102
5.3.5	Atividade Antimicrobiana	113
5.4	Obtenção das Micropartículas	116
5.5	Marcadores nas Micropartículas	120
5.6	Caracterização da Micropartículas	122
5.7	Atividade Biológica das Micropartículas	131
5.7.1	Determinação do FPS	131
5.7.2	Atividade Antioxidante	132
5.7.3	Atividade Antimicrobiana	135
6.	CONCLUSÃO	136
7.	REFERÊNCIAS	137
8.	APÊNDICES	154
9.	ANEXOS	157

1. Introdução

A própolis é uma resina natural produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera* de algumas partes das plantas, como brotos, botões florais e exsudatos resinosos. Possui coloração e consistência variada e é utilizada pelas abelhas para fechar pequenas lacunas, proteger a colmeia da invasão de insetos e embalsar como material antisséptico (GHISALBERTI, 2008).

O Brasil é o terceiro maior produtor de própolis e, no que concerne à qualidade, a própolis aqui produzida é considerada como uma das melhores do mundo, despertando interesse internacional (CUETO et al. 2011). A constituição química é diferenciada em função da diversidade de plantas existentes no país, sendo classificados 13 tipos. O 13º tipo é a própolis vermelha, que é encontrada principalmente no nordeste brasileiro e vem se destacando por suas atividades biológicas (ALENCAR et al. 2008).

Nesse interim, a própolis vermelha de Alagoas ganhou destaque por possuir constituintes químicos encontrados exclusivamente na própolis alagoana que valorizam e agregam valor ao produto. Com isso, o Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) reconheceu a Própolis Vermelha de Alagoas como um produto brasileiro sem similar no mundo, concedendo-lhe selo de indicação geográfica (IG201101) em 17/07/2012 (RITA et al. 2015).

Produtos Multifuncionais são definidos como qualquer preparação cosmética, constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, destinada a entrar em contato com a pele e lábios, cujo benefício de proteção contra a radiação UV não é a finalidade principal, mas um benefício adicional do produto (ANVISA, 2012; ANVISA, 2005). A pele ou cútis é um sistema orgânico que funciona como barreira natural para agentes patogênicos e também funciona como um escudo protetor dos efeitos nocivos do sol e por isso a incidência de câncer de pele e fotoenvelhecimento induzido pela radiação solar crescem em todo mundo, em especial no Brasil que possui a maior área intertropical e ensolarada do planeta (RAMOS et al. 2010).

Dentre as muitas funções biológicas da própolis, destacam-se aquelas que proporcionam a proteção da pele, tais como: ação antioxidante e antimicrobiana. Contudo, sua característica resinosa dificulta a veiculação em formas farmacêuticas, onde comercialmente a forma hidroalcoólica tem predominância (LUSTOSA, et al. 2008).

As micropartículas facilitam a manipulação de certas formulações através da otimização de escoamento de pós coesivos, controle de tamanho de partículas, proteção ambiental da umidade, luz, calor e oxidação, modificação da liberação de fármacos em geral e especialmente em dispersão de substâncias insolúveis em água em meio aquoso, como por exemplo, a própolis (SILVA et al., 2003). *Spray drying* é um dos métodos de obtenção de micropartículas que vem se destacando por oferecer ao agente ativo proteção físico-química. A seleção adequada do adjuvante no processo de secagem é uma fase de fundamental importância visto que a qualidade das micropartículas formadas está diretamente correlacionada a ele (OLIVEIRA et al. 2010).

Os polímeros são os adjuvantes mais comuns na obtenção de micropartículas. Eles podem ser naturais, sintéticos e semissintéticos, destacando-se os chamados polímeros biodegradáveis que visam reduzir o impacto ambiental causado pelos polímeros orgânicos (DRAGET & TAYLOR, 2011). Quitosana e alginato, polímeros naturais, e carboximetilcelulose, polímero semissintético, destacam-se na área farmacêutica por possuir biocompatibilidade e biodegradabilidade, sendo associados ao processo de encapsulação e liberação de princípios ativos. (AMARANTE & BANKS, 2001; FAN et al. 2006).

Por conseguinte, o desenvolvimento da química de produtos naturais aliada à química medicinal no século XX fez com que o uso de produtos naturais fosse fonte inspiradora dos arcabouços moleculares na identificação de novos compostos na indústria farmacêutica, tornando-se uma estratégia bastante útil na prospecção de novas moléculas bioativas. Nesse nexos, a própolis vermelha de Alagoas por possuir singularidade na constituição química que potencializa as atividades biológicas torna-se vultosa para desenvolvimento de novos dermocosméticos (COSTA, 2009).

2. Revisão bibliográfica

2.1 Produtos Naturais

Desde os primórdios da existência do homem que ele vem buscando na natureza as soluções para os variados males que o acometia. Aqueles chamados de feiticeiros, considerados intermediários entre deuses e homens, ficavam a missão de curar os doentes, unindo magia e religião ao conhecimento empírico das práticas de saúde, a exemplo eles utilizavam produtos naturais nesse tipo de ritual (ALVIM et al. 2006).

A busca pelo alívio, prevenção e cura de doenças através da utilização de ervas e folhas provavelmente tenha sido uma das primeiras formas de aproveitamento dos produtos naturais. Esses produtos foram os principais componentes das farmacopeias por milhares de anos, sendo utilizados até fins do século XIX na forma de chás, infusões, e outras formulações farmacêuticas. O isolamento de produtos naturais em forma pura, no final do século XIX, foi um passo decisivo para a criação da indústria farmacêutica, pois esses produtos naturais se constituíram na principal fonte de insumos para a preparação de medicamentos, sendo o arcabouço inspirador de novas moléculas (COSTA, 2009).

Os produtos naturais, apesar dos inúmeros avanços alcançados na medicina no século XX, ainda apresentam uma importância significativa para manutenção da saúde e amenização das doenças em países que ainda não alcançaram o desenvolvimento. As precárias condições de vida da população e a falta de acesso a medicamentos nesses países, associadas a uma tradição de uso desses recursos terapêuticos e sua fácil obtenção faz com que eles sejam a única escolha terapêutica (PIRIZ et al. 2013). Entretanto, a utilização desses produtos é baseada somente no conhecimento popular que repassam informações através das gerações de forma empírica, necessitando de embasamento científico quanto às propriedades farmacológicas e tóxicas para garantir o uso seguro desses recursos naturais (TUROLLA; NASCIMENTO, 2011).

Ademais, os produtos naturais contribuem enormemente para o desenvolvimento de novos fármacos que são lançados constantemente no mercado. Nos últimos 50 anos entre todos os fármacos aprovadas para tratamento do câncer pelo *Food and Drug Administration* (FDA) ou outras entidades similares de outros países, 28% deles foram totalmente de origem direta de produtos naturais e 39% foram derivados desses, num total de 67% de todos os novos fármacos (NEWMAN et al. 2008).

2.2 Própolis

2.2.1 Histórico

A palavra própolis é derivada do grego pro-, em defesa, e polis-, cidade ou comunidade, isto é, em defesa da comunidade. A própolis é uma mistura complexa, constituída de matérias com resina e bálsamo que a abelha *Apis mellifera* coleta de flores, ramos, broto, pólen e exsudatos de árvores. Além desta coleta, as abelhas adicionam secreções salivares na colmeia. As abelhas se utilizam da própolis na proteção contra insetos (onde elas os mumificam) e microrganismos, na preparação de lugar asséptico para pôr os ovos e na reparação de danos à colmeia (LUSTOSA et al. 2008).

O uso de própolis pelo homem remota à antiguidade cerca de 300 anos a.C (DA SILVA et al., 2008). Os egípcios sabiam que a própolis possuía atividade anti-putrefativa e a utilizavam como um dos constituintes do preparado para embalsar cadáveres. A própolis era nomeadamente reconhecida por suas propriedades medicinais por antigos médicos gregos e romanos, como Aristóteles, Dioscórides, Plínio e Galeno. Era utilizada como antisséptico e cicatrizante no tratamento de feridas e como desinfetante bucal (RIGHI, 2008).

O conhecimento do homem em relação às propriedades dos produtos produzidos pelas abelhas é considerado interessante, onde praticamente todas as civilizações antigas conheceram e/ou utilizaram esses produtos. Nas civilizações chinesa, tibetana e egípcia, em seus manuscritos constam histórias sobre a medicina dessas civilizações, todas contendo em suas escrituras antigas

diversas receitas onde foram utilizado mel, própolis, larvas de abelhas e, até mesmo, eram utilizadas as próprias abelhas para curar e prevenir doenças. Os egípcios conheciam muito bem a propriedade conservante da própolis, pois a usavam em seus rituais para embalsamar cadáveres. Na América do Sul os incas utilizavam a própolis como um antipirético e os ingleses em sua farmacopeia do século XVII registravam a própolis como um fármaco oficial. Esse produto ganhou popularidade na Europa durante os séculos XVII e XX, devido a sua propriedade antibacteriana (CASTALDO; CAPASSO, 2002).

Os gregos, entre eles Hipócrates, pai da medicina, adotaram a própolis como um agente cicatrizante de feridas internas e externas (CAPASSO; CASTALDO, 2002). Aristóteles (384-332 a.C) chamou a própolis de “lágrimas de árvores”, ao estudar o comportamento das abelhas, atribui a essas lágrimas a capacidade de combater chagas, feridas e dermatoses, onde em seu livro “Catálogo Animal” registrou a própolis como um medicamento eficaz para o tratamento de abscessos e feridas. A Bíblia cita o uso de própolis, sob a denominação de bálsamo, assim chamada pelo patriarca Jacob. Mostra-se também que nos mosteiros eram utilizados os vapores balsâmicos da própolis em incensos de purificação (PAULINO, 2005).

Na história recente, também há destaque para a própolis. Na guerra do neo-imperialismo, ao fim do século XIX, foi amplamente utilizada na África do Sul, devido às propriedades cicatrizantes. Entre os anos de 1950 e 1960 a própolis foi utilizada para tratamentos de saúde humana e veterinária na antiga União das Repúblicas Socialistas Soviéticas e em países do leste europeu, já nos países do oeste europeu, América do Sul e do Norte e no Japão, a própolis não era tão popular até 1980, só na metade dessa década ela começou a ser utilizada na medicina alternativa e complementar (PEREIRA et al. 2002; SALATINO, et. al. 2005).

O primeiro trabalho científico publicado sobre as propriedades químicas e “composição” da própolis, data de 1908, indexado no *Chemical Abstracts* (Referência nº 192), em 1968 surge também no *Chemical Abstracts* o resumo da primeira patente utilizando a própolis romena (Patente No. RO 48101), utilizada

na fabricação de loções para banho (HELFENBERG, 1908; PEREIRA et al. 2002).

Na década de 80, após a publicação do trabalho de Ernesto Ulrich Breyer (1981), que demonstrava em seu livro “Abelhas e Saúde”, as propriedades terapêuticas da própolis e sua utilização como um antibiótico natural, o Brasil passou a se interessar por esse produto (SALATINO, 2005).

2.2.2 Composição Química

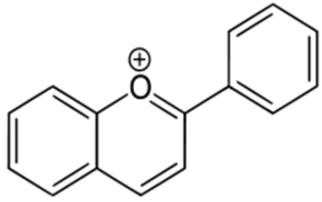
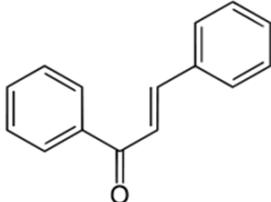
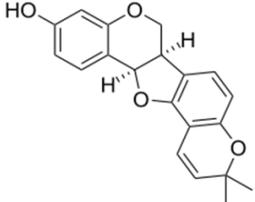
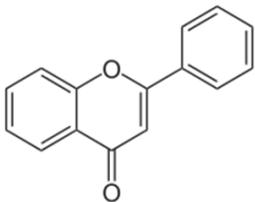
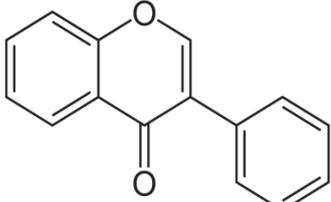
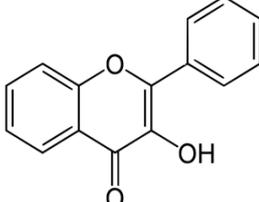
A própolis é caracterizada como uma mistura complexa de material resinoso, gomoso e balsâmico, de textura e coloração variada. É coletada por abelhas da espécie *Apis mellifera*, onde essas abelhas coletam esse material de varias partes da árvore como os ramos, flores, casca, pólen, exsudatos e outras. Após a coleta as abelhas transportam essas substâncias até a colmeia, lá modificam este material, aonde vão adicionando secreções salivares, que possuem a enzima beta-glicosidase, responsável pela hidrólise dos flavonoides glicosilados e das agliconas, depois de uma digestão parcial acrescentam cera que essas abelhas produzem, para tornar o produto moldável (ALENCAR et al. 2007).

A composição química da própolis é determinada principalmente através das características fitogeográficas existentes ao redor da colmeia. Além disso, a composição da própolis varia sazonalmente na mesma localidade, da época da colheita, com o tipo de técnica empregada para coleta e também entre diferentes raças de *Apis mellifera* devido às características genéticas (KUMAZAWA, HAMASAKA, NAKAYAMA, 2005; SILICI KUTLUCA, 2005).

Na composição da própolis pode conter de 50 a 60% de resina, 30 a 40% de cera, 5 a 10% de pólen, bem como oligoelementos como ferro, cobre e alumínio e vitaminas como B1, B2, B6, C e E. Hoje mais de 300 compostos já foram identificados, onde o maior grupo foram os flavonoides, que junto com ácido carboxílico são responsáveis pela atividade contra vários microrganismos patogênicos. Incluem nessa composição ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos e

cetonas, terpenóides e fenilpropanóides como os ácidos caféico e clorogênico; esteróides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos e vários outros compostos em pequenas quantidades (CABRAL, et al. 2009; LUSTOSA et al., 2008). No trabalho de Paulino (2005), podemos observar alguns dos principais constituintes encontrados na maioria dos tipos de própolis.

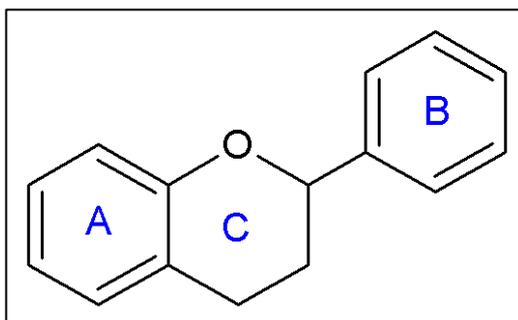
Figura 1 – Principais constituintes encontrados na maioria dos tipos de própolis.

		
Antocianidina	Chalcona	Pterocarpano
		
Flavona	Isoflavona	Flavonol

Fonte: Paulino, 2005.

Entre todos os constituintes químicos da própolis o que vem despertando um interesse maior dos pesquisadores são os flavonoides, que são compostos fenólicos que compreendem um amplo grupo de substâncias naturais e que são sintetizadas pelos animais. São formados estruturalmente por um esqueleto de difenil propano ($C_6C_3C_6$) com dois anéis benzênicos (A e B) ligados a um anel pirano (C) (Figura 2). Os flavonoides são considerados um dos principais componentes ativos da própolis, mais não são os únicos responsáveis pela atividade farmacológica, outros componentes estão relacionados a sua atividade biológica/medicinal, como os ácidos fenólicos que junto com os derivados do ácido cinâmico e dos diterpenos são atribuídos como responsáveis pela ação antibacteriana, antiviral e antioxidante (ALENCAR et al. 2007).

Figura 2 – Estrutura básica de um flavonóide.

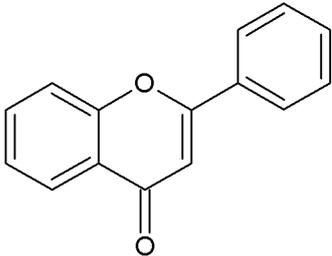
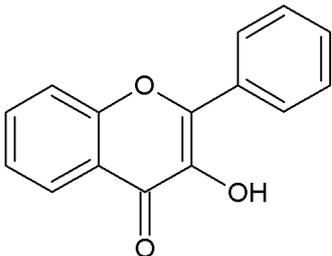
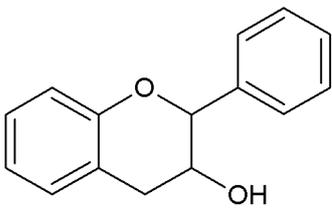
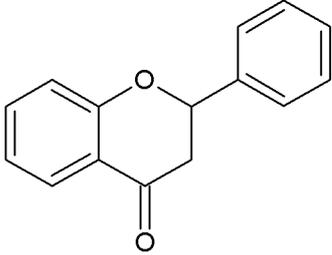
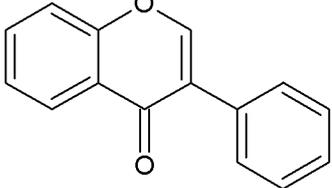
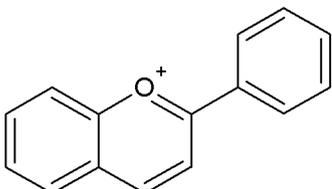


Fonte: SCHERER, GODOY, 2009.

São encontrados pelo menos 38 tipos de flavonoides como a galangina, quercetina, pinocembrina, artepillina-C, apigenina, acacetina, luteolina, crisina, kaempferol e muitos outros, onde maioria deles apresenta atividade antimicrobiana. Os flavonoides ainda auxiliam na absorção e na manutenção da vitamina C no organismo, protegendo-a da destruição e potencializando seu efeito no mesmo. (PARK et al., 2002).

Como os flavonoides são muito importantes na composição da própolis, eles são considerados uma espécie de marcador, onde ensaios de quantificação desses flavonoides são usados para comprovação da qualidade dessa própolis. A atividade farmacológica está ligada às características estruturais desses compostos (BATISTA et al. 2012). Esses flavonoides são separados em várias classes a depender de suas características químicas e biossintéticas como: flavonas, flavonol, flavanona, isoflavona, antocianidinas (MENDONÇA, 2011). Na tabela 1 podemos observar a estrutura química das diferentes classes de flavonoides, assim como os principais representantes.

Tabela 1 – Estrutura química das classes de flavonoides presentes na própolis.

Classe	Estrutura	Exemplos
Flavona		Crisina, rutina
Flavonol		Canferol, quercetina
Flavanol		Catequina, epicatequina
Flavanona		Naringina, naringenina
Isoflavona		Daidzeína, biochanina A, formononetina
Antocianidina		Apigenidina, cianidina

Fonte: MENDONÇA, 2011.

2.2.3 Tipos de Própolis

A diferença nos tipos de própolis está correlacionada principalmente com a diferença de constituintes químicos. Estudos demonstram que o broto do álamo (*Populus* sp.) é a principal origem da própolis europeia e chinesa tendo, portanto, uma menor variedade de constituintes químicos em relação a própolis brasileira devido a grande diversidade da flora brasileira (KUMAZAWA et al. 2005).

Na própolis europeia os principais compostos bioativos são os flavonoides (flavonas, flavonóis e flavononas), sendo a crisina (5,7-diidroxiflavona) o primeiro flavonóide isolado em 1927 da própolis cuja fonte vegetal é *Populus nigra* var. *pyramidalis* (PEREIRA et al. 2002).

Em nosso país, diversas plantas servem como fonte de matéria-prima para fabricação da própolis. A própolis verde do sudoeste é proveniente das resinas de *B. dracunculifolia*, conhecida popularmente como alecrim-do-campo ou vassourinha, coletadas em áreas de Cerrado e Mata Atlântica, possuindo em sua composição fenilpropanóides prenilados e ácidos cafeoilquínico. A variedade obtida na região sul, tem características semelhantes à própolis europeia, possuindo em sua composição principalmente flavonoides, sendo extraída das resinas de *P. alba* e *P. deltoide*. As amostras de própolis provenientes da região Amazônica possui uma composição parecida com as própolis vindas de Cuba e da Venezuela, onde as fontes botânicas são espécies de *Clusia*. A própolis vermelha do nordeste é derivada da resina de *Dalbergia ecastophyllum* (FERNANDES-SILVA, 2013).

A coloração pode variar de tons de marrom escuro passando por uma cor mais esverdeada até o marrom avermelhado, possuindo até um odor característico, o que pode ser diferente de uma amostra para outra. Park et al. (2002) classificaram a própolis brasileira em doze tipos de acordo com a região geográfica de origem, composição química e da origem botânica onde foi extraída. Entretanto um novo tipo de própolis foi identificado e classificada como o 13º tipo, a própolis vermelha, pois possuía características físico-químicas e biológicas diferentes das demais.

A própolis vermelha é típica de Cuba e da Venezuela, em nosso país ela é originariamente do norte e nordeste, podendo ser encontrada em vegetação típica da região de manguezal e possui alguns compostos diferentes das demais própolis. Tais compostos pertencem a diferentes classes, como: fenólicos, triterpenóides, isoflavonoides, pinocebrina, dalbergina, benzofenonas preniladas e um epóxido da naftoquinona, composto isolado pela primeira vez em um produto natural (TRUSHEVA et al. 2006).

Evidências fitoquímicas demonstraram ser a *Dalbergia ecastophyllum* (uma espécie de leguminosa) a principal fonte da própolis vermelha. Isto foi comprovado em um estudo, no qual foi feita a coleta da própolis vermelha de caules de arbustos ao longo da praia e dos rios da região nordeste, nesse foi observado que as abelhas visitavam a *D. ecastophyllum* para fazer a coleta das resinas para produção da própolis vermelha, ao final desse estudo foi concluído que a principal origem botânica da própolis vermelha é *D. ecastophyllum*. (Disponível em: <www.apacame.org.br/mensagemdoce/89/artigo.htm>. Acesso em: 20 de janeiro de 2015).

Alencar et al. (2008), identificaram 4 isoflavonas presentes na própolis vermelha, as quais nunca foram encontradas nas demais própolis brasileiras, são elas: dihidroxiisoflavona, homopterocarpina, medicarpina e 4',7-dimethoxi-2'-isoflavona. Essas isoflavonas são dotadas de propriedades antibacteriana, antifúngica, anticâncer e antioxidante (WANG et al. 2000; RUFER, KULLING 2006)

Os manguezais de Alagoas são conhecidos pela produção de própolis vermelha e teve sua Identificação Geográfica (IG) deferida no dia 29 de maio de 2012 pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI). Por ser a própolis de Alagoas um produto único no mundo, em razão das características químicas e biológicas, foi concebido o indicador geográfico conferindo-lhe o diferencial para maior competitividade. O reconhecimento de Indicações Geográficas (IGs) para produtos relacionados à biodiversidade pode ser um diferencial competitivo nas áreas farmacêutica, cosmética e alimentar (RITA et al. 2015).

Tabela 2 – Classificação das própolis brasileiras.

Grupos	Cor	Substâncias Solúveis (%)	Origem da própolis
Grupo 1 (RS5)	Amarelo	63,0	Região Sul
Grupo 2 (RS1)	Castanho claro	57,5	Região Sul
Grupo 3 (PR7)	Castanho escuro	65,0	Região Sul
Grupo 4 (PR8)	Castanho claro	54,5	Região Sul
Grupo 5 (PR9)	Marrom esverdeado	58,7	Região Sul
Grupo 6 (BA11)	Marrom avermelhado	45,9	Região Nordeste
Grupo 7 (BA51)	Marrom esverdeado	43,8	Região Nordeste
Grupo 8 (PE5)	Castanho escuro	41,3	Região Nordeste
Grupo 9 (PE3)	Amarelo	46,7	Região Nordeste
Grupo 10 (CE3)	Amarelo escuro	24,1	Região Nordeste
Grupo 11 (PI1)	Amarelo	23,1	Região Nordeste
Grupo 12 (SP12)	Verde ou Marrom esverdeado	61,0	Região Sudeste

Fonte: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/58/artigo.htm>

2.2.4 Atividade Biológica da Própolis

Na colmeia a própolis é usada para diversas finalidades como: vedar aberturas, reparar células, forrar a entrada, usada para envolver invasores que foram mortos na colmeia e são grandes demais para serem transportados. O ato de embalsamar os intrusos com a própolis impede que eles apodreçam. Contribui também para que dentro da colmeia se estabeleça uma temperatura quase constante e um ambiente estéril. Sua presença explica a baixa contaminação por fungos e bactérias. Em sua função primária ela age como um biocida. Observando isso, podemos notar que as abelhas são beneficiadas pelo amplo espectro de atividade biológica da própolis como suas ações: bactericida, fungicida, antiviral, dentre outras (RIGHI, 2008).

2.2.4.1 Atividade Antibacteriana

Segundo Buriol et al. (2008), a própolis apresenta atividade antimicrobiana independente de sua origem, devido ao efeito bactericida e

fungicida imprescindível para preservar a vida na colmeia. O provável mecanismo de ação que confere essa atividade a própolis está baseado na inibição da RNA-polimerase bacteriana, atividade atribuída à presença de flavona pinocembrina, ao flavonol galangina e ao éster feniletil do ácido caféico. Outros componentes, como ácido caféico, flavonoides, ácido benzoico, ácido cinâmico, agem provavelmente na membrana ou parede celular microbiana, o que leva a danos funcionais e estruturais (LUSTOSA et al. 2008).

Evidências mostram que a própolis apresenta uma maior atividade para bactérias Gram-positivas quando se compara a Gram-negativas, provavelmente devido à presença de parede celular mais complexa e possuir maior quantidade de lipídeos das últimas, o que dificultaria a ação dos princípios ativos presentes na própolis. Própolis obtida da região do Rio Grande do Sul foi testada frente a 161 isolados bacterianos mostrando-se ativa em 92,60% dos 81 Gram-positivos e 42,50% dos 80 Gram-negativos (VARGAS et al. 2004).

2.2.4.2 Atividade Antifúngica

As infecções causadas por fungos tomaram grande importância na saúde pública nos últimos anos devido ao aumento dos indivíduos imunocomprometidos. Este tipo de patologia possui ampla variedade e difusão, com diversas manifestações clínicas, desenvolvendo-se de maneira dependente do tecido onde estão localizadas (MENDONÇA, 2011). Sua atividade fungicida foi comprovada em testes *in vitro* frente a fungos leveduriformes, *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* dentre outros, e fungos filamentosos, *Geotrichum candidum* e *Trichosporon asahii* dentre outros, descritos como os causadores de onicomicoses, onde o extrato etanólico da própolis do estado do Paraná apresentou concentrações inibitórias mínimas abaixo de 2,0mg/mL (LONGHINI et al. 2007).

A própolis é um agente em potencial no tratamento de dermatofitoses e sua atividade é semelhante a de antifúngicos utilizados comercialmente. Um estudo com pacientes acometidos por candidíase oral, doença causada pelo fungo *Cândida albicans*, comprovou que a regressão da lesão causada por esse

patógeno quando tratada com própolis na concentração de 20% obtida da região de Minas Gerais foi muito similar ao observado quando se utilizou a nistatina, um dos antifúngicos de maior uso no tratamento de candidíase oral (PINTO; PRADO; CARVALHO, 2011).

2.2.4.3 Atividade Antiinflamatória

A atividade biológica como antiinflamatória, foi atribuída a algumas substâncias presentes na composição da própolis, basicamente ácidos fenólicos e flavonoides (PAULA, 2012), como: ácido caféico, quercetina, narigenina e o éster fenetílico do ácido caféico. Outros compostos encontrados na própolis já tiveram essa atividade descrita: ácido salicílico, apigenina, ácido ferúlico e galangina. A ação anti-inflamatória é atribuída à inibição da síntese de prostaglandinas e leucotrienos pelos macrófagos (LUSTOSA et al. 2008).

Entre os compostos flavonoides o de maior importância clínica é a galangina, este flavonoide possui atividade inibitória da ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase, enzimas responsáveis pela formação de mediadores químicos com atividade biológica que desencadeiam os processos inflamatórios. Além disso, o éster feniletílico do ácido caféico possui tal atividade por provocar uma inibição da liberação do ácido araquidônico da membrana das células, por suprimir a atividade das enzimas COX-1 e COX-2 sobre o ácido araquidônico, esse éster isolado possui atividade maior que o extrato da própolis, mesmo em baixas concentrações, essa diferença de atividade se dá devido ao éster feniletílico do ácido caféico inibir as prostaglandinas endoperóxido sintases, enzimas responsáveis pela produção de prostaglandinas presentes nos processos inflamatórios (PINTO; PRADO; CARVALHO, 2011).

2.2.4.4 Atividade Anticancerígena

A atividade anticancerígena da própolis foi relatada *in vitro* e *in vivo* e está associada com a presença de compostos fenólicos como, por exemplo, quercetina, luteonina, artepillin C, ácido caféico e ácido fenil éster caféico. A

atividade é traduzida em um efeito protetor contra alguns tipos de câncer, como o do pâncreas, pele, cervical, do pulmão, entre outros. Os mecanismos relacionados com a prevenção do câncer são: a indução da apoptose e a inibição da proliferação das células tumorais (PAULA, 2012).

Além dos compostos citados anteriormente foram isoladas outras substâncias com propriedades biológicas a referir (SFORCIN, 2012):

- O composto PMS-1 (diterpenoclerodânico) demonstrou capacidade de inibição do crescimento de células tumorais do fígado por imobilização na fase S do seu crescimento;

- O composto PRF-1 (perforina) revelou atividade antioxidante e citotóxica para as células do carcinoma hepatocelular e do pulmão;

- O composto artepillin C mostrou ter atividade antitumoral devido à fragmentação do DNA seguida de apoptose. Estes estudos quando efetuados *in vitro* demonstraram uma supressão do crescimento do câncer e quando realizados *in vivo* verificou-se um aumento da produção de células T CD4+/CD8+ pelo sistema imune.

2.2.4.5 Atividade Antiprotozoário

Trabalhos com extratos de própolis conseguiram isolar quatro compostos com atividade antiprotozoária, estes foram ativos contra *Trypanosoma cruzi*, o protozoário causador da doença de Chagas. São eles: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano, ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico e 2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2H-1-benzopirano (KUMAZAWA et al. 2011).

Extratos hidroalcoólicos da própolis vermelha, coletada no estado de Alagoas, apresentaram atividade antiprotozoária contra a espécie *Leishmania amazonensis*, um dos protozoários causadores da leishmaniose. Foi verificado que cobaias tratadas com extratos na concentração de 25mg/mL apresentaram uma redução na carga parasitária sem apresentar efeitos tóxicos para as formas

promastigotas e amastigotas extracelulares do parasita. Sendo assim a própolis intensificou o mecanismo de ativação macrofágica, levando à morte do *L. amazonensis* sanguíneo (AYRES; MARCUCCI; GIORGIO, 2011).

Foi observada, também, atividade antiprotozoária em camundongos, da espécie *Mus musculos*, tratados com extratos hidroalcoólicos de própolis verde (1,5mg/kg x dia⁻¹). O tratamento foi realizado por via oral, via tópica e pelas duas vias ao mesmo tempo, constatando uma redução de aproximadamente 78%, 84% e 90% da lesão causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, respectivamente (PONTIN et al. 2011).

2.2.4.6 Atividade Imunomodulatória

Na imunomodulação, elementos do sistema imunológico são suprimidos ou potencializados, o que leva a estudos sobre elementos que possam atuar colaborando com o sistema imune na luta contra diversas doenças. A própolis tanto atua inibindo como potencializando esse sistema, fato que ocorre devido a sua variedade química. Dentre essas formas, está a ativação dos macrófagos que exercem um papel fundamental na defesa do organismo através de fagocitose, gerando radicais livres, medeia processos inflamatórios e secreta inúmeras substâncias bioquímicas diferentes. Quando a própolis age sobre o macrófago, ela aumenta sua capacidade fagocítica, estimulando a secreção de citocinas, de outras substâncias como o óxido nítrico e de espécies reativas do oxigênio (EROs). Ácidos aromáticos e flavonoides agem por estimular a produção de proteína C1q pelos macrófagos. Própolis do Brasil e da Bulgária são capazes de aumentar a atividade bactericida dos macrófagos. Esse tipo de atividade também pode ser observado através do aumento das respostas imune celular e humoral (FISHER et al. 2008).

Sy et al. (2008) demonstraram que o tratamento com extrato de própolis diminui as inflamações das vias aéreas em ratos, provavelmente por sua capacidade em modular a produção de citocina. Desta forma, a própolis poder ser um agente para o tratamento da asma. Orsolich et al. (2004) mostraram que derivados hidrossolúveis de própolis, ácido caféico, éster feniletil do ácido

caféico e quercetina, quando testados em ratos em doses de 50-150mg/kg poderiam ser bastante úteis no controle do crescimento tumoral em modelos experimentais, sugerindo que tais compostos presentes na própolis serviriam como fator de prevenção de metástase.

2.2.4.7 Atividade Antioxidante

Ocasionalmente várias doenças estão sendo relacionadas com um aumento nos níveis de radicais livres em nosso organismo, entre elas: doenças cardiovasculares, doenças reumáticas, doenças neurológicas, doenças psiquiátricas, envelhecimento precoce, neoplasias, osteoporose, diabetes e inflamação (DEVASAGAYAM et al. 2005). Nos últimos anos vem aumentando a possibilidade do emprego de produtos naturais contendo polifenóis com propriedades antioxidantes, para o controle e prevenção destas patologias acima referidas (URQUIAGA; LEIGHTON, 2011).

Estudos apontam que o estresse oxidativo tem grande importância nos processos de envelhecimento, transformação e morte celular, com consequências diretas em muitos processos patológicos, a exemplo da indução do câncer e a propagação de SIDA em pacientes soropositivos (HIV+), bem como na fisiopatologia de muitas doenças crônicas, entre elas, doenças auto-imunes, cardiopatias, câncer, doenças do pulmão, intoxicação por xenobióticos e muitas outras. Por outro lado, é também fato reconhecido que espécies radiculares desempenham papéis fisiológicos importantes como o controle da pressão sanguínea, na sinalização celular, na apoptose, na fagocitose de agentes patogênicos, na fertilização de ovos e no amadurecimento de frutos (VASCONCELOS et al. 2007).

Um antioxidante é qualquer substância química que inibe os processos oxidativos na célula ou que, em baixas concentrações, diminuem ou inibem a oxidação do substrato. A principal função dos antioxidantes no plasma é se ligar a metais de transição como ferro e cobre e desta forma diminuir sua concentração plasmática e sua capacidade de catalisar reações que produzem radicais livres. O ser humano possui antioxidantes endógenos a exemplo das

enzimas superóxido dismutase, catalase e peroxidase e outros compostos que são adquiridos pela via alimentar a exemplo do ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E) e carotenóides (ALZOGHAIBI, 2013).

Os trabalhos vêm demonstrando que o poder antioxidante da própolis está relacionado às concentrações e/ou tipos de compostos fenólicos, principalmente flavonoides e ácidos fenólicos, encontrados nas amostras, mostram que mesmo com baixos teores de flavonoides as própolis de abelhas sem ferrão podem apresentar atividade antioxidante (MANRIQUE; SANTANA, 2011).

O extrato etanólico de própolis mostrou 57,00% de atividade antioxidante quando analisados na concentração de 90µg/mL, semelhante ao resultado obtido com a fração clorofórmica. Contudo, a fração hexânica analisada na mesma concentração demonstrou superioridade, com resultado de 78,00% de atividade antioxidante (ALENCAR et al. 2007)

2.2.4.8 Atividade Cicatrizante

Esta propriedade de regeneração tecidual, como ocorre na cicatrização de úlceras, feridas e hepatoproteção, possivelmente está relacionada com a atividade antioxidativa da própolis, pois quando os radicais livres são produzidos, eles dificultam ou impedem que ocorra a regeneração celular no local. A remoção dos radicais livres pelos flavonoides da própolis permite que o órgão ou tecido lesado possa se regenerar normalmente (MENEZES, 2005).

A própolis é tida como um produto que favorece a cicatrização atuando na regeneração tecidual na granulação de tecidos e ainda possui atividade antimicrobiana natural (BARBOSA et al., 2008). A regeneração tecidual, assim como ocorre na cicatrização de úlceras, feridas e hepatoproteção, provavelmente está ligada à atividade antioxidante, quando ocorre a produção de radicais livres, esses impede ou dificultam a regeneração celular. A retirada desses radicais pelos flavonoides da própolis possibilita a regeneração do tecido lesado (CABRAL et al. 2009).

Em estudo comparando a atividade cicatrizante de um creme de própolis com um de sulfadiazina de prata, foi mostrado que os ferimentos tratados com própolis apresentaram menos inflamação e mais rápida cicatrização do que aqueles tratados com sulfadiazina de prata (GREGORY et al. 2008).

2.2.4.9 Outras Atividades Biológicas

A atividade antiviral da própolis já é relatada há algum tempo, embora quando comparada em relação às outras atividades, principalmente a antimicrobiana e antifúngica, notamos que há pouco material publicado. Os extratos de própolis apresentam atividade antiviral na reprodução do vírus *Influenza A* e *B*, *Vaccinia*, vírus da doença de Newcastle (MARCUCCI, 2011), além de atuar em infecções causadas pelo *Rhinovirus* atribuindo a atividade aos seus constituintes, em especial os flavonoides (FONTANA et al. 2011).

A atividade anticariogênica tem sido relatada no combate à formação de placa bacteriana dental prevenindo e/ou controlando as cáries, a gengivite, problemas periodontais e/ou infecções causadas por diferentes agentes patogênicos, sem provocar o manchamento dentário que ocorre pelo uso prolongado da clorexidina, um antisséptico usado para higiene bucal (D'OLIVEIRA, 2011).

Há na literatura vários relatos sobre o efeito anestésico da própolis. Ghisalberti (2008) relata que o extrato de própolis foi capaz de produzir um efeito anestésico total em córneas de coelhos. O extrato etanólico de própolis (40g em 100mL de etanol 70%) foi relatado ser de 3 a 5 vezes mais potente que a cocaína usada como um anestésico, a qual foi introduzida na prática dental, na antiga União Soviética, em 1953.

2.3 Produtos Multifuncionais

2.3.1 Origem dos Cosméticos

O uso de cosméticos remonta há, pelo menos, 30 mil anos, onde povos primitivos tinham o hábito de pintar o corpo para fins ornamentais e religiosos. Por volta do ano de 180 d.C., na era Romana, um médico grego chamado Claudio Galeno realizou sua própria pesquisa na manipulação de produtos cosméticos, iniciando, assim, a era dos produtos químico-farmacêuticos (SEBRAE, 2008).

A Idade Média reprimiu o uso de cosméticos, o retorno ocorreu por volta do século XIX, já na Idade Contemporânea, quando cosmético não mais era associado com bruxaria e os produtos desse gênero eram vistos com os seus reais propósitos. Donas de casa, então, começaram a fabricá-los em suas próprias residências e entre os ingredientes utilizados incluíam-se sopas, limonadas, leite, água de rosas, creme de pepino e outros elementos que constituíam receitas exclusivas de cada família (SEBRAE, 2008).

2.3.2 Definição de Cosméticos

Atualmente, conforme a Câmara Técnica de Cosméticos (Catec), na Resolução RDC nº 211, de 14 de julho de 2005, a definição de cosméticos no Brasil é a seguinte:

Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e ou corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado.

O Brasil é o terceiro maior mercado consumidor de itens de Cosméticos, Higiene Pessoal e Perfumaria segundo ABIHPEC (2015) Devido às características inovadoras no lançamento de produtos que agregam mais tecnologia o referido setor cresce a cada ano. Dentre as categorias com maior

potencial de crescimento está a de produtos para pele, que partiu da 7ª posição em 2008 para a 5ª em 2013, tendo alcançado um valor de vendas próximo a U\$107bilhões, fazendo com que o país ganhe destaque para investimentos em novos produtos (ABIHPEC, 2015).

2.3.3 Definição de Produtos Multifuncionais

Nos últimos anos surgiram produtos que têm funções mais complexas do que a limpeza ou o embelezamento, eles estão sendo chamados de cosmecêutico, dermocosmético, cosmético funcional ou ainda cosmético de desempenho, mas essas palavras não são usadas ou mesmo aceitas uniformemente. Trata-se de formulações de uso pessoal que atuam benéficamente sobre o organismo, causando modificações positivas e duráveis na saúde da pele, mucosas e couro cabeludo. São produtos diferentes que usam mais de uma substância química como matéria-prima para obter diversidade de funções biológicas (GALEMBECK, CSORDAS, 2015).

Recentemente foi publicada uma definição onde esses produtos podem ser enquadrados, os chamados: Produtos Multifuncionais. Segundo a RDC 30/2012 da ANVISA os produtos multifuncionais são definidos como qualquer preparação cosmética destinada a entrar em contato com a pele e lábios, cujo benefício de proteção contra a radiação UV não é a finalidade principal, mas um benefício adicional do produto e o FPS mínimo não deverá ser menor que FPS 2.

Os produtos multifuncionais combinam tecnologia com as multifunções biológicas e agem em locais específicos. Os principais tipos de cosméticos multifuncionais combinam as ações fotoprotetora, antioxidante, cicatrizante e os corretivos globais para tratar, disfarçar e atenuar imperfeições. Essas combinações de ações de ativos podem trazer resultados mais eficientes e mais rápidos tornando-os acessíveis financeiramente e oferecendo algo mais do que a sua função básica (ABIHPEC, 2015).

2.3.4 Cosméticos à Base de Produtos Naturais

Uma das tendências do mercado e da Ciência Cosmética é o desenvolvimento de produtos com maior número de componentes de origem natural, especialmente os de origem vegetal, explorando de forma racional a biodiversidade brasileira. Estes produtos têm despertado muito interesse pelo mercado internacional, principalmente se a matéria prima apresenta estudos científicos comprovando a segurança e eficácia, além do comprometimento com o desenvolvimento sustentável (VIOLANTE et al. 2009).

As plantas medicinais possuem em sua composição princípios ativos utilizados em diversos tratamentos, servindo de base, principalmente, para os medicamentos fitoterápicos, mas também podendo ser aplicados na elaboração de novos produtos na área de cosméticos. Diversos produtos naturais compõem a base para a formulação de cosméticos e a diversidade de princípios ativos indica grande potencial de aproveitamento industrial, sobretudo das espécies de origem tropical (MIGUEL, 2011).

Vários extratos e óleos de plantas têm sido utilizados em produtos cosméticos como filtros solares, devido à ação fotoprotetora. A absorção máxima destes produtos não é muito bem definida porque são misturas de diferentes moléculas, contudo podem ser utilizados como potencializadores do FPS. O chá verde (*Camellia sinensis*), espécie vegetal com concentrações expressivas de polifenóis, demonstra atividade fotoprotetora deste metabólito, além disso, os flavonoides desempenham várias atividades terapêuticas como, por exemplo, antifúngica e bactericida, antioxidante e protetora dos raios ultravioletas (VIOLANTE et al. 2009).

Muitas das substâncias orgânicas que são conhecidas foram obtidas da natureza. O reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários muitos destes, de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamento e cosméticos, além de outras (PINTO et al. 2002).

2.4 Sistema Microparticulado

2.4.1 Microencapsulação

A microencapsulação é um termo genérico utilizado para designar o processo de produção de partículas de dimensões micrométricas, ou micropartículas. Elas são sistemas de ordem micrométrica (1000 μ m) que são classificadas de acordo com sua constituição. São chamadas microesferas se forem sistemas matriciais, onde o fármaco se encontra, de maneira uniforme, disperso e/ou dissolvido numa rede polimérica, ou de microcápsulas se servirem como reservatório, podendo conter um princípio ativo ou um núcleo rodeado por uma membrana ou revestimento (PEREIRA et al. 2006; SUAVE et al. 2006).

No âmbito farmacêutico, a obtenção de microcápsulas objetiva, principalmente, conversão de líquidos em sólidos, aumento e melhoria da dissolução, desenvolvimento de formas com liberação controlada, proteção do ativo frente aos agentes atmosféricos, como umidade, incidência de luz ou oxidação (Tabela 3) (PEREIRA et al. 2006; GRANADA et al. 2007).

Tabela 3 – Características de alguns sistemas microparticulados da indústria farmacêutica.

Princípio ativo	Finalidade da microencapsulação	Apresentação final
Paracetamol	Mascaramento de sabor	Comprimido
Ácido acetilsalicílico	Mascaramento de sabor Redução da irritação gástrica Liberação controlada	Comprimido/cápsula
Bromocriptina	Liberação controlada	Suspensão injetável
Leuprorelina	Liberação controlada	Suspensão injetável
Nitroglicerina	Liberação controlada	Cápsula
Progesterona	Liberação controlada	Várias

Fonte: SUAVE et al., 2006.

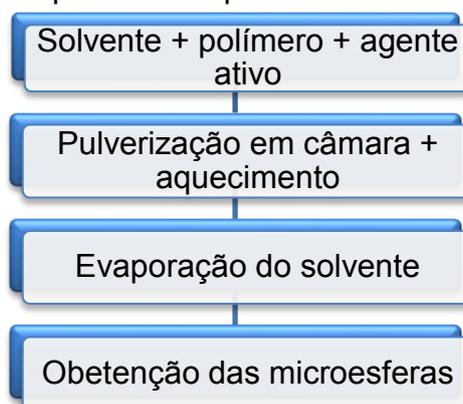
A microencapsulação é um processo relativamente recente, que pode ser conseguido através de algumas técnicas como métodos físicos, químicos e físico-químicos. Dentre esses, destaca-se o *spray drying* que é um método físico que proporciona ao agente ativo algumas vantagens (KAMINSKI, et al. 2009).

2.4.2 *Spray Drying*

A secagem por nebulização, mais conhecida por *spray drying* ou por aspersão, teve seus primeiros passos em 1865 quando foi patenteada a primeira operação de secagem de ovos, porém o início de sua utilização como processo em nível industrial data da década de 20. Tendo como grande diferencial a possibilidade de obtenção dos produtos diretamente na forma de pó, os primeiros produtos a que se tem notícia como obtidos em larga escala com a secagem por nebulização foram o leite e o sabão em pó (SOUZA et al. 2015).

Este processo de secagem baseia-se em três etapas. Na primeira, o fluido é disperso na forma de gotícula, o que proporciona uma grande área superficial. Na segunda, as gotículas entram em contato com a corrente de ar aquecido, havendo transferência de calor para elas. Na terceira, por ação da transferência de calor, o solvente evapora, formando uma partícula sólida, sendo posteriormente coletado (OLIVEIRA & PETROVICK, 2010). A figura 3 ilustra esquematicamente o processo de microencapsulação por *spray drying*.

Figura 3 – Fluxograma simplificado do processo.



Fonte: Adaptado de SUAVE et al. 2006.

A tecnologia *spray drying* oferece inúmeras vantagens que incluem a produção de partículas de qualidade consistente, a facilidade em relação ao uso contínuo, a aplicabilidade da técnica em materiais termosensíveis e termorresistentes, a capacidade de processar diversos tipos de matérias-primas

e a flexibilidade para a definição de um projeto com base na formulação. As partículas possuem, ainda, homogeneidade na composição e no tamanho das partículas, podendo culminar em uma liberação controlada do ativo (OLIVEIRA & PETROVICK, 2010).

No processo de secagem são utilizados agentes adjuvantes que além de facilitarem a secagem, melhoram as características do produto final. A concentração de sólidos presentes no líquido de alimentação exerce grande impacto sobre a eficiência da operação de secagem. A teoria de retenção do material ativo explica que este volatiliza pouco durante a secagem, se o material de parede forma rapidamente um filme semipermeável em torno das gotículas das emulsões atomizadas, de modo a permitir a difusividade da água enquanto retém o material ativo (FERNÁNDEZ et al. 2002).

Se este filme semipermeável forma microcápsulas isentas de qualquer deformação superficial, maior será a efetividade do material de parede na retenção do material ativo, então, a avaliação dos componentes do material de parede depende da concentração da mistura e dos parâmetros do processo que influenciam na formação da estrutura superficial das microcápsulas, pois, um material de parede é adequado quando o produto final é constituído de microcápsulas íntegras, isto é, o material ativo ficará completamente envolvido e protegido do ambiente pelo material de parede. Como citam Rosenberg & Young (1993) a funcionalidade das microcápsulas é criticamente dependente da sua estrutura superficial.

Visando conseguir melhor eficiência na obtenção de micropartículas com características que não comprometam o composto ativo, atualmente a indústria farmacêutica faz uso dos biopolímeros. Entre esses, destacam-se a quitosana, a carboximetilcelulose e o alginato de sódio por suas aplicações como adjuvantes em diversas preparações objetivando, entre outras coisas, modificar a liberação e melhorar a absorção de fármacos (WANG et al. 2010).

Oliveira et al. (2009) utilizou a técnica *Spray Dryer* para confecção de micropartículas de lacase, que é uma enzima pertencente à classe das oxiredutases e são encontradas em plantas, insetos, bactérias e fungos, como biossensores, utilizando a quitosana como adjuvante de secagem. As

micropartículas de quitosana apresentaram boa eficiência como suporte na imobilização da lacase e apresentaram resultados como biossensores na determinação de rutina em amostras de produtos farmacêuticos, não sofrendo interferência dos excipientes encontrados nas matrizes das amostras, com isso demonstrando a eficiência do processo *Spray Dryer*.

Toneli et al. (2008) obtiveram micropartículas de inulina utilizando *Spray Dryer*. A técnica *Spray Dryer* proporcionou a obtenção de micropartículas predominantemente lisas e com baixa absorção de umidade o garantiu a qualidade no processo de microparticulação da inulina.

Os extratos vegetais também podem ser microparticulados utilizando a técnica *spray drying*. Oliveira et al. (2010) relataram que extrato seco de *Passiflora edulis* Sims. contendo apenas dióxido de silício coloidal (Aerosil 200) como adjuvante de secagem apresentou melhores características das micropartículas quanto ao tamanho das partículas, higroscopia e umidade relativa, quando comparadas a extratos com hidrolisado de gelatina (Gelita-Sol P) ou a mistura dos dois em diferentes proporções. Vasconcelos et al. (2005) produziram micropartículas por *spray drying* a partir de extratos etanólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi, utilizada popularmente devido às atividades antimicrobiana, cicatrizante e antiinflamatória, onde o Aerosil[®]200 foi o adjuvante que apresentou maior adequabilidade quanto à estabilidade física dos extratos secos.

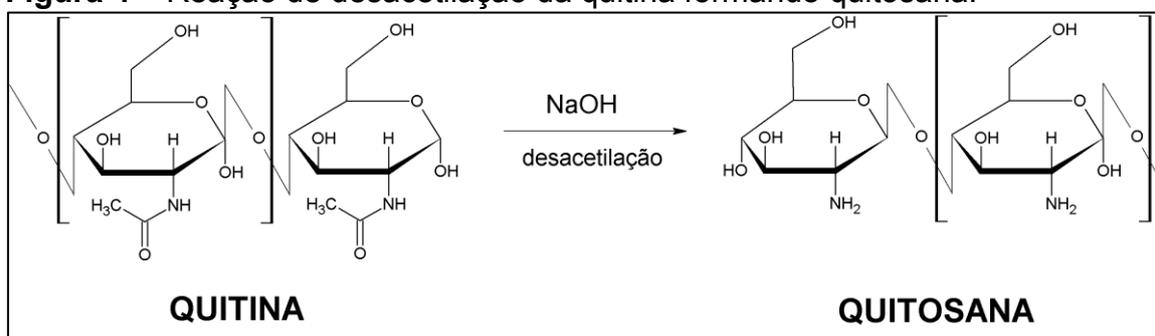
A técnica apresenta-se segura também quanto a compostos voláteis, onde foram obtidas micropartículas de óleo essencial de laranja utilizando os adjuvantes maltodextrina e goma arábica (ASCHERI et al. 2003), e também na obtenção de micropartículas com óleo essencial de *Lippia sidoides*, onde a microencapsulação por *spray drying* mostrou-se eficiente obtendo 64% de encapsulação do ativo com as atividades biológicas preservadas (FERNANDES, 2008).

2.4.3 Biopolímeros

2.4.3.1 Quitosana

A quitosana é um biopolímero catiônico hidrofílico, obtido a partir da desacetilação da quitina, principal componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos. Pode também ocorrer naturalmente na parede celular de alguns tipos de fungos, como os pertencentes aos gêneros *Mucor* e *Zygomycetes*. A desacetilação da quitina resulta em cadeias poliméricas, que possuem boas propriedades de adsorção de íons metálicos devido às interações que estes estabelecem com grupos amino, constituídas por unidades que sofreram a reação (D-glicosamina) e liberaram os grupos amino e de unidades que não foram alteradas (N-acetil-D-glicosamina) (Figura 4). Estas unidades variam ao longo da cadeia, tanto em quantidade quanto em distribuição (NIU et al. 2009).

Figura 4 – Reação de desacetilação da quitina formando quitosana.



Fonte: SPIN-NETO et al. (2008).

Após a dissolução em ácidos orgânicos e inorgânicos diluídos, a quitosana forma um polieletrólito viscoso e suas soluções são, geralmente, miscíveis com outros polímeros, formando complexos e quelatos. O uso de quitosana como transportador de fármacos tem permitido solucionar problemas como insolubilidade e hidrofobicidade de diversos agentes terapêuticos. Características como biocompatibilidade, capacidade de formar gel, biodegradabilidade e perfil atóxico fazem da quitosana excelente material a ser explorado como veículo de preparações cosméticas e farmacêuticas. (CAMPANA-FILHO & BRITTO, 2009).

2.4.3.2 Aplicações da Quitosana

O uso de quitosana como transportador de fármacos tem permitido solucionar problemas como insolubilidade e hidrofobicidade de diversos agentes terapêuticos, usando para isso o desenvolvimento de microesferas. Martinac e colaboradores (2002) realizaram estudo comparativo envolvendo genfibrozila na forma de pró-fármaco com PHEA (poliidroxietilaspártamida) e PHPA (poliidroxipropilaspártamida) como transportadores e microesferas contendo diferentes quantidades de quitosana. Ambos os sistemas, pró-fármacos e microesferas, promoveram alteração na cinética de liberação do fármaco. No entanto, os resultados mais promissores foram obtidos com microesferas constituídas de quitosana (baixa massa molar) combinada com PHPA ou HPMC (hidroxipropilmetilcelulose) na proporção (p/p) de 2:1 ou 3:1 polímero/fármaco.

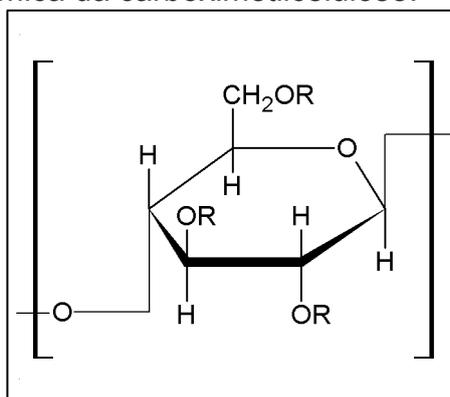
A via transepitelial, em algumas situações, mais conhecida como transdérmica, é um importante local de aplicação da quitosana. Ela é capaz de agir como promotor da permeação de macromoléculas e compostos hidrofílicos, o que resulta em maior absorção destes agentes pela epiderme ou mucosas. As principais vantagens do uso dessa via são: ausência de biotransformação pré-sistêmica, o que aumenta a biodisponibilidade de fármacos, ausência de hidrólise enzimática ocorrida no trato gastrointestinal e diminuição de flutuações na concentração plasmática, que ocorrem, frequentemente, quando se faz uso da via oral em horários diferentes. A eficiência deste polímero em promover a penetração transepitelial tem sido demonstrada com vários agentes terapêuticos: insulina, morfina, heparina e hidrocortisona (COSTA SILVA et al. 2006).

A quitosana favorece sistemas de liberação de fármacos e macromoléculas utilizando a via transdérmica, onde ocorre liberação do fármaco da matriz polimérica de forma contínua, sem, no entanto, atingir níveis tóxicos, e de maneira que não danifique as células da membrana epitelial. O mecanismo como isso acontece, embora ainda não elucidado, está associado ao efeito oclusivo em nível da pele, aumentando a hidratação e facilitando a absorção (FANG et al. 2002).

2.4.3.3 Carboximetilcelulose

A carboximetilcelulose (CMC) (Figura 5) corresponde a um éter de celulose que possui a estrutura baseada no polímero de $\beta(1\rightarrow4)$ -D-glucopiranosose da celulose produzido pela reação do álcali de celulose com ácido monocloroacético, em uma reação conhecida como síntese de Williamson (HEDLUND & GERGÅRD, 2007). Quando purificada, a carboximetilcelulose de sódio é um pó branco finamente dividido, atóxico, inodoro e biodegradável que pode ser dissolvido em água, comportando-se como um polímero aniônico (REIS, 2010).

Figura 5 – Estrutura química da carboximetilcelulose.



Fonte: Paulino, 2013.

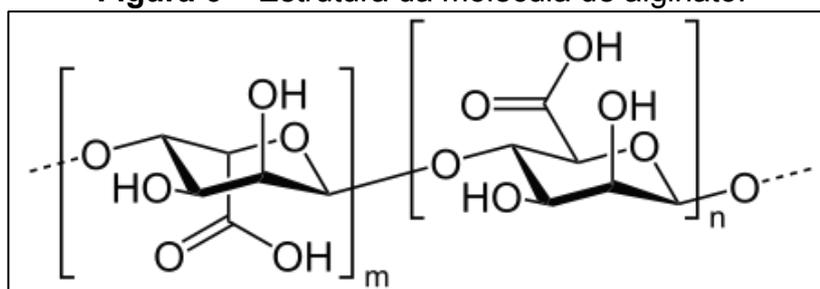
A CMC é um dos mais importantes derivados da celulose, sendo amplamente utilizada nas indústrias (ZACCARON et al. 2005). Uma das propriedades importantes da CMC está na viscosidade que é reversível dependendo da temperatura tornando seu campo de aplicação amplo, podendo ser utilizado tanto na forma de filmes quanto na forma de gel, ou hidrogel, após reação de reticulação com cátions bi- e trivalentes (NIE et al. 2004).

Recentemente, CMC destacou-se na literatura devido à habilidade em complexar cátions metálicos em soluções aquosas. Esta habilidade foi, então, explorada no tratamento de águas residuais, desenvolvimento de implantes dentários, biossensores e como agente retardante de chamas (REIS, 2010).

2.4.3.4 Alginato de Sódio

O alginato de sódio (AS) é um polissacarídeo de origem natural derivado principalmente de algas marinhas marrons, *Laminaria hyperborean*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera*, nas quais o alginato compreende até 40% do seu peso seco. Possui como característica estrutural cadeias lineares de $\beta(1\rightarrow4)$ -D-ácido manurônico e $\alpha(1\rightarrow4)$ -L-ácido gulurônico (Figura 6). Ele é muito solúvel em água e forma soluções viscosas com propriedades que dependem do peso molecular, dos componentes e dos íons que o constituem. A viscosidade da solução diminui com o aumento da temperatura, forma gel estável no pH de 5,0 a 10,0 (HOU et al. 2006).

Figura 6 – Estrutura da molécula de alginato.



Fonte: <http://www.visit-alginate.com/product/sodium-alginate-food-grade/> Acesso em 27 de janeiro de 2015.

O alginato é amplamente utilizado em alimentos, cosméticos e medicamentos e também encontra aplicação na indústria têxtil e de papel. Atualmente, vem sendo utilizado em aplicações inovadoras na área médica e farmacêutica. Características como a ação gelificante e espessante, biodegradabilidade, biocompatibilidade, habilidade de ser termoestável e ausência de toxidez tornam o alginato um material interessante para a liberação de fármacos (WANG et. al. 2010).

O alginato apresenta boas características para formação de nanocápsulas e tem sido extensamente avaliado para formação de partículas com tamanhos na faixa de 2 a 100nm para liberação de diferentes materiais. Nanocápsulas contendo alginato são usadas na liberação controlada de

inibidores de proteases e na liberação de insulina. Algumas proposições são inovadoras, como, por exemplo, seu uso em partículas inaláveis ou em partículas magnéticas, indicando que o material pode ser um carreador ideal para medicamentos no tratamento de doenças respiratórias (MULLER et al. 2011).

Compósitos de alginato como alginato-PEGAc (alginato de polietilenoglicol acrilato), um gel que combina as propriedades do alginato com as características mucoadesivas do polietilenoglicol, demonstram que o material não apresenta citotoxicidade. Compósitos de colágeno, contendo albumina encapsulada em esferas de alginato foram utilizados como suporte para o crescimento de células epiteliais da córnea; o material obtido apresentou biocompatibilidade e excelentes características de claridade ótica e resistência mecânica (MULLER et al. 2011).

Vários produtos farmacêuticos são imobilizados em alginato. Sua utilização como excipiente de liberação de medicamentos, curativos inteligentes, em formulações para prevenção de refluxo gástrico, bem como materiais de impressão dental, já é conhecida. Entre aplicações reportadas na literatura para estes materiais, está o estímulo a células do sistema imune, como citoquinas, interleucina 1, interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa, cuja resposta está associada à estrutura sequencial de biopolímeros constituídos exclusivamente de grupos manurônicos. Estruturas constituídas somente de grupos galurônicos foram propostas para o tratamento de pacientes portadores de fibrose cística em função de sua capacidade de modificar as características reológicas da mucina. Um gel formado por alginato modificado com peptídeos para permitir sua ligação com heparina, também é reportado como suporte para liberação controlada de fatores angiogênicos. Os estudos demonstraram o potencial terapêutico deste material na promoção da angiogênese, bem como na engenharia tecidual (MULLER et al. 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver micropartículas própolis-polímero para avaliação das atividades fotoprotetora, antioxidante, cicatrizante e antimicrobiana para aplicação como cosmético multifuncional

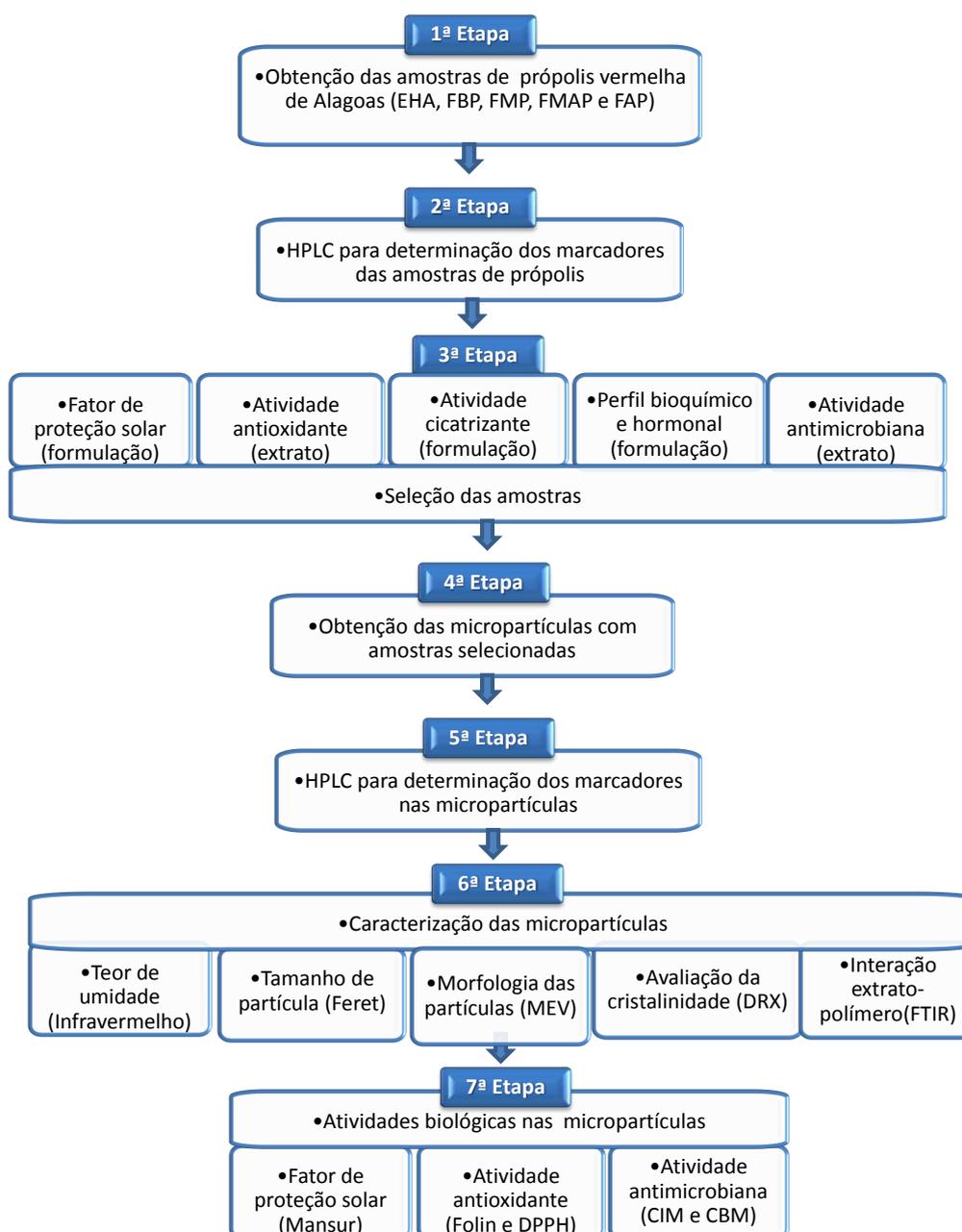
3.2 Objetivos Específicos

- Obter e caracterizar o extrato hidroalcoólico e as frações de própolis vermelha;
- Avaliar a ação antioxidante, fotoprotetora (fator de proteção solar, FPS, *in vitro*) e cicatrizante do extrato e frações de própolis vermelha;
- Caracterizar o perfil bioquímico, hormonal e toxicológico *in vivo* do extrato e frações de própolis vermelha;
- Obter e caracterizar micropartículas de própolis com quitosana, carboximetilcelulose e alginato de sódio.
- Avaliar as micropartículas quanto às ações fotoprotetora, antioxidante e antimicrobiana;

4. METODOLOGIA

Para um melhor entendimento deste trabalho a figura a seguir mostra as etapas que foram seguidas até a obtenção das micropartículas descrevendo quais os testes utilizados para a caracterização.

Figura 7 – Fluxograma com as etapas para obtenção das micropartículas de própolis vermelha de Alagoas.



Fonte: elaborada pelo autor.

4.1 Obtenção do Extrato Hidroalcoólico e Frações de Própolis Vermelha

A própolis utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida pelo laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas UNCISAL.

Baseada na metodologia utilizada por Alencar et al. (2007), a própolis bruta triturada (100g) foi submetida à extração utilizando-se 400mL de etanol 96°GL. A extração foi realizada deixando em repouso a frio durante 48 horas. Foram realizadas três lavagens com etanol para exaurir a extração dos compostos. A filtração da suspensão foi realizada em papel de filtro, utilizando bomba de vácuo, obtendo o extrato etanólico de própolis diluído. Em seguida o extrato foi evaporado (solvente) em rotaevaporador, obtendo assim o extrato concentrado de própolis. A este, foi adicionado 10% de água destilada obtendo o extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHA), o qual foi utilizado para os experimentos.

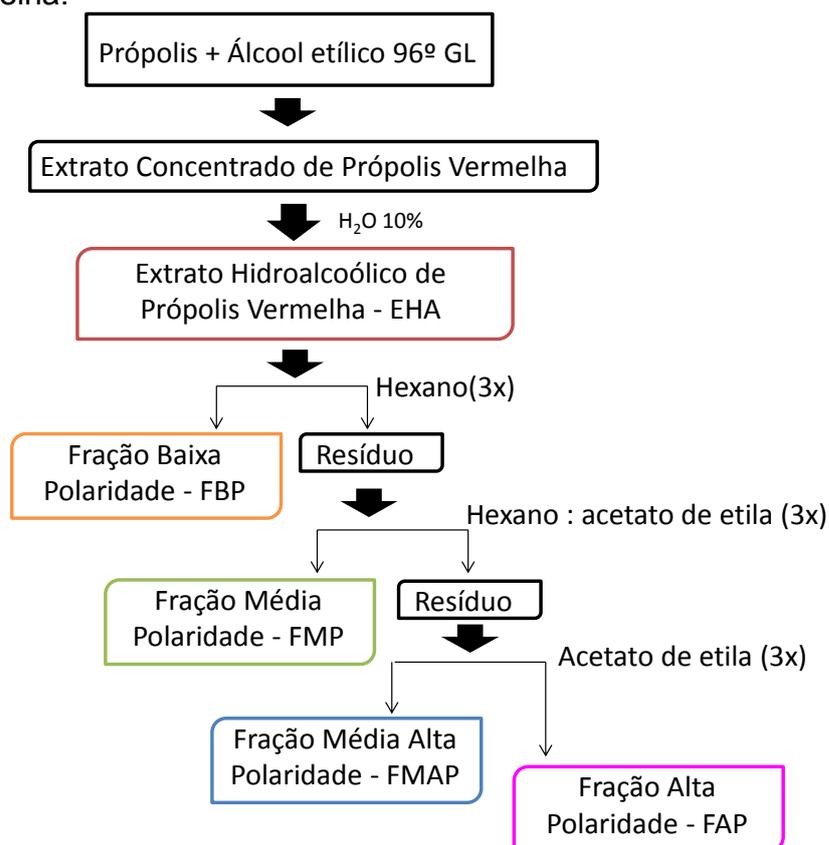
Para obtenção das frações de própolis o EHA foi lavado com solventes com polaridade crescente (particionamento líquido-líquido): hexano e acetato de etila. Inicialmente o EHA foi misturado/agitado com hexano P.A. e deixado em repouso em funil de decantação até a completa separação das fases. Em seguida, a fase mais densa foi coletada, chamada de resíduo do extrato de própolis, e a fase menos densa foi denominada de fração de baixa polaridade da própolis vermelha (FBP).

Para obtenção da próxima fração, uma mistura de hexano: acetato de etila (7:3) foi preparada e misturada/agitada com resíduo do extrato de própolis em funil de decantação. Após a completa separação de fases, a fase mais densa foi coletada, chamada de resíduo da fração EHA, e a fase menos densa foi denominada de fração de média polaridade da própolis vermelha (FMP).

Utilizando o resíduo da fração EHA obtido do procedimento anterior foi preparada e misturada/agitada com acetato de etila P.A. e deixada em repouso até a completa separação de fases. Em seguida, a fase mais densa foi coletada, chamada de fração de alta polaridade de própolis vermelha (FAP), e a fase

menos densa foi denominada de fração de média-alta polaridade da própolis vermelha (FMAP). Em todas as etapas o procedimento foi repetido três vezes (Figura 8).

Figura 8 – Fluxograma de obtenção do extrato hidroalcoólico e frações de própolis vermelha.



Fonte: elaborada pelo autor.

4.2 Marcadores da Própolis Vermelha

Os padrões utilizados para comparação dos picos obtidos foram: ácido gálico, ácido felúrico, ácido vanílico, daidizeína, formononetina e quercetina. Baseado na metodologia proposta por Castro et al. (2007) os extratos e frações (EHA, FBP, FMAP e FAP) foram solubilizados em metanol Sigma-Aldrich grau HPLC e diluídos até uma concentração de 10mg/mL. Essa solução foi homogeneizada em banho ultrassônico por 10 minutos e em seguida filtrada em membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno) com porosidade de 0,45µm antes

de serem injetadas no equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE de marca Shimadzu.

As amostras foram introduzidas no equipamento utilizando o injetor de rheodyne com volume de 20,0 μ L. O sistema de CLAE consistia de uma bomba LC-20AD, um forno CTO-20AD, um detector de UV SPD-20AD, um módulo controlador CMB-20AD acoplado a um microcomputador através de um software da Shimadzu LC-solution para aquisição dos dados. A fase móvel consistia de um sistema gradiente (ácido fórmico:metanol). O solvente A contendo ácido fórmico:água (1:19 v/v) e o solvente B metanol grau HPLC. A separação foi alcançada numa coluna Phenomenex C18 (250,0mm \times 4.6mm i.d.; 5,0 μ m) mantida numa temperatura de 40,0°C. A taxa de fluxo foi mantida em 0.80 mL/min e o detector UV ajustado para 281nm. Um sistema gradiente foi programado da seguinte forma: 40,0% de B no intervalo entre 0 e 10 minutos; 50,0% de B no intervalo entre 10 e 30 minutos ; 60,0% de B no intervalo entre 30 e 45 minutos; 100,0% de B no intervalo entre 45 e 55 minutos e redução para 40,0% de B a partir de 55 minutos, mantendo-se nesta condição isocrática até o tempo de 60 minutos. Os resultados obtidos com a corrida das amostras foram capturados pelo software e expressos em forma de gráficos (FROZZA et al., 2013).

4.3 Seleção das Frações de Própolis Vermelha

Para selecionar qual a fração da própolis vermelha seria microencapsulada, foi preparada a formulação contendo própolis que foi utilizada na determinação o fator de proteção solar *in vitro* e na atividade cicatrizante *in vivo*. As atividades antioxidante e antimicrobiana *in vitro* utilizaram o extrato e frações de própolis e a avaliação da toxicidade *in vivo* foi determinada para o experimento da cicatrização *in vivo*.

4.3.1 Formulação de Própolis Vermelha

O extrato e as frações de própolis (EHA, FBP, FMP, FMAP e FAP) foram incorporados à base Lanette, adquirida em farmácia de manipulação, nas

concentrações de 0,1%, 0,5% e 1,0%. Para efetuar a incorporação foi adicionado 2% (v/m) de propilenoglicol, marca Vetec, às amostras e agitado vigorosamente, levado ao banho-maria e ao ultrassom até a completa solubilização da própolis, só então foi acrescentada a base Lanette, com o auxílio de gral e pistilo, obtendo o creme a base de própolis vermelha de Alagoas.

As formulações foram envasadas em recipiente de polipropileno, hermeticamente fechadas e estocadas em temperatura ambiente até o momento de uso. Elas foram utilizadas para determinação do Fator de Proteção Solar *in vitro* (FPS) e a concentração de 1% para a Atividade Cicatrizante *in vivo*,

4.3.2 Determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro*

Para uma triagem inicial do poder de fotoabsorção da própolis vermelha foi realizada uma ressuspensão dos extratos, que se apresentavam com o aspecto resinoso, pesando 0,1g de cada uma das amostras (EHA, FBP, FMP, FMAP, FAP) e completando-se o volume para 10mL com etanol P.A. marca Vetec para que fosse obtida solução estoque na concentração 1% (massa/volume). As soluções foram acondicionadas em tubos tipo Falcon e homogeneizadas em aparelho de ultrassom durante 10 minutos.

Antes do procedimento de leitura da absorbância, cada solução foi novamente diluída até a concentração final de 0,1% (massa/volume). Alíquotas de 3,0mL foram colocadas em cubetas de cristal de quartzo e procedeu-se a leitura da absorbância na faixa de comprimento de onda entre 200 a 600nm. Foi utilizado etanol P.A. como branco e o equipamento UV-Vis (Spectro Agilent 8453 Modelo G1103A) foi utilizado para as leituras que foram realizadas em triplicata.

Para determinação do FPS foi seguida a metodologia proposta por Mansur et al. (1986) que demonstrou ser eficaz e rápida, além de apresentar uma boa correlação com os resultados *in vivo*, já tendo sido utilizado em outros trabalhos (BARTH, 2000; ROSA et al. 2008).

A partir da formulação de própolis que estão descritas no item 4.3.1 foram preparadas diluições de 0,2µg/mL em etanol incluindo nessa preparação o branco, constituído somente com a base, e o controle, constituído pela base acrescida de propilenoglicol na mesma concentração utilizada nos filtros descrita da tabela a seguir.

Tabela 4 – Diluições utilizadas para medição do fator de proteção solar *in vitro* obtidas a partir de formulações de própolis.

Formulação de própolis	Diluição em etanol P.A.
EHA + creme Lanette 0,01mg/g – Formulação A	Formulação A + etanol 0,2µg/mL
EHA + creme Lanette 0,05mg/g – Formulação B	Formulação B + etanol 0,2µg/mL
EHA + creme Lanette 0,1mg/g – Formulação C	Formulação C + etanol 0,2µg/mL
FBP + creme Lanette 0,01mg/g – Formulação D	Formulação D + etanol 0,2µg/mL
FBP + creme Lanette 0,05mg/g – Formulação E	Formulação E + etanol 0,2µg/mL
FBP + creme Lanette 0,1mg/g – Formulação F	Formulação F + etanol 0,2µg/mL
FMP + creme Lanette 0,01mg/g – Formulação G	Formulação G + etanol 0,2µg/mL
FMP + creme Lanette 0,05mg/g – Formulação H	Formulação H + etanol 0,2µg/mL
FMP + creme Lanette 0,1mg/g – Formulação I	Formulação I + etanol 0,2µg/mL
FMAP + creme Lanette 0,01mg/g – Formulação J	Formulação J + etanol 0,2µg/mL
FMAP + creme Lanette 0,05mg/g – Formulação K	Formulação K + etanol 0,2µg/mL
FMAP + creme Lanette 0,1mg/g – Formulação L	Formulação L + etanol 0,2µg/mL
FAP + creme Lanette 0,01mg/g – Formulação M	Formulação M + etanol 0,2µg/mL
FAP + creme Lanette 0,05mg/g – Formulação N	Formulação N + etanol 0,2µg/mL
FAP + creme Lanette 0,1mg/g – Formulação O	Formulação O + etanol 0,2µg/mL
BRANCO (creme Lanette)	BRANCO + etanol 0,2µg/mL
Controle (propileno glicol + creme Lanette 0,2mL/g)	Controle + etanol 0,2µg/mL

Fonte: elaborada pelo autor.

Foi medida a absorbância das soluções preparadas nos comprimentos de onda de 290, 295, 300, 305, 310, 315 e 320nm e depois foi aplicada a fórmula apresentada a seguir:

Equação 1 – Cálculo do fator de proteção solar (FPS) *in vitro*.

$$\text{FPS} = \text{FC} \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \cdot 2 \cdot \text{I}(\lambda) \cdot \text{Abs}(\lambda)$$

FC = fator de correção (igual a 10), determinado de acordo com os dois filtros solares de FPS conhecidos e testados em seres humanos de tal forma que um creme contendo 8% de homossalato origine um FPS = 4;

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

I (λ) = intensidade da luz solar no comprimento de onda λ.

Abs (λ) = leitura espectrofotométrica da absorbância da solução proposta como filtro solar.

Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda é dado pela tabela seguir (MANSUR, 1986):

Tabela 5 – Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação.

λ (nm)	EE(λ) . I(λ)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Total	1,0000

Fonte: MANSUR, 1986.

4.3.3 Atividade Antioxidante

Para a determinação da atividade antioxidante da própolis vermelha foi avaliado o conteúdo de compostos fenólicos totais, seguindo a metodologia de Folin e a capacidade de captura do radical DPPH, determinando a cinética e a concentração efetiva para capturar 50% do radical (NUNES et al. 2012) .

I. Teor de Compostos Fenólicos Totais

O conteúdo de polifenóis nos extratos de própolis foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. O método foi baseado no princípio da reação de redução da mistura dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico em meio alcalino a óxidos de tungstênio e molibdênio causada pelos compostos fenólicos, formando um complexo de coloração azul, cuja absorção máxima ocorreu em 760nm. O resultado foi obtido em equivalente de ácido gálico (CICCO et al. 2009; KUMAZAWA, 2004; ADELMANN, 2005).

Preparou-se uma solução a 5% (m/v) de carbonato de sódio (Na_2CO_3) em água destilada que foi reservada.

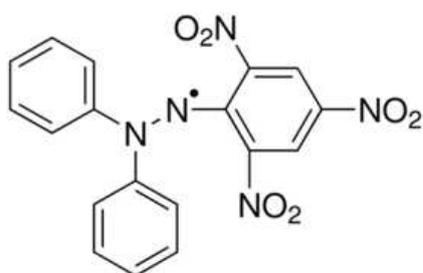
Foi adicionado em um tubo de ensaio 75 μL do EHA juntamente com 225 μL de água destilada para obter um volume de 300 μL de amostra. Em seguida, adicionou-se 300 μL de reagente Folin-Ciocalteu (marca Sigma-Aldrich) agitando vigorosamente e a solução foi deixada em repouso por 2 minutos. Posteriormente, adicionou-se 2,4mL da solução de (Na_2CO_3) a 5% e a mistura foi colocada em banho-maria a 40°C, ao abrigo da luz, por 20 minutos. A concentração final de EHA foi de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no tubo. Transcorrido esse tempo, as amostras foram transferidas para cubetas de vidro optico e executou-se a leitura em espectrofotômetro a 760nm no equipamento UV-Vis (Spectro Agilent 8453 Modelo G1103A). O mesmo procedimento foi realizado para as frações de própolis e todas as análises foram realizadas em triplicata.

Para a elaboração da curva de concentração padrão foi utilizado ácido gálico. Preparou-se uma solução estoque de ácido gálico em etanol P.A. e obteve-se diluições nas concentrações de 1 a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estas soluções foram utilizadas como amostras seguindo o mesmo procedimento anterior onde a própolis foi substituída pelo padrão. Os resultados obtidos com as absorbâncias foram utilizados para construir a curva padrão. O teor de compostos fenólicos totais foi expresso como equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico/100mg de sólidos totais).

II. Atividade de Captura do Radical Livre DPPH

Este método se baseia na transferência de elétrons de uma substância antioxidante para um radical livre, o DPPH (2-difenil-1-picrilidrazil), que ao se reduzir a coloração altera-se de púrpura para amarelo (Figura 8). O consumo de DPPH foi monitorado através da medida do decréscimo da absorbância das soluções das amostras, em um espectrofotômetro UV-Vis Agilent 8453 G1103A a 517nm (BIANCO et al. 2010).

Figura 9 – Estrutura do radical livre DPPH.

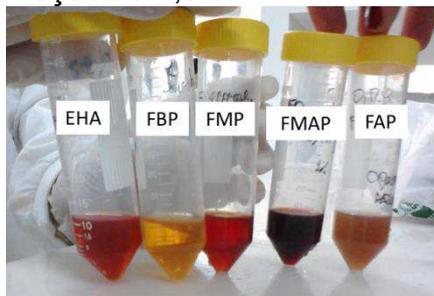


Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/43180?lang=pt®ion=BR>

Para o preparo da solução de DPPH pesou-se em balança analítica 3,2mg de DPPH (marca Sigma-Aldrich) em tubo protegido da luz. Em seguida realizou-se a transferência quantitativa do DPPH para um balão volumétrico utilizando metanol como solvente, completou-se o volume final para 100mL e homogeneizou. A solução foi mantida em banho de gelo e ao abrigo da luz durante todo o uso.

Pipetou-se em cubeta de vidro óptico 2,7mL da solução de DPPH e adicionou-se 0,3mL da solução de própolis, extrato hidroalcoólico e frações, obtendo-se própolis na concentração final de 25µg/mL e executou-se a leitura em espectrofotômetro 517nm após 30 minutos. O procedimento foi realizado em triplicata e repetido com os padrões quercetina, Trolox e ácido gálico. Realizou-se a medida da absorbância em espectrofotômetro UV-Vis Agilent 8453 G1103A a 517nm. Utilizou-se metanol como branco (Figuras 10 e 11).

Figura 10 – Variação de tonalidades das amostras de própolis vermelha diluídas em etanol P.A. na concentração de 1,0 %.



Fonte: elaborada pelo autor.

O percentual de redução do DPPH, que também pode ser denominado atividade de captura do radical livre, foi calculado utilizando-se a seguinte equação:

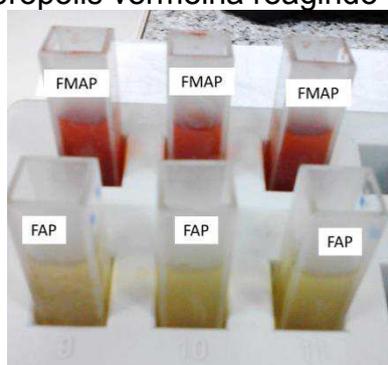
Equação 2 – Percentual de redução do DPPH.

$$\% \text{ Redução} = \frac{(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}})}{A_{\text{controle}}} \cdot 100$$

Onde A_{controle} = Absorbância da solução de DPPH;

A_{amostra} = Absorbância da solução de própolis com DPPH após 30 min.

Figura 11 – Amostras de própolis vermelha reagindo com o radical DPPH.



Fonte: elaborada pelo autor.

Para a determinação da cinética de captura do DPPH foi seguida a seguinte metodologia. Foi preparada a solução de DPPH pesando 3,2mg de DPPH (Sigma-Aldrich) em tubo protegido da luz e completando-se o volume final para 100mL mantendo a solução em banho de gelo e ao abrigo da luz durante todo o uso.

Uma alíquota de 2,7mL dessa solução de DPPH foi transferida para uma cubeta de vidro optico a qual foi adicionado 300 μ L de EHA, FBP, FMP, FMAP ou FAP solubilizados em etanol P.A. na concentração de 250 μ g/mL, completando-se o volume para 3mL. Essa amostra foi mantida ao abrigo da luz efetuando-se as leituras em espectrofotômetro UV-Vis Agilent 8453 G1103A em comprimento de onda de 517nm. Para os padrões ácido gálico, Trolox e quercetina também foi utilizada a mesma metodologia, substituindo as amostras de própolis pelos padrões.

Os resultados foram expressos em % de redução do DPPH que as amostras eram capazes de retirar da solução. Para a determinação da atividade de captura do radical livre DPPH utilizou-se a Equação 2, em que foi obtido o percentual de redução do DPPH nos seguintes tempos: 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos.

A concentração eficiente 50% (CE_{50}), quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%, foi determinada utilizando o programa Microcal Origin 8,5, a partir de uma curva exponencial de primeira ordem, obtida plotando-se na abscissa as concentrações das amostras (μ g/mL) e na ordenada, a porcentagem de DPPH que foi reduzida. Obteve-se a equação da reta $y = ax + b$ e substituiu-se o y por 50 para determinar em qual concentração x de própolis e frações haveria 50% de redução do DPPH. Foram utilizadas 5 concentrações com valores entre 10 e 50 μ g/mL (BIANCO et al. 2010; SITHISARN & GRITSANAPAN, 2005).

4.3.4 Atividade Cicatrizante *in vivo*

O protocolo experimental foi submetido ao Comitê de ética e Pesquisa (CEP) sobre o uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e aprovado pelo nº 013852/2011-79 (Anexo C) e seguiu todos os preceitos éticos e diretrizes nacionais e internacionais que tratam da utilização de animais de laboratório. O presente experimento foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Feridas da Universidade Federal de Alagoas.

4.3.4.1 Animais Utilizados no Experimento

A metodologia utilizada preconizava a utilização de ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar. Assim, foram utilizadas 35 ratas fêmeas com idade equivalente a 2 meses e peso corpóreo de 184 ± 15 g, que foram cedidas pelo Biotério da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (UNCISAL).

Os animais permaneceram em observação nos primeiros 15 dias que antecederam à cirurgia, o qual foi considerado como período de quarentena, sendo este período necessário para identificação de possíveis variações do estado de saúde e comportamento que poderiam interferir nos resultados. Após este período, os animais foram divididos em sete grupos: controle negativo, onde foi aplicada a formulação contendo somente creme Lanette e propilenoglicol, item 4.3.1, controle positivo, tratados com Neopantol[®] (dexpantenol 50 mg/g), grupo EHA, grupo FBP, grupo FMP, grupo FMAP e grupo FAP, onde cada grupo foi composto por 5 animais. As formulações contendo própolis foram utilizadas a concentração de 1%.

Os animais foram mantidos em condições de temperatura controlada variando entre $20 \pm 2^\circ\text{C}$, com iluminação artificial simulando períodos de claro e escuro (12 horas claro e 12 horas escuro-fotoperíodo) em gaiolas individualizadas no biotério da Universidade Federal de Alagoas.

As gaiolas foram confeccionadas em polipropileno de dimensões 340mm de largura X 490mm de comprimento X 160mm de altura, com tampa gradeada

em aço inoxidável e com comedouro em “V”, onde foram colocados, aproximadamente, 2cm de maravalha de serragem. A limpeza foi realizada com frequência de 2 dias, onde procedia-se com lavagem das gaiolas e substituição da maravalha. A alimentação dos animais foi à base de ração do tipo pallets (Purina®) e o acesso à água foi livre. O fotoperíodo foi controlado por aparelho automatizado, assim como as condições de temperatura e umidade que foi regulada por um termo-higrômetro.

4.3.4.2 Procedimento Cirúrgico

Antes da realização do procedimento cirúrgico, os animais foram pesados em uma balança analítica e verificada a temperatura corpórea com o auxílio de um termômetro digital. Os dados obtidos foram anotados em livro de protocolo para um posterior acompanhamento e avaliação.

Após o procedimento de pesagem e verificação da temperatura os animais foram anestesiados com a aplicação intramuscular de 60 mg/kg de cloridrato de cetamina a 10% e 15mg/kg de xilazina a 2% na proporção de 3:1, anestesiando o animal com 0,1mL/100g (MANUAL DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS/FIOCRUZ, 2008). Quando os animais estavam em indução anestésica foram colocados em decúbito ventral para realização da epilação, seguida de assepsia do local com clorexidina a 2% e em seguida foram confeccionadas as feridas cirúrgicas com o auxílio de um *punch* cirúrgico com diâmetro de 8mm.

Em cada um dos animais foram realizadas três lesões incisivas tomando uma distância de 1cm de uma lesão para outra. Essas feridas foram realizadas na região do dorso, com a retirada da pele e do tecido subcutâneo, deixando exposta a fáscia muscular dorsal. Em seguida, foi realizada a medida do diâmetro das lesões com a utilização de um paquímetro.

Como os animais estavam divididos em grupos, cada animal recebeu o tratamento respectivo ao grupo que pertencia. Foi aplicado 0,6mL de formulação em cada lesão com o auxílio de seringas estéreis descartáveis, evitando, assim, contaminação das feridas. Após a aplicação da formulação foi realizado o

curativo com a utilização de gases e faixas estéreis e em seguida os animais foram novamente levados às gaiolas e mantidos sob observação até retomarem a consciência. Quando apresentavam movimentos foram avaliados quanto aos aspectos gerais e após a anotação dos dados foram levados novamente ao biotério.

4.3.4.3 Análise Macroscópica

Durante a realização do experimento, os animais foram monitorados durante todos os dias, onde foi observado o estado geral do animal e anotada a avaliação em livro de protocolo. Foram observados parâmetros como: agilidade, apetite e sinais de estresse.

O tratamento das feridas foi realizado diariamente uma vez ao dia durante o período de 21 dias do experimento. O curativo fechado foi realizado durante os três primeiros dias após a cirurgia, onde primeiro retirava-se o curativo do dia anterior, procedia-se com a assepsia da área das lesões usando água para injeção e em seguida foi aplicada, novamente, a pomada respectiva de cada grupo tratado.

Após o terceiro dia não foram realizados curativos fechados nos animais, pois não foi verificada a presença de inflamação e secreções no local, evitando-se, assim, lesões por conta do contato com as gazes. Para o procedimento de curativo nas feridas abertas lavava-se com água para injeção as lesões e logo em seguida aplicava-se as formulações.

As avaliações das feridas foram realizadas nos 3°, 7°, 14°, e 21° dias e os aspectos macroscópicos foram anotados em formulário (Anexo A). Foram observados parâmetros como: tamanho da lesão (medição realizada com o auxílio de um paquímetro), tecido de granulação, crosta, inflamação, hemorragia, cor da lesão, tecido necrótico e exsudato. Qualquer outra alteração era anotada em livro de protocolo.

4.3.4.4 Análise Microscópica

Seguindo o protocolo experimental, foi realizada a eutanásia de 7 animais (um de cada grupo), durante o 3°, 7°, 14°, 21° dias de experimento, onde foi escolhido, preferencialmente, o primeiro animal de cada grupo. Caso algum animal apresentasse alguma alteração motora ou outra que pudesse comprometer a permanência no experimento, esse era escolhido em detrimento aos outros para ser eutanasiado. No 21° dia, por se tratar do último dia do protocolo experimental, foi realizada a eutanásia do restante dos animais.

Antes da realização do procedimento da eutanásia foram observados todos os parâmetros de análise macroscópica das feridas, bem como pesagem e verificação da temperatura. Após essa observação, os animais foram anestesiados por via intramuscular e confirmada a indução anestésica, procedeu-se a punção cardíaca até completa exsanguinação e parada cardiorrespiratória.

Com a confirmação da eutanásia, foram retiradas as lesões existentes em seu dorso e colocadas em frascos contendo formol na concentração de 10,0%. As lesões foram avaliadas microscopicamente por médico patologista e os parâmetros analisados foram anotados em formulário próprio conforme anexo B.

A análise microscópica das lesões foi realizada pelo Centro de Patologia e Medicina Laboratorial (CPML) da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (UNCISAL). Foram avaliados critérios como: Fibrina, Hemorragia, Hiperemia, Infiltrados Inflamatórios, Proliferação vascular, Células mono e polimorfonucleares, Fibroblastos, Hiperplasia Epitelial, Fibras colágenas, graduadas de forma a considerar ausente (0%), discreto (1 a 25%), moderado (25 a 50%) e intenso (acima de 50%) e a presença de reepitalização e necrose classificada em ausente ou presente.

4.3.5 Perfil Bioquímico e Hormonal

Essas análises foram executadas no Centro de Patologia e Medicina Laboratorial (CPML) da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (UNCISAL).

Nas análises bioquímicas foram dosados os seguintes parâmetros bioquímicos: ácido úrico, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol VLDL, triglicérides, proteínas totais, albumina e globulina, lactato desidrogenase (LDH), fósforo, glicose, ureia, creatinina, alanina aminotransferase, aspartatoaminotransferase, fosfatase alcalina (FA) e magnésio utilizando o método espectrofotométrico automatizado.

Nas dosagens hormonais foram dosados os hormônios TSH, T3 total e T4 total nos 3º, 7º, 14º e 21º dias de tratamento e FSH, LH, Prolactina nos 14º e 21º dias de tratamento. Foi utilizado nessa análise o método quimioluminescência.

4.3.6 Atividade Antimicrobiana

As amostras de própolis, EHA, EHA microparticulado, FMAP e FMAP microparticulado, foram solubilizadas em salina estéril utilizando como agente solubilizador o Cremophor® RH 40 em uma concentração de 50% (v:v) obtendo-se uma solução estoque de 100mg/mL de cada preparação. Previamente a essa solubilização foi determinada a concentração máxima de agente solubilizador capaz de não afetar o crescimento microbiológico.

As soluções estoque foram acondicionadas em temperatura de $6 \pm 2^\circ\text{C}$ até o momento da utilização, onde neste momento elas eram deixadas em temperatura ambiente e homogeneizadas por 10 minutos em banho ultrassônico.

Para a determinação da CIM foram utilizados os seguintes espécimes microbiológicos: *Staphylococcus aureus* (CCCD-S009), *Staphylococcus epidermidis* (CCCD-S010), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Shigella flexneri* (CCCD-S006), *Salmonella*

entérica (CCCD-S004), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Candida albicans* (CCCD-CC001).

As amostras foram pipetadas em microplacas de poliestireno estéreis e solubilizados em meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI) em concentrações decrescentes diluindo-se no primeiro poço 100µL de solução estoque para 100µL de meio de cultura. Em seguida foram adicionados os espécimes microbiológicos obtendo em cada poço a concentração de aproximadamente $1,5 \times 10^6$ bactérias e $1,5 \times 10^4$ leveduras (10µL de suspensão microbiológica a 0,05McFarland). Para certificar-se da viabilidade dos espécimes microbiológicos foi confeccionada uma fileira na microplaca chamada de Controle Positivo (C.P.) de crescimento onde somente foi adicionado o meio de cultura e os espécimes microbiológicos; para certificar-se da esterilidade da microplaca outra coluna contendo somente meio de cultura foi reservada e a esta, chamada de Controle Negativo (C.N.) de crescimento. Também foi deixada uma fileira para confirmar que o agente solubilizante não estava inibindo o crescimento microbiológico. As microplacas foram fechadas e acondicionadas em estufa bacteriológica a 36°C por 24 horas.

Para a leitura, foi adicionado 20µL de uma solução de TTC (cloreto de 2, 3, 5-trifeniltetrazólio) na concentração de 0,02% em todos os poços. As microplacas foram novamente fechadas e acondicionadas em estufa bacteriológica a 36°C por mais 3 horas proporcionando a reação colorimétrica do TTC sobre os microrganismos viáveis. Os poços que apresentaram coloração vermelha foram considerados como crescimento microbiológico positivo, já os poços que não revelaram a coloração vermelha foram considerados como crescimento microbiológico negativo.

A CIM foi definida como a menor concentração do extrato em mg/mL capaz de impedir o crescimento microbiano.

Para a determinação da CBM alíquotas da microplaca na concentração igual e acima da CIM foram semeadas em placas de Petri contendo o meio de cultura agar Mueller Hinton, depois foram acondicionadas em estufa

bacteriológica a 36°C por 24 horas. O crescimento de colônias sobre a placa de agar Mueller Hinton indicava que o microrganismo ainda continuava viável.

A CBM foi definida como a menor concentração do extrato em mg/mL capaz de eliminar totalmente o crescimento microbiológico dos espécimes microbiológicos após a semeadura em meio de cultura agar Mueller Hinton.

4.3.7 Análise Estatística dos Resultados

Para avaliação estatística dos resultados obtidos com os diferentes grupos pertencentes aos experimentos, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) e para comparação dos valores obtidos para cada grupo experimental foi utilizado o teste de Tukey. Tais análises foram realizadas usando o programa GraphPad Prism 6.0. As diferenças foram consideradas significativas quando valores de $p \leq 0,05$.

4.4 Obtenção das Micropartículas de Própolis Vermelha

Para obtenção das micropartículas de própolis foram utilizados os adjuvantes: quitosana, alginato e carboximetilcelulose. As amostras de própolis serão descritas a seguir.

4.4.1 Própolis com Quitosana

Inicialmente foi preparado gel de quitosana nas concentrações de 1 e 2% (m/v). Mediu-se 1430 μ L de ácido acético (PA) e foi adicionado água Milli-Q em q.s.p 100mL, obtendo-se uma solução de ácido acético a 0,25mol/L⁻¹. A quitosana *in natura* foi adicionada a solução ácida e agitada por 24 horas em agitador magnético.

Para saber qual concentração de própolis diluída em etanol capaz de incorporar em gel de quitosana, realizou-se teste prévio de incorporação, partindo da mistura de 1ml de solução EHA/etanol a 10%, 7,5%, 5,0%, 2,5% e

1% com 1mL de solução de quitosana (1 e 2%) na proporção 1:1 e deixados em agitador magnético durante 24 horas. Foi escolhida a maior concentração de própolis capaz de incorporar ao gel de quitosana.

As soluções expostas à atomização foram as seguintes:

Solução A: confeccionada com 100mL de gel de quitosana 1% + 100mL de EHA para uma concentração final de 10% de EHA (m/m).

Solução B: confeccionada com 100mL de gel de quitosana 1% + 100mL de EHA para uma concentração final de 10% de EHA (m/m) + 1500µL glutaraldeído.

Solução C: confeccionada com 100mL de gel de quitosana 2% + 100mL de EHA para uma concentração final de 10% de EHA (m/m).

Solução D: confeccionada com 100mL de gel de quitosana 2% + 100mL de EHA para uma concentração final de 10% de EHA (m/m) + 500µL glutaraldeído.

Solução E: confeccionada com 100mL de gel de quitosana 1% + 100mL de FMAP para uma concentração final de 10% de FMAP (m/m).

As micropartículas obtidas com a menor concentração de polímero foram escolhidas.

4.4.2 Própolis com Alginato

O gel de alginato foi preparado com 1g de alginato diluído em 100mL de água destilada (1%) e foi deixada em agitador magnético por 24 horas para uma perfeita solubilização.

Para saber qual concentração de própolis era capaz de incorporar ao gel de alginato, realizou-se teste prévio de incorporação, partindo da mistura de 1ml de solução EHA/etanol a 10% com 1mL de solução de alginato.

Foram preparadas as seguintes soluções:

Solução A: gel de alginato 1% + EHA para uma concentração final de 10% de EHA (m/m).

Solução B: gel de alginato 1% + EHA para uma concentração final de 10% de EHA (m/m) + 5 mL de NaOH 1,0N, pH aproximado de 8.

Solução C: gel de alginato 1% + FMAP para uma concentração final de 10% de FMAP (m/m).

Solução D: gel de alginato 1% + FMAP para uma concentração final de 10 % de FMAP (m/m) + 5mL de NaOH 1,0 N, pH aproximado de 8.

As soluções de EHA e FMAP que obtiveram melhor solubilização foram levadas para a atomização.

4.4.3 Própolis com Carboximetilcelulose

O gel de carboximetilcelulose foi preparado com 1g de carboximetilcelulose diluído em 100mL de água destilada (1%) e foi deixada em agitador magnético por 24 horas para uma perfeita solubilização.

Para saber qual concentração de própolis era capaz de incorporar ao gel de carboximetilcelulose, realizou-se procedimento semelhante ao item 4.4.2.

Foram preparadas as seguintes soluções:

Solução A: gel de carboximetilcelulose 1% + EHA para uma concentração final de 10% de EHA (m/m).

Solução B: gel de carboximetilcelulose 1% + EHA para uma concentração final de 10% de EHA (m/m) + 5mL de NaOH 1,0N, pH aproximado de 8,0.

Solução C: gel de carboximetilcelulose 1% + FMAP para uma concentração final de 10% de FMAP (m/m).

Solução D: gel de carboximetilcelulose 1% + FMAP para uma concentração final de 10% de FMAP (m/m) + 5mL de NaOH 1,0N, pH aproximado de 8,0.

As soluções de EHA e FMAP que obtiveram melhor solubilização foram levadas para a atomização.

4.4.4 *Spray drying*

As soluções preparadas com própolis e polímero foram atomizadas em equipamento Mini *Spray Dryer* modelo B-290, da marca Buchi seguindo a metodologia de Silva et. al. (2011) e Oliveira & Petrovick, (2010). Os parâmetros utilizados no equipamento foram, bico injetor com diâmetro de 1,4mm, temperatura de entrada de 160°C, aspirador em 45 metros cúbicos por hora, fluxo em 5 mL/min e temperatura de saída $93 \pm 3^\circ\text{C}$.

Os pós obtidos foram acondicionados em recipientes de polipropileno hermeticamente fechados, em temperatura ambiente e protegidos da luz.

4.5 Marcadores nas Micropartículas de Própolis Vermelha

As micropartículas obtidas foram solubilizadas em metanol Sigma-Aldrich grau HPLC e diluídos até uma concentração de 10mg/mL equivalente em própolis no pó atomizado. Essa solução foi homogeneizada em banho ultrassônico por 20 minutos até a completa solubilização da amostra e em seguida filtrada em membrana de PVDF com porosidade de 0,45 μm antes de serem injetadas no equipamento seguindo os mesmos procedimentos do item 4.2. Os padrões utilizados para comparação dos picos obtidos foram: ácido gálico, ácido felúrico, ácido vanílico, daidizeína, formononetina e quercetina.

Os resultados obtidos para os pós atomizados foram comparados aos obtidos com as amostras fluidas, determinando o teor de rendimento dos marcadores majoritários.

4.6 Caracterização das Micropartículas de Própolis Vermelha

As micropartículas de própolis obtidas foram caracterizadas pelo teor de umidade, análise do tamanho das partículas e microscopia eletrônica de varredura.

4.6.1 Teor de Umidade

Para determinação do teor de umidade nas micropartículas de própolis vermelha obtidas foi utilizado método gravimétrico de radiação infravermelha. Neste método foi utilizado equipamento modelo MOC63u - SHIMADZU que permitiu obter a porcentagem de umidade através de um gerador de funções acoplado a uma balança digital que possuía acoplada uma fonte de radiação. A amostra foi colocada em um prato de alumínio, $500 \pm 0,5\text{mg}$, sob câmara que protegia a balança do calor gerado através de um colchão de ar, para que a leitura da balança não fosse perturbada pelos vapores liberados da amostra. A temperatura elevou-se até 120°C e permaneceu até que o peso mantivesse constante. A diferença entre o peso inicial e o final foi expressa em porcentagem de teor de umidade.

4.6.2 Granulometria

Realizada utilizando a medida do diâmetro de Feret que corresponde a maior distância entre as duas linhas paralelas tangenciais aos limites externos da partícula. A imagem da amostra foi capturada por sistemas ópticos que transformaram a informação luminosa em um dado digital. Através do processamento e análise dessas imagens foi possível realçar detalhes e bordas dos grãos, atenuar ou eliminar ruídos e estruturas indesejáveis e com isso selecionar características ou estruturas de interesse para a realização de medições.

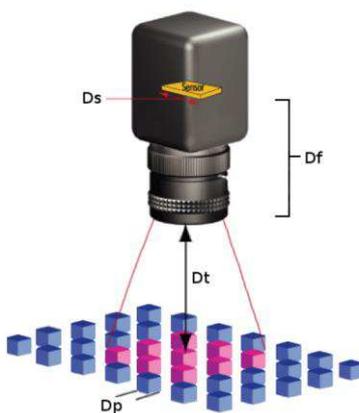
Foi utilizado um microscópio óptico com capacidade de aumento de 1000 vezes com ocular provida de nônio graduado. Na aquisição das imagens,

primeiramente ajustou-se o sistema de aquisição tomando por base a quantidade de pixels que forneceria o menor grão distinguível (Figura 12). O ajuste foi realizado calculando-se a distância de trabalho D_t a ser empregada de acordo com a dimensão diagonal do sensor D_s , a distância focal D_f e a resolução diagonal R_d presentes nas especificações da câmera; a dimensão da menor partícula D_p e a dimensão da matriz representativa de tamanho n^2 desejadas [SUTTON et al. 2009], através da Equação 3:

Equação 3 – Cálculo do tamanho de partícula.

$$D_t = \frac{D_p D_f R_d}{n D_s}$$

Figura 12 – Esquema de ajuste do equipamento para granulometria.



Fonte: Sutton et al., 2009.

Após a contagem de no mínimo 500 partículas foram obtidas as curvas e distribuição granulométrica em função da frequência percentual do tamanho das partículas.

4.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

As micrografias eletrônicas por varredura foram obtidas num equipamento HITACHI Tabletop SEM: TM-3000, utilizando energias de 5 ou

15kV, nos modos de iluminação lateral (shadow), frontal (topo) ou misto (compo).

As imagens foram obtidas em baixo vácuo, de forma a evitar desidratação excessiva e implosão das esferas. Não se utilizou metalização e as amostras foram preparadas por adesão de uma fina camada do pó em pastilhas de pelco-tabs (10mm), fixadas sobre um holder de alumínio (30mm). Foram obtidas imagens em várias escalas de ampliação, utilizadas ampliações de 1000, 1500, 2000 e 2500 vezes.

4.6.4 Difração de Raios X – DRX

A técnica de difração de raios-X usada na caracterização das amostras foi o método de pó. Neste método as amostras pulverizadas foram expostas a uma radiação monocromática. O equipamento utilizado foi da Shimadzu modelo XRD-7000 com uma fonte de radiação de $\text{CuK } \alpha$ com voltagem de 40 Kv e corrente de 30 mA, com filtro de Ni. Os dados foram coletados na faixa de 2θ de 3-90 graus com velocidade de goniômetro de $2^\circ/\text{min}$ com um passo de 0,02 graus.

4.6.5 Espectroscopia de Infravermelho - FTIR

Nesse estudo foram realizadas análises utilizando-se a técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) acoplada a um elemento de reflexão total atenuada (ATR), para verificar a composição química quantitativa das amostras. Sabe-se que cada molécula possui um estado de vibração característico. Assim, é possível identificá-la através dos valores da energia de radiação infravermelha absorvida. Estes valores são observados em picos, formando bandas de absorção ou transmitância, resultantes dos comprimentos de onda absorvidos.

O espectro foi obtido de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} com resolução de 16 cm^{-1} . O equipamento utilizado foi espectrômetro Thermo Scientific, modelo Nicolet

iS10, em modo *Smart OmniSampler Infrared Fourier Transform Spectroscopy* (SOSIFT).

4.7 Atividades Biológicas das Micropartículas

Foi avaliado nas micropartículas obtidas o fator de proteção solar, a atividade antioxidante e atividade antimicrobiana seguindo a metodologia descrita nos itens 4.3.2, 4.3.3 e 4.3.6.

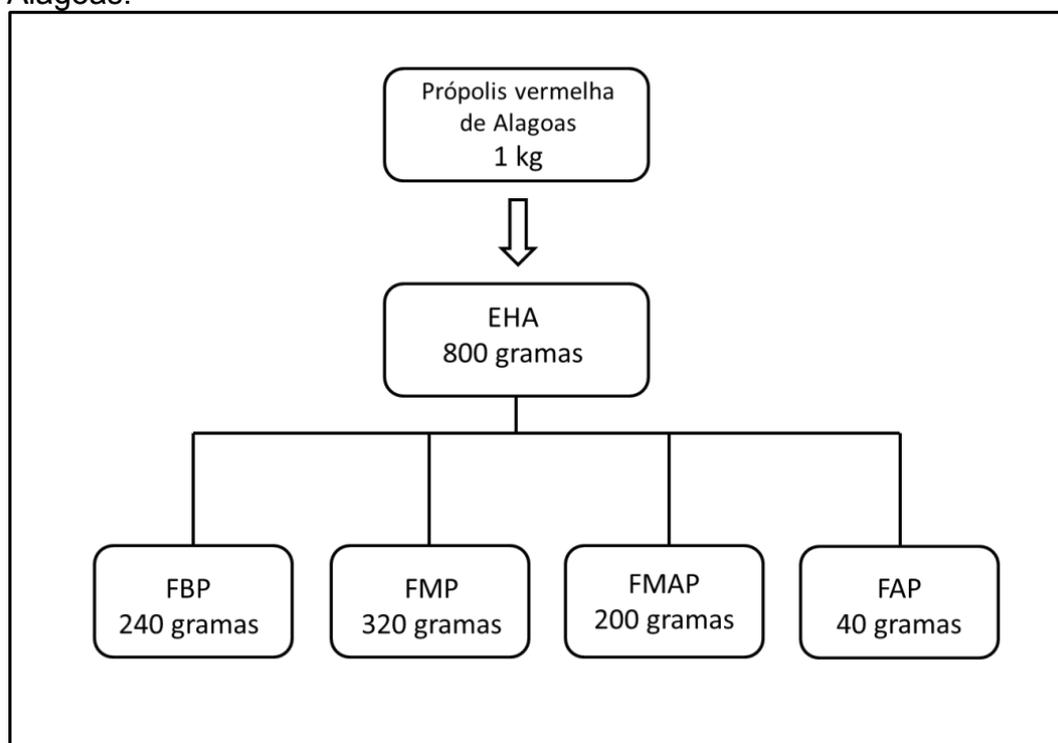
Os resultados obtidos para as micropartículas foram comparados com os obtidos nas amostras fluidas e as análises estatísticas dos resultados seguiu metodologia utilizada no item 4.3.7.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção do EHA e Frações de Própolis Vermelha

Após a extração etanólica da própolis vermelha de Alagoas (PVA) foi obtido um rendimento de 80% em massa de EHA. Já para as frações de própolis o rendimento foi o seguinte: FBP 30% (240g), FMP 40% (320g), FMAP 25%(200g) e FAP 5%(40g) (Figura 13).

Figura 13 – Rendimento do extrato hidroalcoólico e frações de própolis vermelha de Alagoas.



Fonte: elaborada pelo autor.

Em trabalhos realizados por Oldoni (2007) utilizando amostras de própolis vermelha obtidas de duas regiões diferentes do estado de Alagoas foi possível obter o rendimento de 58% para o extrato hidroalcoólico, 11% para a fração de baixa polaridade e 28,5% para a fração de média polaridade. Resultado semelhante também foi observado em pesquisas realizadas por Cabral et al. (2009) que também utilizaram amostras de própolis vermelha do

estado de Alagoas obtendo rendimento de 11,36% para a fração de baixa polaridade e 30,08% para a fração de média polaridade. Quando comparados esses rendimentos aos obtidos neste trabalho pode-se observar que a PVA apresentou um maior percentual de rendimento conforme descrito na tabela a seguir.

Tabela 6 – Comparação do rendimento de amostras de própolis vermelha.

Amostras	neste estudo	Oldoni (2007)	Cabral et al. (2009)
EHA	80%	58%	-
FBP	30%	11%	11,36%
FMP	40%	28,5%	30,08%

Fonte: elaborada pelo autor.

5.2 Marcadores da Própolis Vermelha

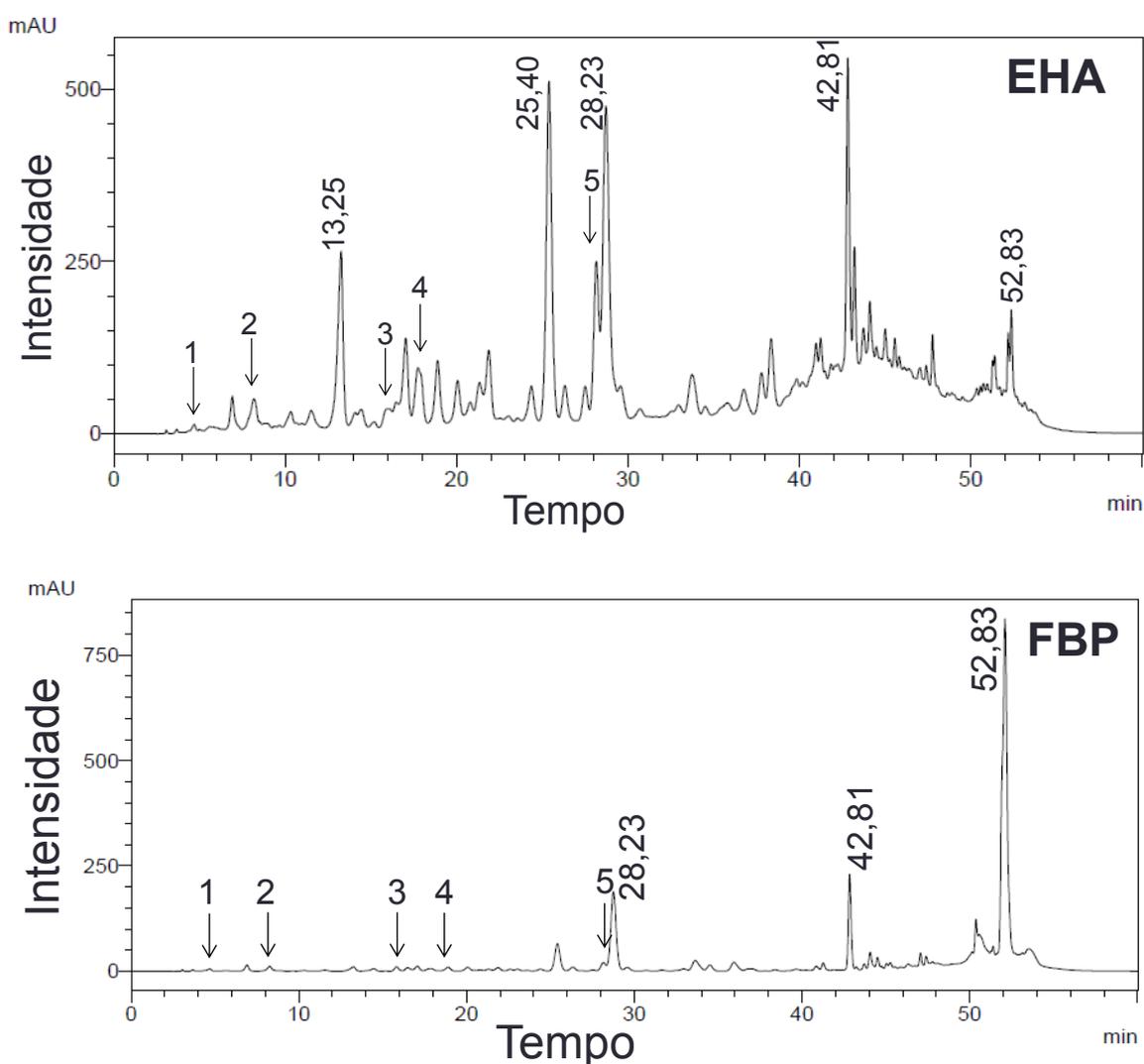
Na própolis existem numerosos compostos fenólicos, especialmente flavonoides e ácidos fenólicos. Alguns compostos encontrados na própolis vermelha do nordeste do Brasil também estão presentes em outros tipos de própolis, porém, alguns compostos são somente encontrados na própolis vermelha de Alagoas, ou, ainda, estes compostos apresentam maiores quantidades nela, o que diferencia dos demais tipos (MARCUCCI et al. 2014).

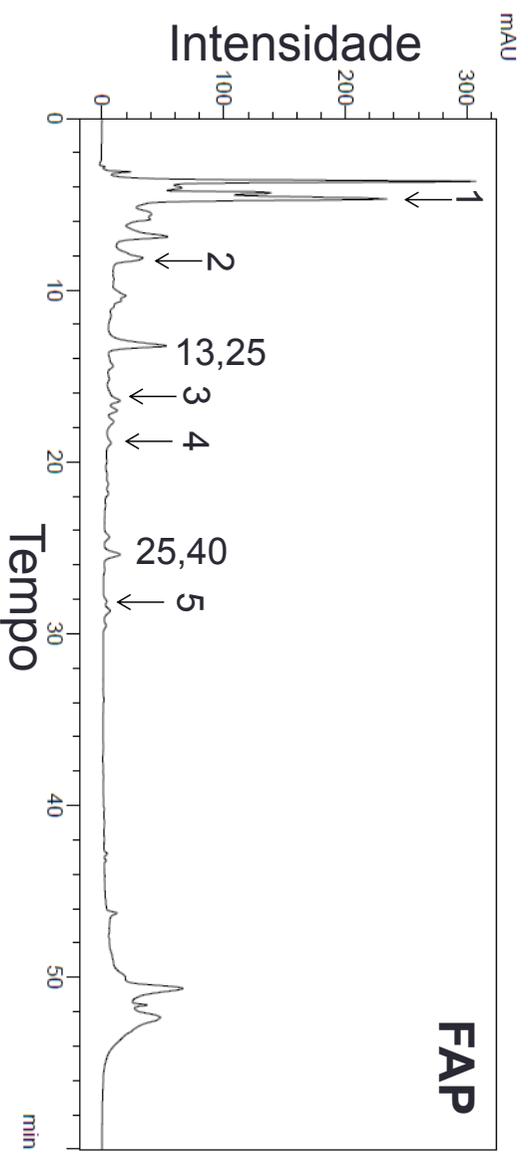
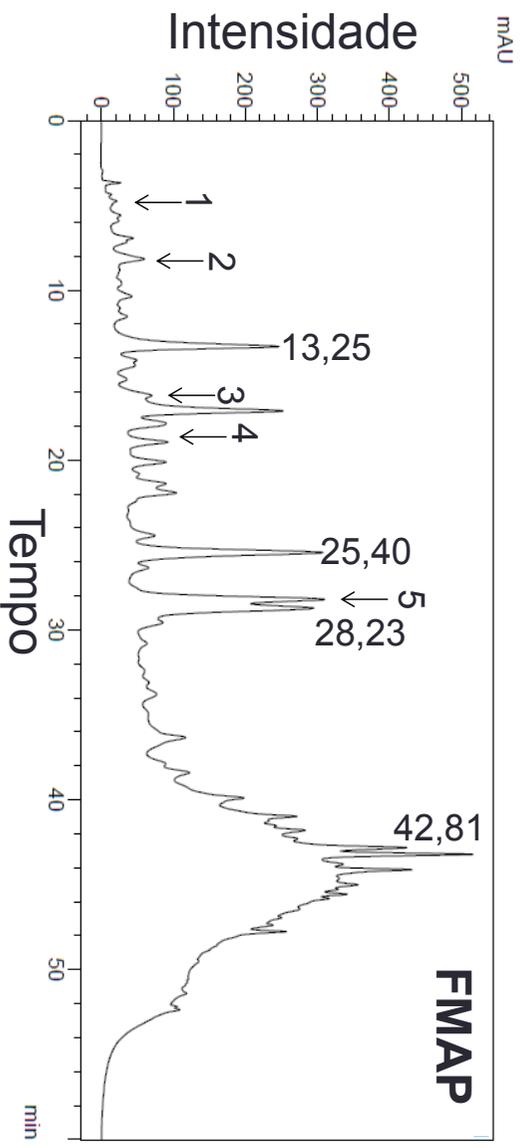
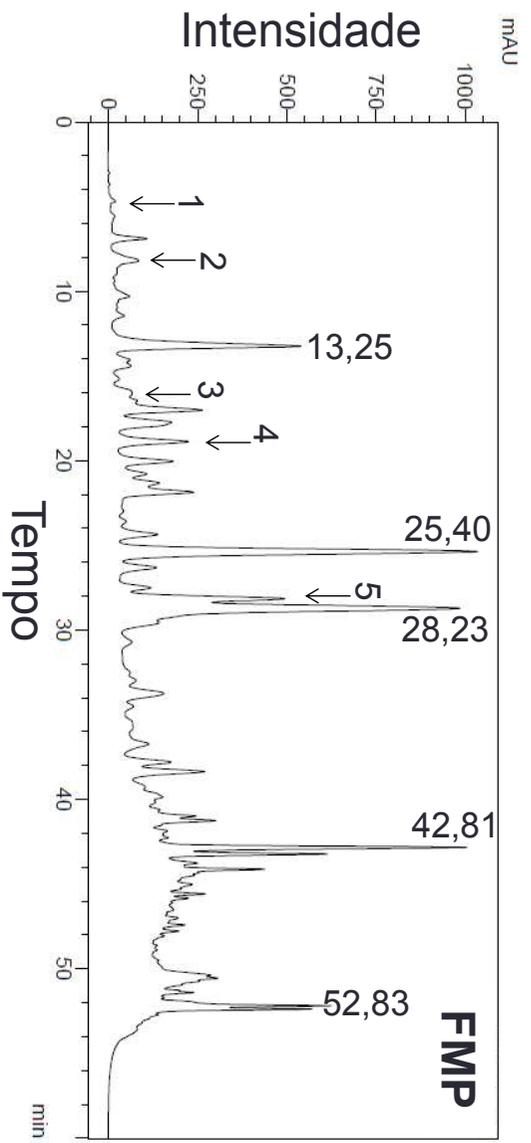
Após análise cromatográfica a Formononetina foi identificada como um dos marcadores de qualidade com tempo de retenção em 28,1 minutos, e corresponde ao pico 5 (Figura 14). Estes estudos corroboram com os trabalhos realizados por Dausch et al. (2007) onde é apontada a Formononetina como um dos componentes majoritários da própolis vermelha brasileira. Alguns flavonoides, em especial a Formononetina, que é um isoflavona, apresentam diversas ações biológicas, dentre elas: modulação da produção de interleucinas, ação anti-inflamatória, antitumoral, antioxidante e neuroprotetora in vivo e in vitro (WANG et al. 2012; YE et al. 2012; DAUGSCH et al. 2007).

Também foram identificados outros compostos que apresentam ações biológicas, como: Ácido Gálico, Ácido Felúrico, Daidizeína e Quercetina. Em

trabalhos realizados por Alencar et al. (2007) e Cabral et al. (2009) foram identificados ácido felúrico, daidzeína, quercetina na própolis vermelha analisada e também nas frações. Em Cabral et al. (2009) a formononetina foi um dos picos majoritários o que também observamos nestes estudos.

Figura 14 – Cromatogramas do EHA e frações de própolis vermelha de Alagoas na concentração de 10mg/mL (max.281 nm). Compostos identificados e tempo de retenção (1) Ácido Gálico, (2) Ácido Felúrico, (3) Daidizeína, (4) Quercetina e (5) Formononetina.





Fonte: elaborada pelo autor.

Além dos compostos identificados no EHA, (1) ácido gálico, (2) ácido felúrico, (3) daidizeína, (4) quercetina e (5) formononetina, destacou-se a presença de cinco compostos os quais foram designados por picos majoritários. Segundo Mendonça et al. (2015) o composto no tempo de retenção de 13,25min pode ser a liquiritigenina, o composto em 25,40min pode ser isoliquiritigenina, o composto em 28,23min pode ser isoformononetina e o pico em 52,83min corresponde a guttiferonas C e D. Dausch et al. (2007) também identificaram os referidos compostos em amostra de própolis vermelha, além disso, compararam o cromatograma da própolis com o cromatograma obtido da *D. ecastophyllum* e constataram que havia semelhança de composição entre eles, ratificando que a *D. ecastophyllum* é a principal fonte botânica da própolis vermelha.

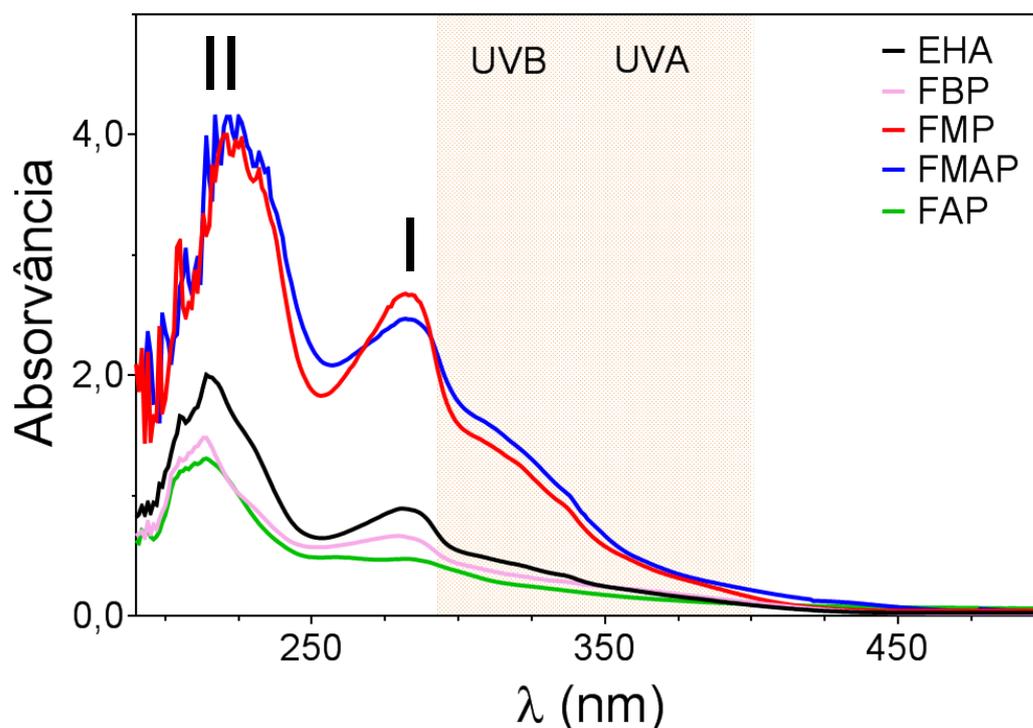
Segundo Mendonça et al. (2015) o pico no tempo de retenção em 42,81min pode estar associado a três compostos, a guttiferonas E, F e xantoquimol em mistura isomérica. Esses compostos possuem potencial farmacológico, com inúmeras atividades terapêuticas, tais como: anticâncer, antiinflamatório, antileprótico, antiviral, antibacteriano, antifúngico, antidiurético, giardicida entre outros (BANDEIRA et al., 2007).

5.3 Seleção das Frações de Própolis Vermelha

5.3.1 Determinação do FPS

Foi observado que tanto o EHA como as frações de própolis apresentaram dois pontos de comprimento de onda de máxima absorção. A fração de média polaridade e a fração de média alta polaridade foram as que apresentaram maior absorção na região compreendida entre o Ultravioleta médio e o Ultravioleta B a qual corresponde à absorção entre 200-315nm, onde apresentou um dos picos de absorção em aproximadamente 280nm. Contudo, todas as amostras apresentaram baixa absorção na região do Ultravioleta A, compreendida entre 315-400nm (Figura 15).

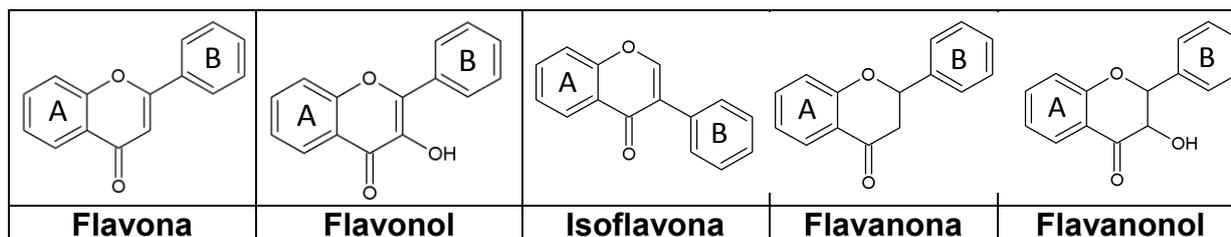
Figura 15 – Varredura das absorvâncias do extrato hidroalcoólico e frações de própolis vermelha de Alagoas na concentração de 0,1%.



Fonte: elaborada pelo autor.

Na figura 15 podem ser observadas duas bandas entre 250-350 nm (banda I) e 190-240 nm (banda II), as quais estão relacionadas à presença de principais classes de flavonóides. Essas bandas são utilizadas como parâmetro para determinação da qualidade da própolis, conforme o Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA), que estabelece que o espectro de absorção de radiações no UV-Vis na própolis deve apresentar bandas entre 200 e 400 nm (BRASIL, 2001).

Na própolis os flavonoides exibem absorção na região do UV-VIS devido à presença do cromóforo do benzeno. Flavonas e flavonóis (Figura 16) quando apresentam átomos de oxigênio no anel A, mas não no B, tendem a ter a banda II mais pronunciada que a I, como é possível visualizar na figura 15. Já os flavonóis com o grupo 3-hidroxila substituído (metilado ou glicosilado) possuem a banda I em 328-357 nm, semelhante aos compostos fenólicos, ou seja, com deslocamento da banda I para a região de absorção UVB (Figura 15) (ASSIMOS, 2014).

Figura 16 – Estrutura química de alguns flavonóides presentes na própolis.

Fonte: Mendonça, 2011.

Em trabalho realizado por Nascimento e colaboradores (2009) amostras de própolis verde da região de Minas Gerais apresentaram um ponto de absorção máxima em aproximadamente 290nm enquanto a própolis vermelha da região de Pernambuco apresentou uma absorção máxima em aproximadamente 280nm, semelhante o que foi observado em nos resultados deste trabalho. Ramos et al. (2010) demonstraram em amostras de própolis marrom obtidas do Rio de Janeiro apresentavam dois pontos máximos de absorção próximos a 240 e 290nm semelhante ao que foi observado nestes estudos.

Observou-se que o FPS da própolis vermelha é concentração dependente, melhor evidenciado para EHA e FMAP. Com isso, o FPS da FMAP na concentração de 1% foi 2,321 e o metoxicinamato de octila FPS 7,394, o que pode ser considerado um bom resultado se compararmos a FMAP ao padrão metoxicinamato de octila. A FMAP foi a que obteve melhor resultado fotoprotetor, seguido por FMP e EHA (Tabela 7).

Tabela 7 – Determinação do FPS *in vitro* das amostras de própolis vermelha e metoxicinamato de octila.

Concentração	EHA	FBP	FMP	FMAP	FAP	Metox*
0,1%	0,096 ± 0,002 ^a	0,076 ± 0,003 ^a	0,377 ± 0,008 ^b	0,345 ± 0,017 ^c	0,036 ± 0,003 ^d	2,019 ± 0,018 ^e
0,5%	0,561 ± 0,005 ^f	0,125 ± 0,004 ^g	0,630 ± 0,026 ^h	1,643 ± 0,032 ⁱ	0,109 ± 0,005 ^g	3,732 ± 0,035 ^j
1,0%	0,850 ± 0,013 ^k	0,760 ± 0,010 ^l	1,418 ± 0,018 ^m	2,321 ± 0,055 ⁿ	0,265 ± 0,022 ^o	7,394 ± 0,050 ^p

(Metox* = Metoxicinamato de octila)

Os valores dos dados obtidos estão expressos em média do FPS ± desvio padrão, aceitando um nível de significância com $p < 0,05$. Letras diferentes demonstram diferença significativa, letras iguais, não houve diferença significativa pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborada pelo autor

Amostras de própolis vermelha da região de Pernambuco apresentaram FPS de 2,2 a 2,4 para o extrato etanólico e glicólico na concentração de 5,0%. (NASCIMENTO et al. 2009). A própolis marrom apresentou um FPS de $1,04 \pm 0,10$ na concentração de 3% (RAMOS et al. 2010). Nestes estudos, na concentração de 1%, o FPS foi de 0,85 o que demonstra a superioridade do poder de fotoproteção.

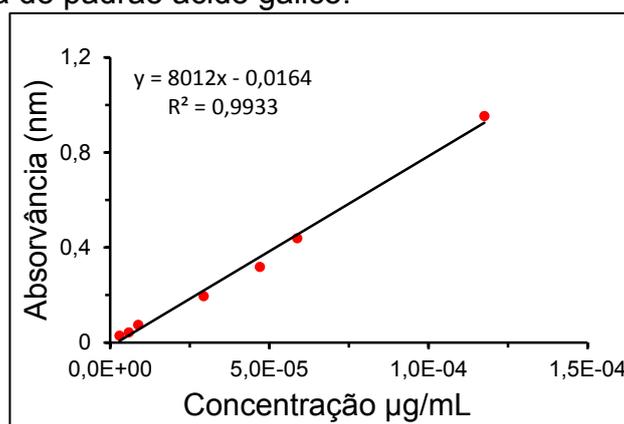
Como pela RDC 24/2011 (ANVISA) o FPS mínimo para um produto multifuncional é 2, a fração que atendia esse requisito foi a FMAP na concentração de 1%.

5.3.2 Atividade Antioxidante

I. Teor de Fenóis Totais

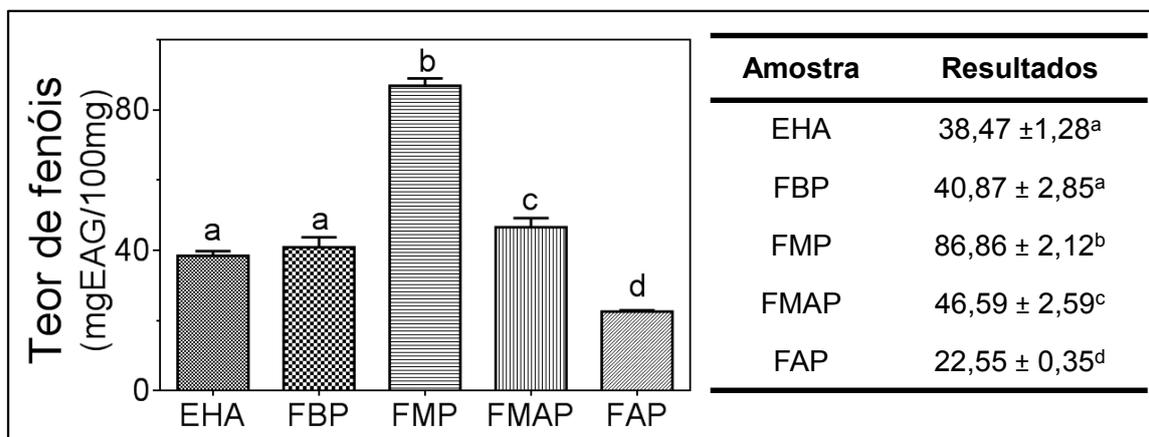
Obteve-se a curva do padrão ácido gálico e a equação da reta conforme mostrado na Figura 17. A partir desta, foi calculado o teor fenólico das amostras de própolis.

Figura 17 – Curva do padrão ácido gálico.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 18 – Teor de fenóis totais em mgEAG/100mg de extrato seco para os grupos experimentais.



Os valores dos dados obtidos estão expressos em média \pm desvio padrão, aceitando um nível de significância com $p < 0,05$. Letras diferentes demonstram diferença significativa, letras iguais, não houve diferença significativa pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborada pelo autor.

A FMP e FMAP foram as amostras que apresentaram maior conteúdo de fenóis totais. Isso demonstra que há compostos fenólicos de diferentes polaridades que foram separados pela técnica de fracionamento líquido-líquido. Cabral e colaboradores (2009) avaliaram o teor de compostos fenólicos em amostras de própolis vermelha e observaram que o extrato etanólico de própolis (EEP) apresentou um teor de 25,80mgEAG/100mg, sendo este valor abaixo do encontrado nestes estudos. A fração hexânica (fr-hex) apresentou um teor de compostos fenólicos estatisticamente menor (15,48mgEAG/mg) quando comparado ao teor da fração clorofórmica (fr-Clo) (24,98mgEAG/mg) e quando comparados com estes estudos todos os resultados mostraram-se inferior.

Kumazawa e colaboradores (2004) avaliaram a composição fenólica de própolis de diferentes lugares do mundo pelo método Folin-Ciocalteu. As amostras da África do Sul, Tailândia e Uzbequistão apresentaram baixos valores, 9,95; 3,12 e 17,46mg EAG/mg de própolis, respectivamente. Os fenóis totais da própolis brasileira coletada em Minas Gerais foi menor que o de duas amostras europeias, da Bulgária e Hungria e da china (12,0; 22,0; 24,2 e 29,8mg EAG/mg de própolis, respectivamente) apontando diferença entre a composição química da própolis brasileira das demais. Os principais componentes da

própolis brasileira são derivados prenilados do ácido p-cumárico, flavonoides não encontrados na própolis europeia.

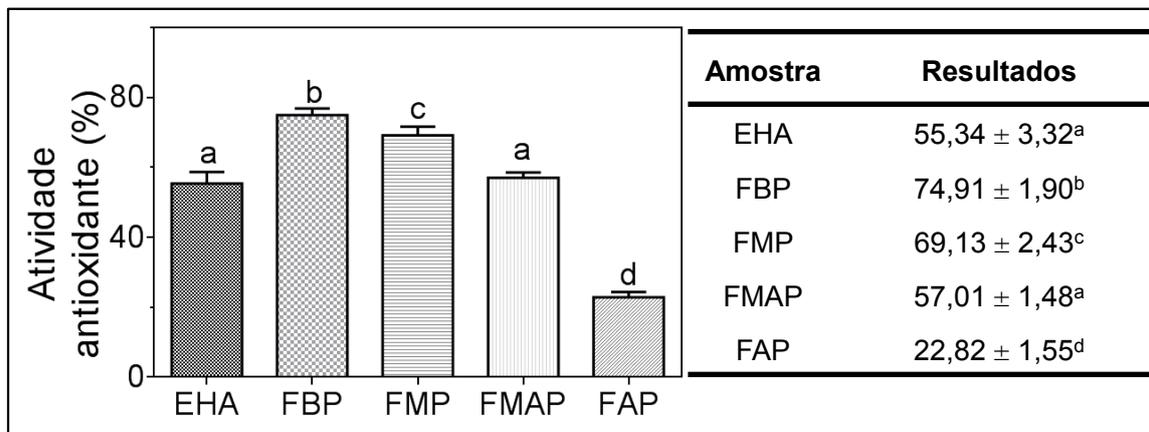
II. Atividade de Captura do Radical Livre DPPH

A fração de baixa polaridade e de média polaridade foram as que apresentaram melhor atividade de captura do radical DPPH o que indica a maior presença de compostos antioxidantes nessas frações. Nos estudos realizados por Cabral e colaboradores (2009), a fração hexânica apresentou maior atividade de sequestro do radical livre DPPH, 74,4%, semelhante aos resultados deste trabalho. Trusheva et al. (2006) isolaram compostos da própolis vermelha e verificaram que as benzofenas isopreniladas, substâncias de menor polaridade em relação aos isoflavonoides, apresentaram maior potencial antioxidante.

O EHA e FMAP foram semelhantes quanto à atividade antioxidante apresentando valores próximos a 56%. Kumazawa et al. (2004) avaliaram a atividade antioxidante pelo método do DPPH de extrato etanólico de própolis, na concentração de 20µg/mL, de diferentes lugares do mundo. Amostras da Austrália, China, Hungria e Nova Zelândia apresentaram atividade antioxidante com percentual próximo a 70%. A amostra brasileira utilizada no referido estudo foi coletada no estado de Minas Gerais e apresentou atividade antioxidante com percentual próximo a 40%, resultado este abaixo do valor encontrado em neste trabalho.

A FAP foi a que demonstrou possuir menor poder antioxidante com apenas 22,82% de capacidade de capturar o radical DPPH o que equivale a 30,46% do poder antioxidante da FBP (Figura 19).

Figura 19 – Capacidade de captura do radical DPPH para os grupos experimentais.



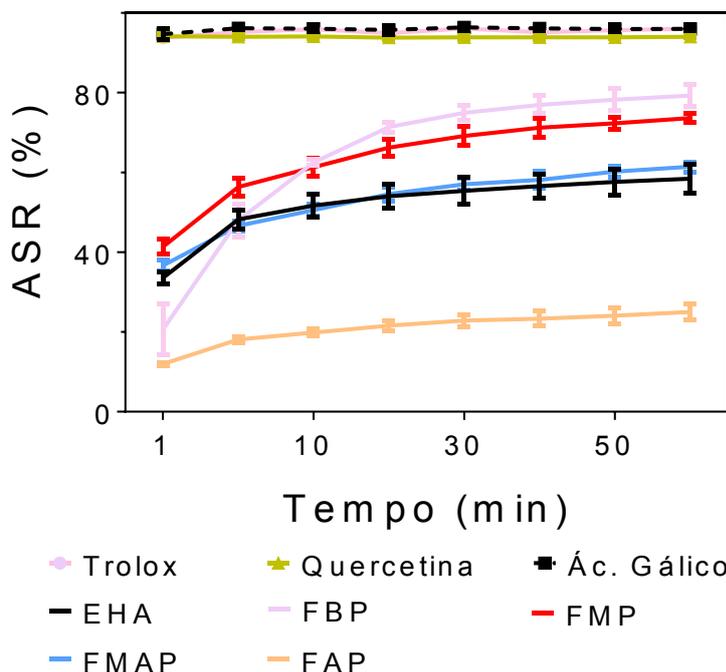
Os valores dos dados obtidos estão expressos em média \pm desvio padrão, aceitando um nível de significância com $p < 0,05$. Letras diferentes demonstram diferença significativa, letras iguais, não houve diferença significativa pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborada pelo autor.

Em relação à cinética, o EHA e frações (FBP, FMP e FMAP) apresentaram percentual de redução do radical DPPH semelhante até 20 minutos de reação. A partir daí FBP e FMP apresentaram vantagens em relação às demais. A FAP foi a que apresentou pior desempenho entre as amostras analisadas. Nota-se que nos primeiros cinco minutos a capacidade de capturar o DPPH vai elevando-se até estabilizar. Para FMAP e EHA não há modificação no decorrer do tempo, porém para FBP e FMP após 30 minutos a capacidade de capturar o radical é retomada elevando-se gradativamente até o final do tempo observado. Em experimentos realizados por Park et al. (2015) a capacidade de captura do DPPH por diversos tipos de própolis permaneceu, embora que lentamente, durante as 3 horas de observação. Como a escala de tempo de observação foi de uma hora não foi evidenciado esse comportamento inicial.

A FBP foi a amostra que apresentou melhor resultado, onde no tempo de 60 minutos aproxima-se de 80% na capacidade de captura do DPPH deixando-a próxima aos padrões ácido gálico, quercetina e Trolox. Já a FAP não conseguiu atingir nem 30% na capacidade de captura do DPPH (Figura 18).

Figura 20 – Cinética da atividade sequestradora do radical livre DPPH (ASR).



Os valores obtidos estão expressos em média \pm desvio padrão.

Fonte: elaborada pelo autor.

Dentre as amostras a FBP foi a que apresentou melhor resultado para CE_{50} , $15,68\mu\text{g/mL}$, demonstrando que foi a fração mais potente quanto à atividade antioxidante (Tabela 8).

Quando comparadas a CE_{50} dos padrões quercetina CE_{50} , $3,74\mu\text{g/mL}$, ácido gálico CE_{50} , $1,14\mu\text{g/mL}$ e Trolox CE_{50} , $4,09\mu\text{g/mL}$ notou-se que esses valores ficaram abaixo do observado para as amostras de própolis, ressaltando o maior poder antioxidante desses compostos. Este estudo corrobora com o trabalho realizado por Marquele-Oliveira et al. (2008) que avaliaram a atividade antioxidante da própolis verde e outros vegetais obtendo resultados semelhantes.

Amostras de própolis da Paraíba apresentaram menor atividade antioxidante que a própolis vermelha de Alagoas, onde a CE_{50} para extrato etanólico apresentou resultado $39,2\mu\text{g/mL}$, estando quase duas vezes mais acima dos valores observados em nestes estudos (SOUZA et al., 2014).

Tabela 8 – Determinação da CE_{50} para amostras de própolis vermelha.

Amostra	Equação	R^2	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
EHA	$y = 1,56x + 15,88$	0,9939	21,87
FBP	$y = 1,28x + 29,93$	0,9473	15,68
FMP	$y = 1,24x + 26,66$	0,9772	18,82
FMAP	$y = 1,33x + 20,47$	0,9702	22,20
FAP	$y = 0,58x + 10,83$	0,9891	67,53
Ac. Gálico	$y = 11,55x + 36,82$	0,9901	1,14
Trolox	$y = 8,87x + 13,65$	0,9811	4,09
Quercetina	$y = 8,44x + 18,44$	0,9350	3,74

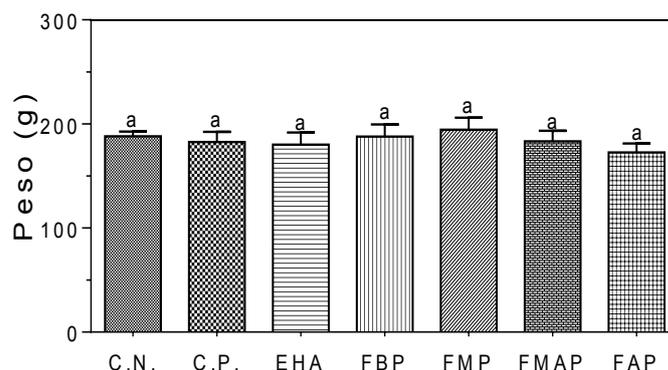
Fonte: elaborada pelo autor.

5.3.3 Atividade Cicatrizante

O peso dos animais foi o primeiro parâmetro observado durante a realização do experimento. Os resultados obtidos mostraram que os animais não perderam peso durante todo o período dos experimentos e que assim, nenhum dos tratamentos aplicados topicamente alterou de forma significativa este parâmetro. A variação média de peso por grupo pode ser observada na figura 21.

No estudo de cicatrização realizado por Santos et al. (2002), foi observado que houve redução no peso dos animais tratados com somatotropina no decorrer do experimento em todos os grupos experimentais, inclusive os do grupo controle que eram tratados apenas com água destilada. Fato semelhante ocorreu no trabalho de Batista et al. (2012), que avaliavam o uso tópico de própolis verde comparada com a própolis vermelha na reparação de feridas, onde os animais no início do estudo tiveram perda de peso, contudo no decorrer do experimento o peso foi reestabelecido. Esses estudos demonstram que provavelmente este modelo experimental pode alterar a massa corpórea dos animais, contudo não observamos esse efeito e pode-se, assim, dizer que a própolis vermelha de Alagoas não alterou significativamente o peso dos animais deste experimento.

Figura 21 – Peso médio dos animais utilizados nos experimentos.



C.N. : Controle negativo; C.P.: Controle positivo

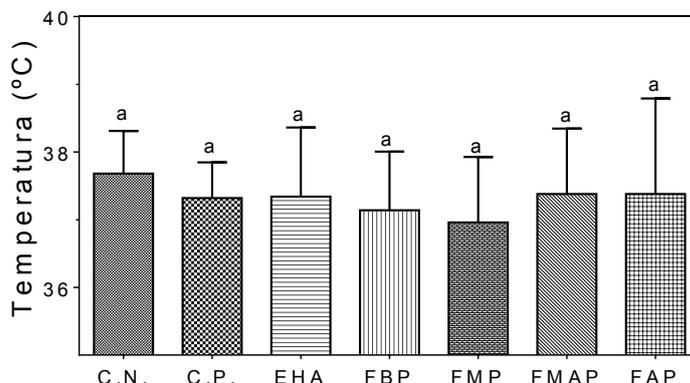
Os valores dos dados obtidos estão expressos em média \pm desvio padrão, aceitando um nível de significância com $p < 0,05$. Letras diferentes demonstram diferença significativa, letras iguais, não houve diferença significativa pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborada pelo autor

Ratos da linhagem *Wistar*, possuem temperatura corpórea em torno de $37,4 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ (HABICTH, 1981). Podemos observar que a temperatura corporal dos animais, em todos os grupos estudados, subiu discretamente durante o início do experimento, o que se pode atribuir este fato ao processo característico da fase inflamatória na cicatrização, visto que após este período os animais reestabeleceram a temperatura corpórea normal. Todavia, essa pequena oscilação na temperatura não foi significativa como podemos observar na figura 22.

Trabalhos realizados por Batista et al. (2012), mostraram que a temperatura corporal dos animais variava a depender do grupo em estudo, observando que os animais tratados com própolis obtiveram uma elevação na temperatura após o procedimento cirúrgico devido a atividade imunoestimulatória, mas que no decorrer do tempo havia uma normatização dessa temperatura semelhante a estes estudos. Dessa forma, os tratamentos à base de própolis vermelha de Alagoas não alteram de modo significativo e nem prejudicial à temperatura corporal de ratas da linhagem *Wistar*.

Figura 22 – Temperatura média dos animais para cada grupo durante o período experimental.



C.N. : Controle negativo; C.P.: Controle positivo

Os valores dos dados obtidos estão expressos em média \pm desvio padrão, aceitando um nível de significância com $p < 0,05$. Letras diferentes demonstram diferença significativa, letras iguais, não houve diferença significativa pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborada pelo autor

5.3.3.1 Análise Macroscópica

I. Área da Lesão

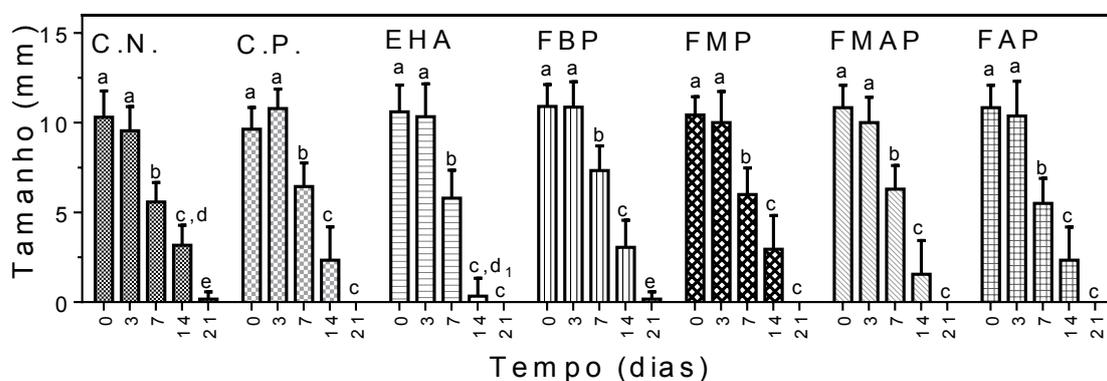
Observou-se que no 3º dia de experimentação não houve diminuição relevante no tamanho das lesões em nenhum dos grupos estudados. No 7º dia de experimentação notoriamente houve uma redução nas lesões em todos os grupos experimentais, contudo não houve diferença significativa entre os grupos tratados.

No 14º dia os animais apresentavam redução no tamanho das lesões onde o grupo EHA destacou-se, evidenciando melhor tratamento que o controle negativo e assemelhando-se ao controle positivo. Ao final do experimento, período correspondente ao 21º dia todos os animais apresentaram redução total das feridas, exceto a FBP e controle negativo. Assim, a FMAP assemelhou-se ao EHA quando analisada a capacidade de redução do tamanho da ferida (Figura 23).

Baracho et al. (2009) avaliaram a atividade cicatrizante do extrato de própolis em ratos diabéticos, observando que o grupo que recebeu tratamento com extrato hidroalcoólico de própolis, ao fim do experimento, apresentava

cicatrices menos profundas que as dos demais grupos, o que ocorreu de maneira semelhante em nos experimentos deste trabalho com a própolis vermelha de Alagoas. No trabalho realizado por Vieira et al. (2010), ficou evidenciado que a área das lesões nos ratos tratados com própolis a 20%, foi inferior, quando comparada aos resultados obtidos com os outros grupos experimentais, embora os testes estatísticos não tenham considerado os dados significantes.

Figura 23 – Medida das lesões dos animais experimentais separadas por grupos de tratamento.



C.N. : Controle negativo; C.P.: Controle positivo

Os valores dos dados obtidos estão expressos em média \pm desvio padrão, aceitando um nível de significância com $p < 0,05$. Letras diferentes demonstram diferença significativa, letras iguais, não houve diferença significativa pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborada pelo autor.

I. Crosta

No 3º dia pós cirúrgico 60% dos animais do grupo EHA e 40% do grupo FMAP apresentavam crosta sobre as feridas. A crosta possui um caráter benéfico no processo inicial de cicatrização, sendo uma barreira mecânica que protege a ferida (MENEZES, 2006). A partir do 7º dia de tratamento, período que compreende a fase proliferativa, a crosta foi evidenciada em todos os animais (Tabela 9).

Quando chegou o 14º dia pós-cirúrgico os animais pertencente ao grupo EHA apresentava regressão da crosta em 66,67% dos animais e FMAP

em 33,33% e já começavam a apresentar pele neoformada. Ao final do experimento, todos os animais apresentavam pele neoformada ou cicatriz, mostrando a contração da lesão e epitalização do local lesado com o desaparecimento da crosta.

Quando observamos o trabalho de Melo et al. (2007), que tratou feridas com luz *laser* percebemos que ocorreu aparecimento de crosta em todos os animais do experimento a partir do 3° dia, na avaliação realizada no 7° dia apenas os animais do grupo controle positivo apresentavam crosta mostrando que a formação de crosta é um parâmetro importante e evidenciando a ineficácia do tratamento utilizado.

II. **Necrose e exsudato**

A presença de tecido necrosado prolonga a fase inflamatória e contribui para proliferação de microrganismos, pode ser gerada por qualquer agente lesivo e o aspecto macroscópico varia de acordo com a causa (AZEVEDO et al. 2014). Durante o período experimental não foi observada a presença de necrose em nenhum dos grupos estudados o que corrobora que o tratamento tópico com a própolis vermelha de Alagoas não favoreceu ao surgimento de tecido necrótico (Tabela 9).

Aumento dos níveis de exsudato pode ser um sintoma de infecção e aumento do edema. E quanto maior o volume de exsudato, maior o risco de maceração da pele periferida (Disponível em: <http://www.coloplast.com.br/feridas_pele/topicos/condicoes/exsudato/> acesso em 27/07/2014). Todos os grupos tratados não apresentaram o surgimento de exsudatos.

III. **Inflamação e hemorragia**

No 3° dia pós-cirúrgico 20% dos animais pertencentes aos grupos controle negativo, FBP, FMAP e FAP, apresentaram reações inflamatórias nas

lesões, porém ela desapareceu nos dias seguintes. O processo inflamatório é considerado como meio de enfrentar a invasão de patógenos e envolve várias respostas como defesa, não sendo, necessariamente, um processo reacional de um tratamento (RANG;DALE, 2007).

Até o 3º dia de experimentação houve uma discreta hemorragia nos animais dos grupos FBP (25%), FMP (25%) e FMAP (50%) que desapareceu no decorrer do tempo. Este fato pode ter sido ocasionado pela remoção dos curativos que incidentalmente acabavam aderindo às lesões e o processo de remoção fazia com que pequenos pontos hemorrágicos surgissem.

Em estudos realizados por Menezes (2006) todas as lesões apresentavam aderência às compressas de gaze dificultando a retirada do curativo, explicando que esse processo de remoção causava trauma aos novos vasos formados no tecido de granulação que são rompidos facilmente em função do atrito com a gaze prolongando o período de cicatrização.

Após o 3º dia, não foram mais realizados curativos fechados e com isso não foi observado nenhum sinal de hemorragia, o que corrobora com Menezes (2006).

IV. Tecido de Granulação

O aparecimento do tecido de granulação é considerado como um bom sinal para a cicatrização. Ele é formado por tecido conjuntivo recém formado, intensamente vascularizado (AZEVEDO et al. 2014). Na primeira fase da cicatrização, 3º dia pós-cirúrgico, apenas os animais do grupo EHA e FMP apresentaram tecido de granulação. No 7º dia de experimentação o grupo FMAP apresentou melhor desempenho nesse item (Tabela 9).

Durante todo o experimento não foi observada a presença de tecido de granulação nos animais do grupo controle negativo e controle positivo, confirmando que o tratamento tópico com própolis vermelha de Alagoas melhora o processo de cicatrização, tornando-o vantajoso em relação ao processo de cicatrização natural e ao tratamento com dexpanthenol (Tabela 9).

Tabela 9 – Avaliação macroscópica das lesões. Intensidade dos achados em porcentagem.

		3° DIA			7° DIA			14° DIA			21° DIA		
		A	P	T	A	P	T	A	P	T	A	P	T
Crosta	C. Negativo	20	80	-	-	-	100	100	-	-	100	-	-
	C. Positivo	-	100	-	-	-	100	100	-	-	100	-	-
	EHA	40	60	-	-	50	50	66,67	-	33,33	100	-	-
	FBP	80	20	-	-	-	100	-	-	100	100	-	-
	FMP	40	60	-	-	25	75	66,67	-	33,33	100	-	-
	FMAP	60	40	-	-	-	100	33,33	-	66,67	100	-	-
	FAP	80	20	-	-	-	100	66,67	-	33,33	100	-	-
Necrose	C. Negativo	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-
	C. Positivo	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-
	EHA	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-
	FBP	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-
	FMP	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-
	FMAP	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-
	FAP	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-
Exsudato	C. Negativo	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-
	C. Positivo	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-
	EHA	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-
	FBP	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-
	FMP	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-
	FMAP	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-
	FAP	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-
Inflamação	C. Negativo	80	-	20	100	-	-	100	-	-	100	-	-
	C. Positivo	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-
	EHA	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-
	FBP	80	-	20	100	-	-	100	-	-	100	-	-
	FMP	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-
	FMAP	80	-	20	100	-	-	100	-	-	100	-	-
	FAP	80	-	20	100	-	-	100	-	-	100	-	-
Granulação	C. Negativo	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-
	C. Positivo	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-
	EHA	80	-	20	100	-	-	100	-	-	100	-	-
	FBP	100	-	-	75	-	25	100	-	-	100	-	-
	FMP	80	-	20	75	-	25	100	-	-	100	-	-
	FMAP	100	-	-	50	-	50	100	-	-	100	-	-
	FAP	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-
Hemorragia	C. Negativo	100	-	-									
	C. Positivo	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-
	EHA	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-
	FBP	75	-	25	100	-	-	100	-	-	100	-	-
	FMP	75	-	25	100	-	-	100	-	-	100	-	-
	FMAP	50	-	50	100	-	-	100	-	-	100	-	-
	FAP	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-

Legenda: A- ausente; P: parcial; T: total.

Fonte: elaborada pelo autor

5.3.3.2 Análise Microscópica

I. Primeira Biópsia

Quando analisados os achados histológicos no terceiro dia de experimentação, percebeu-se que todos os grupos experimentais apresentaram uma grande produção de fibrina, característico dessa fase devido à formação do coágulo.

No que diz respeito a infiltrados inflamatórios, todos os grupos enquadraram-se como moderados. Neste período os grupos apresentavam proliferação vascular discreta, necessária a neoformação de tecido. Com relação aos achados de células mono e polimorfonucleares, foi apresentado em todos os grupos um maior percentual em moderado fase onde essas células estão em grande atividade. Os grupos experimentais apresentaram discreta presença de fibroblastos, dando início ao processo de síntese da matriz extracelular (Tabela 10).

No trabalho realizado por Grégio et al. (2005), que utilizava dois grupos experimentais, um controle, tratado com solução fisiológica, e outro tratado com extrato hidroalcoólico de própolis obtida de arvores de Eucalipto do Paraná, observou-se que após dois dias ao processo cirúrgico foram encontradas lesões recobertas por material amorfo, com uma intensa produção de infiltrados inflamatórios com predomínio de células polimorfonucleadas e apresentava sinais de inflamação aguda. Esses dados diferenciam dos resultados obtidos em neste experimento em que no 3º dia apresentavam essas características em caráter moderado de produção, confirmando o melhor poder de cicatrização da própolis vermelha de Alagoas na fase inicial do processo de cicatrização.

II. Segunda Biópsia

No 7º dia pós cirúrgico foi encontrado uma produção de fibrina mais intensa em todos os grupos, com exceção do grupo controle positivo. A hemorragia também aumentou durante essa fase, resultado compatível com o aumento da hiperemia durante esse período. Observamos nesta fase, também,

uma diminuição na classificação do percentual de infiltrados inflamatórios, indicando a transição para a fase proliferativa do processo de cicatrização. Nesta fase ocorreu uma evolução na proliferação vascular, passando de discreta para intensa, correspondente a angiogênese necessária para oxigenação e chegada de células ao tecido que esta em formação.

Os achados histopatológicos das lesões encontrados por Grégio et al. (2005) após sete dias de cirurgia foram semelhantes a estes resultados. Revelavam que o tecido epitelial já estava reparado, apresentavam infiltrado inflamatórios de células mononucleadas em caráter variando de moderado a discreto para os animais tratados com própolis do Paraná, além de que os animais do grupo controle apresentavam infiltrados inflamatórios de caráter intenso.

Houve, também, um aumento no percentual de lesões que apresentavam fibroblastos, ratificando que foi dado início à fase proliferativa do processo de cicatrização, confirmada pelo aumento do percentual de hiperplasia epitelial em todos os grupos o que evidencia a reepitalização. O tecido de granulação reforça o início dessa fase, observando valores de caráter moderado variando de 66,67% a 100% para todos os grupos. Houve um aumento no percentual de fibras colágenas, nesta fase em todos os grupos experimentais que já apresentavam 100% de reepitelização, com destaque para o grupo EHA e FMAP (Tabela 10).

III. Terceira Biópsia

Com a terceira biópsia, ocorrida no 14° dia de experimentação, observamos que a fibrina estava praticamente ausente em todos os grupos experimentais, apenas o controle negativo ainda apresentava percentual de 100% na classificação discreto. Em todos os grupos houve um relevante desaparecimento dos achados hemorrágicos, chegando quase a ausência total, correspondente a diminuição na classificação percentual da hiperemia, onde apenas o controle negativo apresentava 100% de relevância para a classificação moderado. Nesta fase, também, houve uma diminuição na proliferação vascular,

fato esse que pode explicar a diminuição da hemorragia e da hiperemia local. Percebemos uma redução no percentual de células mono e polimorfonucleares nos achados e um aumento nos fibroblastos, mostrando que a lesão encontrava-se na fase de remodelagem tecidual. Foram encontrados 100% de reepitelização em todos os grupos, processo característico dessa fase, além de 100% de ausência de tecido necrótico (Tabela 10).

IV. **Quarta Biópsia**

Nesta fase os infiltrados inflamatórios eram praticamente ausentes em todos os grupos assim como células mono e polimorfonucleares que também se apresentavam ausentes em todos os grupos, exceto para controle negativo e FMP o que corrobora com as análises macroscópicas.

Tabela 10 – Avaliação microscópica das lesões. Intensidade dos achados em porcentagem.

		3º DIA				7º DIA				14º DIA				21º DIA			
		A	D	M	I	A	D	M	I	A	D	M	I	A	D	M	I
Fibrina	C. Negativo	-	33,33	-	66,67	33,33	-	-	66,67	-	100	-	-	66,67	33,33	-	-
	C. Positivo	33,33	-	-	66,67	-	-	66,67	33,33	100	-	-	-	100	-	-	-
	EHA	-	33,33	-	66,67	-	-	-	100	100	-	-	-	100	-	-	-
	FBP	-	-	-	100	-	-	-	100	66,67	-	33,33	-	100	-	-	-
	FMP	33,33	-	-	66,67	-	-	-	100	100				66,67	33,33		
	FMAP	-	-	-	100	-	-	-	100	100				100			
	FAP			33,33	66,67	33,33			66,67	100				100			
Hemorragia	C. Negativo	33,33	66,67	-	-	66,67	33,33	-	-		100	-	-	33,33	33,33	-	33,33
	C. Positivo	33,33	66,67	-	-	-	66,67	33,33	-	66,67	33,33	-	-	-	100	-	-
	EHA	-	33,33	66,67	-	-	66,67	33,33	-	100		-	-	100	-	-	-
	FBP	-	-	100	-	-	66,67	33,33	-	66,67	33,33	-	-	100	-	-	-
	FMP	33,33	33,33	33,33	-	-	33,33	66,67	-	66,67	33,33	-	-	-	33,33	66,67	-
	FMAP	-	33,33	66,67	-	-	-	100	-	66,67	33,33	-	-	66,67	33,33	-	-
	FAP	-	100	-	-	33,33	66,67	-	-	66,67	33,33	-	-	100		-	-
Hiperemia	C. Negativo	-	33,33	66,67	-	33,33	66,67	-	-	-	-	100	-	33,33	66,67	-	-
	C. Positivo	33,33	33,33	33,33	-	-	-	100	-	33,33	66,67	-	-	-	-	100	-
	EHA	-	33,33	66,67	-	-	66,67	33,33	-	33,33	66,67	-	-	66,67	33,33	-	-
	FBP	-	33,33	33,33	33,33	-	66,67	33,33	-	66,67	-	33,33	-	66,67	33,33	-	-
	FMP	33,33	66,67	-	-	-	100	-	-	66,67	-	33,33	-	-	100	-	-
	FMAP	-	-	100	-	-	33,33	66,67	-	66,67	33,33	-	-	66,67	33,33	-	-
	FAP	-	100	-	-	-	66,67	33,33	-	66,67	33,33	-	-	66,67	33,33	-	-
Infiltrados Inflamatórios	C. Negativo	-	33,33	66,67	-	-	66,67	33,33	-	100	-	-	-	66,67	33,33	-	-
	C. Positivo	-	-	100	-	-	100	-	-	-	100	-	-	100	-	-	-
	EHA	-	33,33	66,67	-	-	33,33	66,67	-	-	33,33	66,67	-	100	-	-	-
	FBP	-	-	100	-	-	33,33	66,67	-	33,33	33,33	33,33	-	100	-	-	-
	FMP	33,33	-	66,67	-	-	-	66,67	33,33	33,33	66,67	-	-	33,33	66,67	-	-
	FMAP	-	-	66,67	33,33	-	-	100	-	66,67	33,33	-	-	100	-	-	-
	FAP	-	-	100	-	-	100	-	-	-	100	-	-	66,67	33,33	-	-

Proliferação vascular	C. Negativo	-	66,67	33,33	-	-	-	66,67	33,33	-	-	100	-	-	66,67	33,33	-
	C. Positivo	-	66,67	33,33	-	-	-	33,33	66,67	-	66,67	33,33	-	-	-	100	-
	EHA	-	100	-	-	-	-	66,67	33,33	-	100	-	-	-	100	-	-
	FBP	-	100	-	-	-	-	100	-	33,33	66,67	-	-	-	100	-	-
	FMP	-	66,67	33,33	-	-	-	66,67	33,33	66,67	-	33,33	-	-	100	-	-
	FMAP	-	33,33	33,33	33,33	-	-	33,33	66,67	33,33	66,67	-	-	-	66,67	33,33	-
	FAP	-	100	-	-	-	33,33	66,67	-	-	100	-	-	-	33,33	66,67	-
Células mono e polimorfonucleares	C. Negativo	-	33,33	66,67	-	-	66,67	33,33	-	100	-	-	-	66,67	33,33	-	-
	C. Positivo	-	-	100	-	-	100	-	-	-	100	-	-	100	-	-	-
	EHA	-	33,33	66,67	-	-	-	100	-	33,33	66,67	-	-	100	-	-	-
	FBP	-	-	100	-	-	-	100	-	33,33	33,33	33,33	-	-	100	-	-
	FMP	33,33	-	66,67	-	-	-	66,67	33,33	33,33	66,67	-	-	33,33	66,67	-	-
	FMAP	-	-	100	-	-	-	100	-	66,67	33,33	-	-	100	-	-	-
	FAP	-	-	100	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-
Fibroblastos	C. Negativo	-	66,67	33,33	-	-	-	66,67	33,33	-	-	100	-	-	33,33	66,67	-
	C. Positivo	-	66,67	33,33	-	-	-	66,67	33,33	-	-	100	-	-	-	100	-
	EHA	-	100	-	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-
	FBP	-	66,67	33,33	-	-	-	100	-	33,33	-	66,67	-	-	-	100	-
	FMP	-	-	100	-	-	-	33,33	66,67	-	33,33	66,67	-	-	-	100	-
	FMAP	-	100	-	-	-	-	-	100	-	-	100	-	-	-	100	-
	FAP	-	33,33	66,67	-	-	33,33	33,33	33,33	-	-	100	-	-	33,33	66,67	-
Hiperplasia Epitelial	C. Negativo	66,67	33,33	-	-	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-	-
	C. Positivo	100	-	-	-	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-	-
	EHA	100	-	-	-	-	-	100	-	33,33	33,33	33,33	-	-	100	-	-
	FBP	66,67	33,33	-	-	-	-	100	-	100	-	-	-	33,33	66,67	-	-
	FMP	33,33	-	33,33	33,33	-	-	100	-	66,67	33,33	-	-	33,33	33,33	33,33	-
	FMAP	-	100	-	-	-	-	100	-	100	-	-	-	100	-	-	-
	FAP	-	100	-	-	33,33	-	66,67	-	66,67	33,33	-	-	-	-	-	-
Fibras Colágenas	C. Negativo	66,67	-	-	33,33	-	33,33	66,67	-	-	100	-	-	-	33,33	66,67	-
	C. Positivo	-	66,67	-	33,33	-	-	100	-	-	-	100	-	-	100	-	-
	EHA	-	66,67	33,33	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	100	-	-
	FBP	-	-	66,67	33,33	-	-	100	-	-	100	-	-	-	100	-	-
	FMP	-	33,33	66,67	-	-	33,33	33,33	33,33	-	33,33	66,67	-	-	100	-	-
	FMAP	-	100	-	-	-	-	100	-	-	100	-	-	-	33,33	66,67	-

	FAP	-	33,33	66,67	-	-	66,67	33,33	-	-	100	-	-	-	-	-	
Reepitelização	C. Negativo	66,67	-	-	33,33	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100
	C. Positivo	66,67	-	-	33,33	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100
	EHA	100	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100
	FBP	100	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100
	FMP	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100
	FMAP	33,33	-	-	66,67	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100
	FAP	33,33	-	-	66,67	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100
Necrose	C. Negativo	33,33	-	-	66,67	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-
	C. Positivo	33,33	-	-	66,67	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-
	EHA	66,67	-	-	33,33	-	-	-	100	100	-	-	-	100	-	-	-
	FBP	-	-	-	100	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-
	FMP	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-
	FMAP	-	-	-	100	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-
	FAP	-	-	-	100	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-

Legenda: A: ausente; D: discreto; M: moderado; I: intenso.

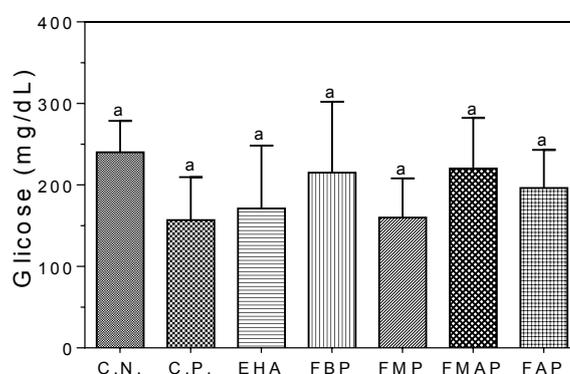
Fonte: elaborada pelo autor

5.3.4 Perfil Bioquímico e Hormonal

I. Glicemia

Não houve diferença significativa entre os grupos para dosagem de glicose sérica no decorrer do experimento, demonstrando que a própolis aplicada topicamente não altera esse parâmetro. Esse dado é ratificado por Baracho et al. (2009) que tratou feridas de ratos diabéticos com própolis obtendo resultados superiores aos dos controles utilizados (Figura 24).

Figura 24 – Glicose sérica para os grupos experimentais.



C.N. : Controle negativo; C.P.: Controle positivo

Os valores dos dados obtidos estão expressos em média \pm desvio padrão, aceitando um nível de significância com $p < 0,05$. Letras diferentes demonstram diferença significativa, letras iguais, não houve diferença significativa pelo teste de Tukey.

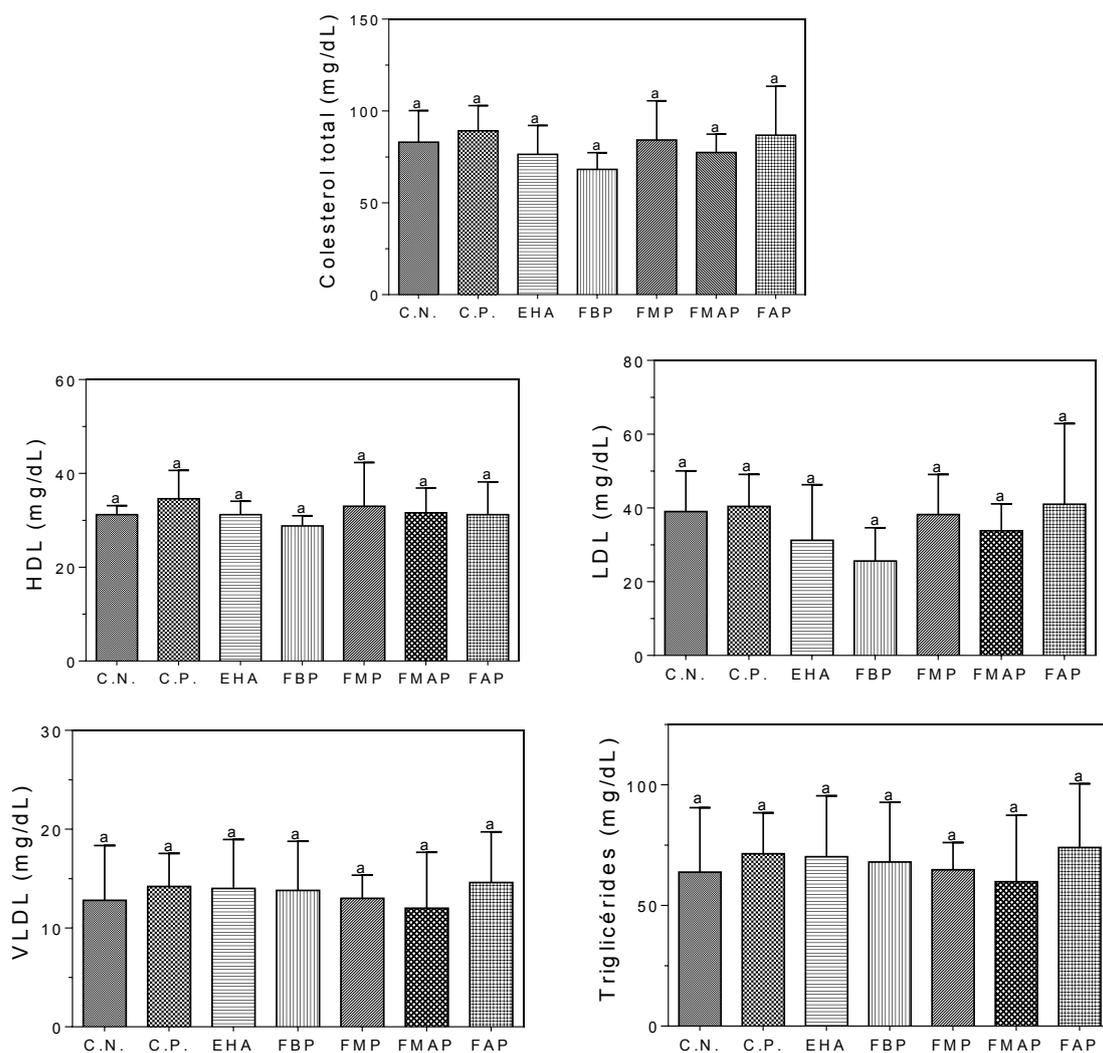
Fonte: elaborada pelo autor.

II. Lipidograma

A elevação dos níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL), a redução da lipoproteína de alta densidade (HDL) e também o aumento dos níveis de triglicérides, são importantes fatores de risco para o desenvolvimento de eventos cardiovasculares, aumentando o risco de morte (MAGALHÃES et al. 2004). O uso da própolis vermelha na forma tópica mostrou ser seguro quanto ao perfil lipídico, não havendo elevação nos níveis de colesterol, de LDL e de triglicérides. Também não houve diminuição do HDL. (Figura 25). Em estudos utilizando leitosa-do-amazonas (*Synadenium umbellatum* Pax) e cipó-cruz

(*Chiococca alba* (L.) Hitchc) foram observadas alterações significativas quanto às dosagens de colesterol nos grupos tratados, demonstrando uma maior segurança quanto ao uso da própolis vermelha sobre esse parâmetro (CUNHA et al. 2009; RODRIGUES et al. 2006).

Figura 25 – Concentrações séricas de colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicérides para os grupos experimentais.



C.N. : Controle negativo; C.P.: Controle positivo

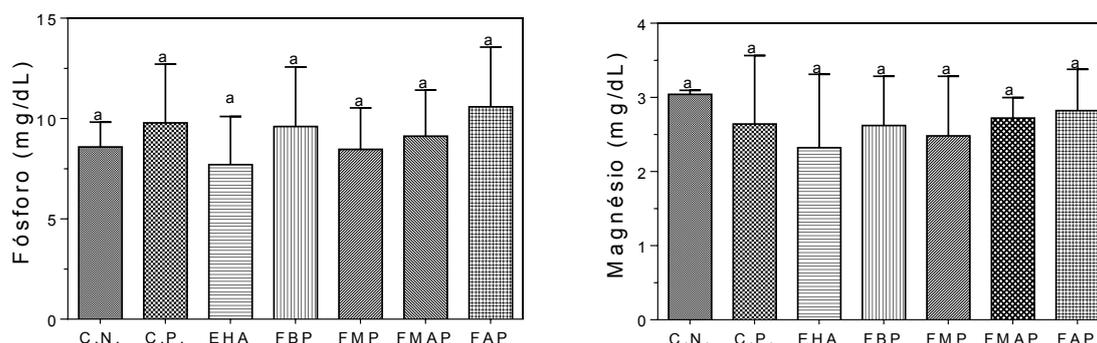
Os valores dos dados obtidos estão expressos em média \pm desvio padrão, aceitando um nível de significância com $p < 0,05$. Letras diferentes demonstram diferença significativa, letras iguais, não houve diferença significativa pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborada pelo autor.

III. Concentração de Íons

O uso tópico de própolis vermelha não causou alterações significativas nas concentrações fósforo e magnésio (Figura 26). As principais funções do fósforo estão relacionadas com a mineralização óssea e dos dentes, mas também participa do metabolismo energético. Além disso, é importante na absorção e no transporte de nutrientes, na regulação da atividade proteica e no balanço ácido-básico. Já o magnésio sérico atua como um cofator essencial para enzimas ligadas à respiração celular, glicólise e transporte transmembrana de outros cátions (cálcio e sódio), sendo encontrado em todos os tecidos. O magnésio é essencial para a preservação da estrutura molecular de DNA, RNA e ribossomos (OLIVEIRA, 2007).

Figura 26 – Concentrações séricas de magnésio e fósforo para os grupos experimentais.



C.N. : Controle negativo; C.P.: Controle positivo

Os valores dos dados obtidos estão expressos em média \pm desvio padrão, aceitando um nível de significância com $p < 0,05$. Letras diferentes demonstram diferença significativa, letras iguais, não houve diferença significativa pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborada pelo autor.

IV. Avaliação Renal

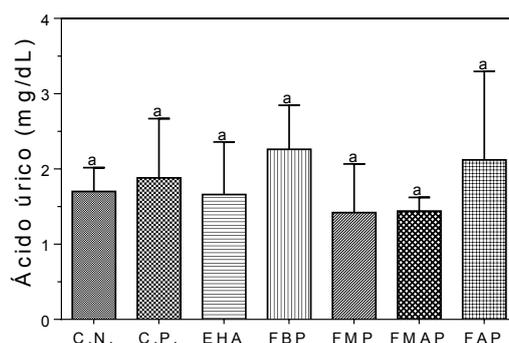
O uso tópico da própolis vermelha durante o experimento não provocou alterações significativas nas concentrações de ácido úrico, ureia e creatinina entre os grupos (Figura 27). Segundo Vijayalakshmi; Muthulakshmi; Sachadanandam

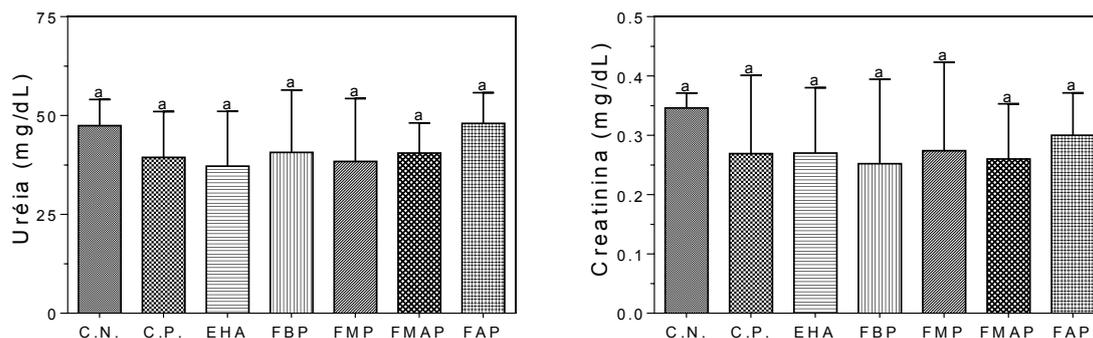
(2009) um aumento nos níveis séricos de ureia e creatinina fornecem indícios de sobre carga renal, insuficiência renal aguda, ou ainda, um aumento do catabolismo protéico.

Estudo realizado por Silva et al. (2010) onde foi avaliado o perfil bioquímico em ratas após uso do extrato de *Ginko biloba* revelou que nos grupos tratados com *Ginko biloba* nas doses de 7 e 14mg/kg/dia do 8º ao 21º dia apresentaram aumento significativo dos níveis de ureia em relação ao grupo controle. Em outro estudo realizado por Silva et al. (2005) com extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* sobre os parâmetros bioquímicos, foi verificada alteração significativa entre os níveis de ureia no grupo tratado com a maior dose do extrato (1,0g/kg) podendo ser inicialmente interpretada como uma alteração renal.

Coqueiro et al. (2012) realizou um estudo com chá de orégano sobre o perfil bioquímico de ratos Wistar, observando após o uso que ocorreu a elevação dos valores médios de creatinina no grupo experimental com diferença significativa do grupo controle.

Figura 27 – Concentrações séricas de ácido úrico, ureia e creatinina para os grupos experimentais.





C.N. : Controle negativo; C.P.: Controle positivo

Os valores dos dados obtidos estão expressos em média \pm desvio padrão, aceitando um nível de significância com $p < 0,05$. Letras diferentes demonstram diferença significativa, letras iguais, não houve diferença significativa pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborada pelo autor.

V. Avaliação Hepática

O uso tópico de própolis vermelha não alterou significativamente as concentrações das proteínas totais e albumina (Figura 28), não causando dano ao metabolismo protéico. As proteínas constituem a parte estrutural da maior parte dos órgãos e formam as enzimas e hormônios que regulam o funcionamento do organismo. Alterações nas concentrações de proteínas totais e albumina indicam a presença de alteração no catabolismo protéico, desequilíbrio na manutenção da pressão osmótica e falha no transporte e armazenamento de substâncias (MOTTA, 2009).

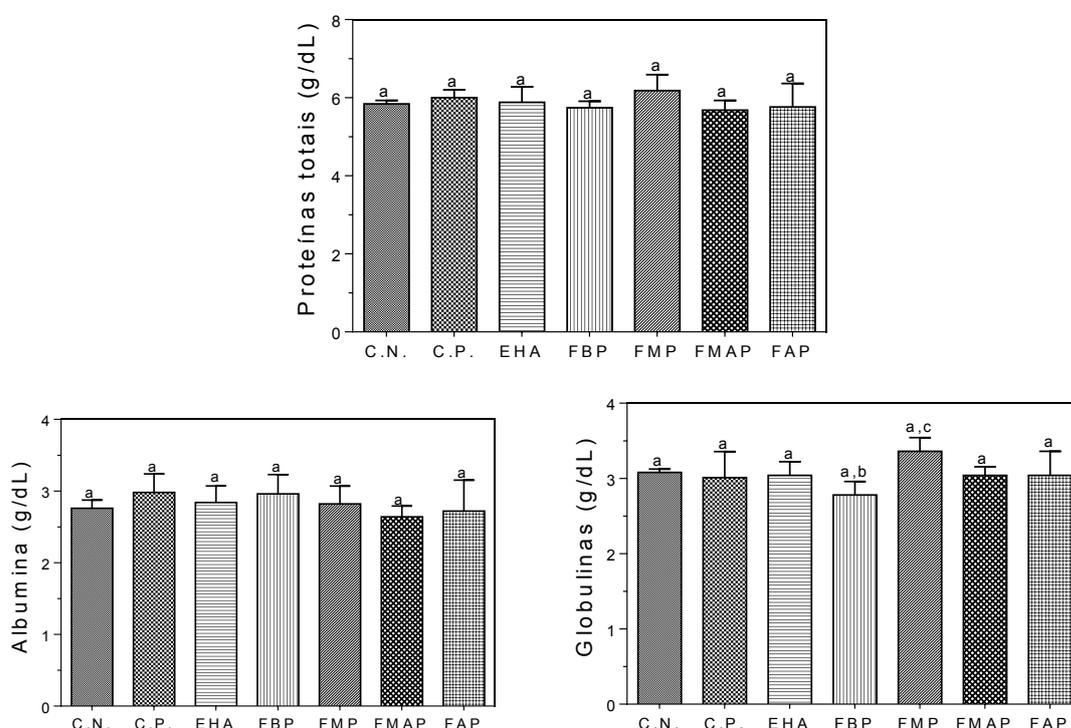
No sangue encontram-se duas classes de proteínas, a albumina e as globulinas. A albumina é transportador de moléculas e controladora da pressão osmótica. As globulinas incluem enzimas, anticorpos e mais de 500 outras proteínas.

Quanto à concentração sérica de Globulina foi observada uma diferença significativa entre dois grupos tratados, a FBP e FMP. Contudo, esses grupos não diferiram dos grupos controles, levando-nos a conclusão de que o tratamento tópico com essas frações não altera significativamente os níveis de globulina

(Figura 28). Ainda podemos considerar uma tendência no grupo tratado com a FMP para elevar os níveis de globulinas o que necessita de maiores estudos.

Destarte, o uso tópico da própolis vermelha de Alagoas como agente cicatrizante de feridas tópicas continua sendo um produto seguro, visto que não houve alterações significativas das concentrações séricas de globulina comparando com os controles.

Figura 28 – Concentrações séricas de proteínas totais, albumina e globulina para os grupos experimentais.



C.N. : Controle negativo; C.P.: Controle positivo

Os valores dos dados obtidos estão expressos em média \pm desvio padrão, aceitando um nível de significância com $p < 0,05$. Letras diferentes demonstram diferença significativa, letras iguais, não houve diferença significativa pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborada pelo autor.

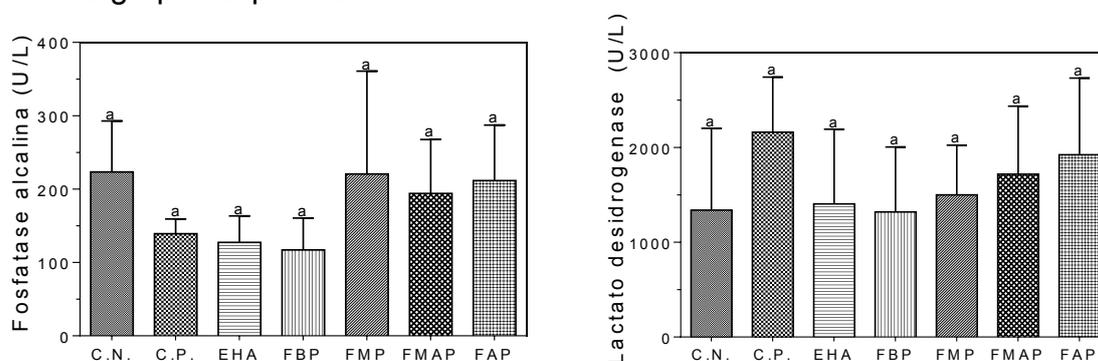
Assim como alterações na concentração de ALT e AST, a alteração na concentração de fosfatase alcalina (FA) é também um importante indicador de lesão nos hepatócitos, sua dosagem permite averiguar desordens colestáticas,

pois normalmente uma lesão no hepatócito está associada normalmente a certo grau de colestase, uma vez que os canalículos biliares podem ficar obstruídos em consequência da dilatação das células hepáticas. Já o LDH se encontra amplamente distribuída em todas as células do organismo, concentrando-se mais especificamente no miocárdio, rim, fígado, hemácias e músculos. Seus valores se elevam em todas as situações em que ocorre grande destruição celular, indicando processo de hemólise (MOTTA, 2009).

Em um estudo desenvolvido por Botelho et al. (2011) sobre o efeito de altas doses de copaíba nos níveis de enzimas hepáticas no soro de ratos foi observado que após administração do óleo da copaíba ocorreu o aumento significativo da fosfatase alcalina, seu nível estava 30 vezes mais elevado em comparação ao grupo controle.

O tratamento tópico com própolis vermelha não alterou significativamente as concentrações de FA e LDH (Figura 29).

Figura 29 – Concentrações séricas de fosfatase alcalina e lactato desidrogenase para os grupos experimentais.



C.N. : Controle negativo; C.P.: Controle positivo

Os valores dos dados obtidos estão expressos em média \pm desvio padrão, aceitando um nível de significância com $p < 0,05$. Letras diferentes demonstram diferença significativa, letras iguais, não houve diferença significativa pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborada pelo autor.

O grupo experimental tratado com FAP apresentou alteração nos níveis de ALT e AST. O nível sérico de ALT apresentou elevado quando comparado com todos os outros grupos experimentais, já os níveis de AST mostrou-se elevado quando comparado com EHA, FBP e FMP (Figura 30).

Alterações causadas nas concentrações das enzimas aminotransferases séricas (ALT e AST) são importantes indicadores de lesões nas células hepáticas, o que leva a indícios de alteração na função hepática. Vale ressaltar que a ALT é um indicador mais sensível de hepatotoxicidade do que a AST, pois sabemos que AST existe em todos os tecidos corporais, especialmente no coração, fígado, músculo esquelético, rins, cérebro, pâncreas, leucócitos, eritrócitos, já a ALT é encontrada primariamente no fígado, e uma pequena quantidade no rim e no coração. Estas enzimas são liberadas no sangue em grandes quantidades quando há dano à membrana do hepatócito em consequência de um aumento na permeabilidade (LAB REDE, 2014).

Portanto, os resultados obtidos neste experimento sugere que a FAP causa alteração na permeabilidade dos hepatócitos em consequência do aumento dos níveis de ALT e AST neste grupo, seus valores ficaram bem acima dos níveis de referência para a espécie, que é em média 52U/L para o ALT e 80U/L para o AST, segundo valores do biotério da UFPA (DINIZ et al., 2006) e nestes estudos foi observado uma concentração média de 83,4 U/L para o ALT e 347 U/L para o AST.

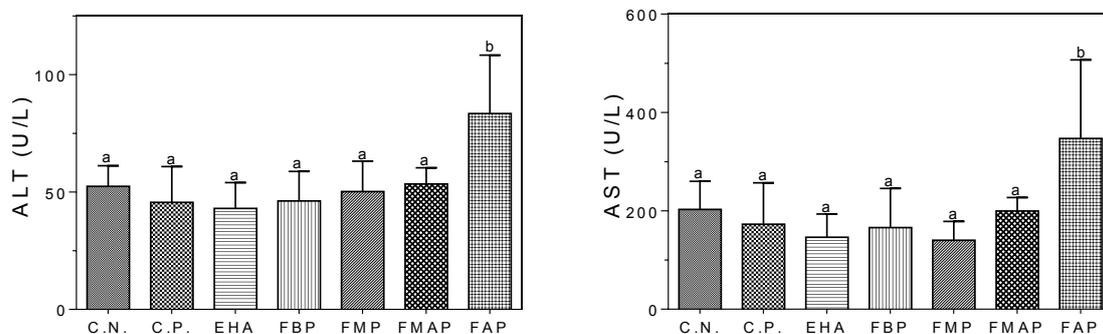
Embora os resultados de AST estivessem acima dos valores de referência propostos por Diniz et al. (2006) todos os grupos experimentais apresentaram concentrações de AST estatisticamente iguais aos controles, onde apenas o grupo experimental FAP variou significativamente. Essa elevação pode ser atribuída ao fato de que essa enzima encontra-se em maiores concentrações no tecido hepático e no tecido cardíaco e o método utilizado para sacrifício dos animais, a punção cardíaca, pode ter contribuído para elevação dos níveis de AST em todos os grupos experimentais (MOTTA, 2009).

Em estudo realizado por Silva et al. (2005) avaliando o tratamento subcrônico com extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* L. sobre os parâmetros bioquímicos em ratas Wistar, foi observado que ocorria o aumento de ALT nas doses de 0,25, 0,5 e 1,0g/Kg quando comparado ao grupo controle após um tratamento de 30 dias, indicando uma possível sobrecarga hepática.

Analisando o grupo FAP na sequência de dias de tratamento (3º, 7º, 14º e 21º), podemos observar a elevação de ALT e AST para este grupo em relação ao controle (Figura 31). No gráfico onde mostra as dosagens de ALT do grupo FAP percebe-se a elevação dos níveis no decorrer do tratamento, tendo um pico no 14º dia. Já o AST também apresentou aumento nos níveis com os dias de tratamento, com dois picos no 3º e 14º dia.

A formulação produzida com a FAP foi a única que alterou os níveis de ALT e AST, sendo, portanto a menos indicada para o uso tópico, pois pode oferecer risco hepático, sendo necessários maiores estudos para a confirmação desse potencial tóxico.

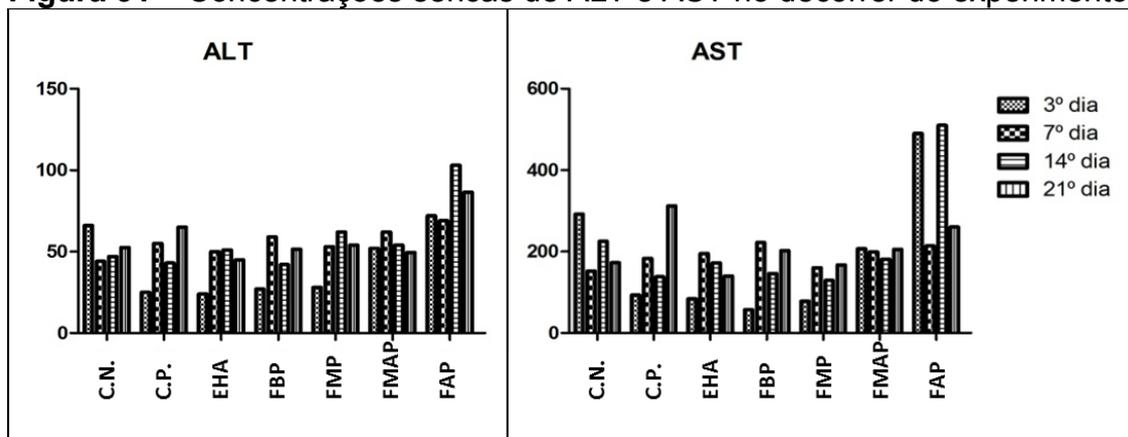
Figura 30 - Concentrações séricas de ALT e AST para os grupos experimentais.



C.N. : Controle negativo; C.P.: Controle positivo

Os valores dos dados obtidos estão expressos em média \pm desvio padrão, aceitando um nível de significância com $p < 0,05$. Letras diferentes demonstram diferença significativa, letras iguais, não houve diferença significativa pelo teste de Tukey.

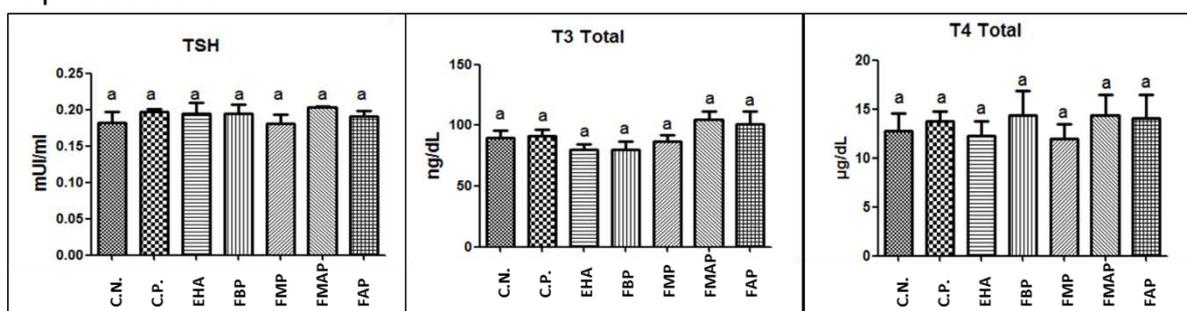
Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 31 – Concentrações séricas de ALT e AST no decorrer do experimento.

Fonte: elaborada pelo autor

VI. Hormônios Tiroideanos

O tratamento com a própolis vermelha de Alagoas não afetou significativamente os resultados do hormônio TSH, apresentando valores próximo a 0,18mUI/mL durante o tempo experimental. Embora os valores de T3 total apresentasse uma maior oscilação, os valores não diferiram significativamente. Resultado semelhante também foi observado com o hormônio T4 total. (Figura 32).

Figura 32 – Concentrações séricas de TSH, T3 total e T4 total para os grupos experimentais.

C.N. : Controle negativo; C.P.: Controle positivo

Os valores dos dados obtidos estão expressos em média \pm desvio padrão, aceitando um nível de significância com $p < 0,05$. Letras diferentes demonstram diferença significativa, letras iguais, não houve diferença significativa pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborada pelo autor.

A literatura mostra que os hormônios tireoidianos podem variar conforme o uso de medicamentos tais como carbamazepina e oxycarbazepina (ROCHA et al. 2006). Estudos realizados nos EUA mostram que outros fármacos como Amiodarona, alteram a liberação de hormônios tireoidianos, causando tanto hipotireoidismo quanto hipertireoidismo, variando conforme sua utilização e histórico familiar (PAVAN et al. 2004). A tireotoxicose causada por esses medicamentos ainda não está completamente esclarecida, mas sabe-se que tem correlação direta com a dose administrada.

Os níveis não alterados dos hormônios tireoidianos após os 21 dias de tratamento com a própolis vermelha de Alagoas indica que as substâncias presentes não são capazes de causar tireotoxicose, assim como foi observado nos trabalhos realizados por Moraes e Amorim et al. (2006) onde observaram a influência de somatotrofina em caprinos não encontrando variação nos níveis de T4, assim como nos estudos realizados Rocha et al. (2006) onde a utilização de ácido valpróico, também, não causou alterações nos hormônios tireoidianos.

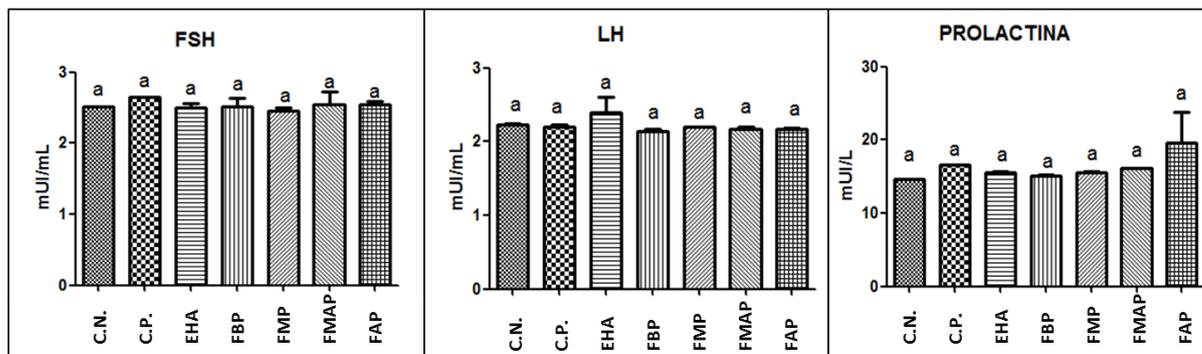
VII. Hormônios Hipofisários

Observando o hormônio FSH percebemos que as concentrações mantiveram-se praticamente iguais para todos os grupos o que fez com que não houvesse variação significativa. Para os valores de LH também observamos algo semelhante, onde apenas o EHA apresentou uma pequena variação, entretanto essa variação não foi suficiente para diferir significativamente dos outros grupos tratados, com isso os valores de LH foram semelhantes entre os grupos assim como os valores de FSH foram (Figura 33).

Quando observamos os valores de prolactina para o grupo FAP notamos que este grupo ocasionou uma pequena elevação nesse hormônio. Embora não tenha sido significativa, uma maior atenção deve ser dada, visto que este mesmo grupo é capaz de elevar enzimas hepáticas tornando-o um tratamento que deverá

ser rigorosamente monitorado, necessitando, inclusive, estudos mais aprofundados.

Figura 33 – Concentrações séricas de FSH, LH e prolactina para os grupos experimentais.



C.N. : Controle negativo; C.P.: Controle positivo

Os valores dos dados obtidos estão expressos em média \pm desvio padrão, aceitando um nível de significância com $p < 0,05$. Letras diferentes demonstram diferença significativa, letras iguais, não houve diferença significativa pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborada pelo autor.

5.3.5 Atividade Antimicrobiana

Para essas análises foram utilizadas as somente o EHA e a FMAP.

I. Concentração Inibitória Mínima – CIM

Ao analisar a CIM do EHA e fração de própolis vermelha de Alagoas foi observado que os valores obtidos para EHA foram semelhantes aos obtidos para FMAP, exceto *Staphylococcus aureus*, onde foi obtido CIM para EHA fluido de 0,07% (0,70mg/mL) muito menor que a CIM da FMAP de 2,5% (25,00mg/mL), o que demonstra uma redução do potencial inibitório da FMAP frente a esse microrganismo. Já com a *Candida albicans* foi observado o oposto, a CIM para EHA de 1,25% (12,50mg/mL) maior que a CIM da FMAP de 0,15% (1,50mg/mL), o que demonstra um aumento do potencial inibitório da FMAP frente a *C. albicans* (Tabela 11).

Amostras de própolis de São Paulo apresentaram CIM de 3,0mg/mL, de Santa Catarina 15,0mg/mL e do Rio Grande do Norte 18,0mg/mL quando analisado o extrato etanólico para *S. aureus* enquanto que em nestes estudos o EHA apresentou CIM de 0,70mg/mL. Para *E. coli* as CIMs foram respectivamente 85,0mg/mL, 82,0mg/mL e 70,0mg/mL e nestes estudos 3,00mg/mL comprovando maior atividade antimicrobiana da própolis alagoana (FERNANDES JR et al. 2006).

Tabela 11 – Concentração Inibitória Mínima do EHA e fração de própolis vermelha de Alagoas.

Microrganismos	EHA	FMAP
Gram-positivos		
<i>S. aureus</i>	0.07% (0.70mg/mL)	2.50% (25,00mg/mL)
<i>S. epidermidis</i>	0.15% (1.50mg/mL)	0.07% (0.70mg/mL)
Gram-negativos		
<i>K. pneumoniae</i>	0,15% (1,50mg/mL)	0,07% (0,70mg/mL)
<i>S. flexneri</i>	0,07% (0,70mg/mL)	0,07% (0,70mg/mL)
<i>E. coli</i>	0,30% (3,00mg/mL)	0,15% (1,50mg/mL)
<i>S. entérica</i>	0,07% (0,70mg/mL)	0,07% (0,70mg/mL)
<i>P. aeruginosa</i>	0,30% (3,00mg/mL)	0,30% (3,00mg/mL)
Fungo		
<i>C. albicans</i>	1.25% (12.50mg/mL)	0.15% (1.50mg/mL)

Fonte: elaborada pelo autor.

II. Concentração Bactericida Mínima – CBM

Quanto à CBM foi notado que para todas as amostras houve uma elevação na concentração quando comparamos à CIM. Isso revela que a Própolis

Vermelha de Alagoas possui melhor poder bacteriostático que bactericida, já que houve um aumento no valor para que a ação bactericida pudesse ser evidenciada.

Assim, preparações para serem consideradas bactericidas deverão apresentar concentração acima de 1,25% (12,5mg/mL), já preparações para serem consideradas bacteriostáticas deverão ter no mínimo 0,03% (0,3mg/mL).

Tabela 12 – Concentração Bactericida Mínima do EHA e fração de própolis vermelha de Alagoas.

Microrganismos	EHA	FMAP
Gram-positivos		
<i>S. aureus</i>	5,00% (50,00mg/mL)	2.50% (25,00mg/mL)
<i>S. epidermidis</i>	1.25% (12.50mg/mL)	1.25% (12.50mg/mL)
Gram-negativos		
<i>K. pneumoniae</i>	5,00% (50,00mg/mL)	10,00% (100,00mg/mL)
<i>S. flexneri</i>	0.62% (6.20mg/mL)	5,00% (50,00mg/mL)
<i>E. coli</i>	10,00% (100,00mg/mL)	10,00% (100,00mg/mL)
<i>S. entérica</i>	5,00% (50,00mg/mL)	2.50% (25,00mg/mL)
<i>P. aeruginosa</i>	(>10,00%) (>100,00mg/mL)	2.50% (25,00mg/mL)
Fungo		
<i>C. albicans</i>	5,00 (50,00mg/mL)	10,00 (100,00mg/mL)

Concentração máxima testada de 10,00% (100,00mg/mL).

Fonte: elaborada pelo autor.

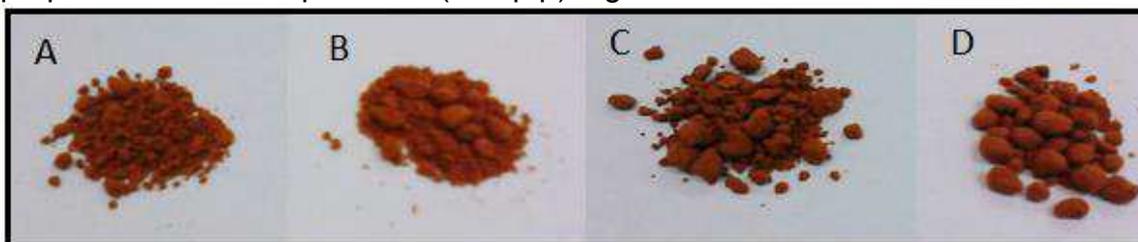
5.4 Obtenção das Micropartículas

I. Própolis com Quitosana

Observou-se compatibilidade em todas as concentrações analisadas entre a própolis vermelha de Alagoas solubilizada em etanol e a quitosana solubilizada em ácido acético. Dessa forma, preferiu-se optar pela solução própolis:quitosana (10:1p/p) em solução etanólica por oferecer um maior teor da própolis vermelha.

Os pós A, B, C e D, obtidos com EHA, apresentaram coloração vermelho alaranjado e baixa densidade. Além disso, a higroscopicidade dos pós fez com que eles se aglomerassem, embora essa característica não tenha afetado a espalhabilidade do microparticulado (Figura 34). A FMAP, na concentração de 10:1, própolis:QUI, também apresentou características semelhantes às observadas com o EHA.

Figura 34 – (A) Micropartículas de própolis vermelha + quitosana (10:1p/p); (B) Micropartículas de própolis vermelha + quitosana (10:1p/p) + glutaraldeído; (C) Micropartículas de própolis vermelha + quitosana (10:2p/p); (D) Micropartículas de própolis vermelha + quitosana (10:2p/p) + glutaraldeído.



Fonte: elaborada pelo autor.

II. Própolis com Alginato

O alginato de sódio é muito solúvel em água e forma soluções viscosas estáveis na faixa de pH de 5,0 a 10,0 (HOU et al. 2006). As soluções etanólicas de EHA e FMAP apresentaram pH de $5,6 \pm 0,3$. Ao tentar a incorporação dessas duas soluções não houve compatibilidade, a solução etanólica de própolis ao

entrar em contato com a solução aquosa de alginato favorecia a precipitação da mistura, tornando esse produto inviável para a secagem em *Spray Dryer* (Figura 35). A precipitação do alginato pelos álcoois já está descrito em literatura, mesmo em baixas concentrações o etanol já é suficiente para desestabilizar a rede polimérica do alginato (WANG et al. 2010).

Figura 35 – Gel de alginato com solução etanólica de própolis vermelha.



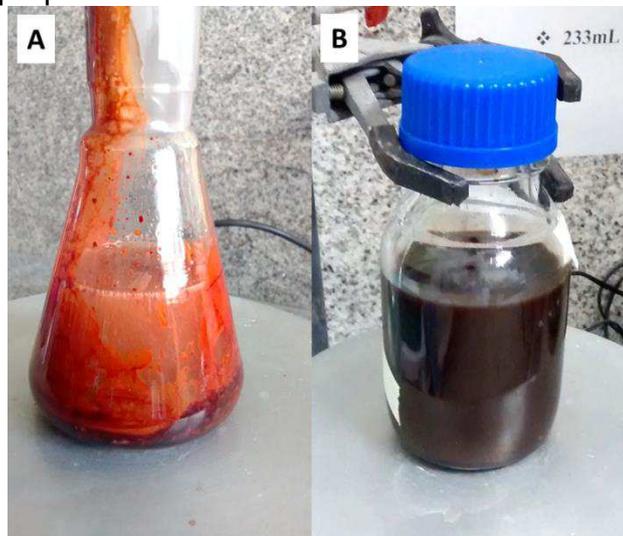
Fonte: elaborada pelo autor.

Devido à baixa solubilidade da própolis vermelha em outros tipos de solventes, que não voláteis, optou-se por aquecer a solução de alginato a 45,0°C e alcalinizar o meio, pH 8,0 ± 0,5, na tentativa de forçar a incorporação ao polímero. A incorporação à quente não gerou bons resultados, pois, embora tenha melhorado a solubilização, formava uma suspensão que impregnava de própolis as paredes do recipiente, resultando em perda de material. Já a incorporação à quente em meio básico gerou uma melhor incorporação da própolis vermelha ao alginato, já não observando processo de precipitação ou acúmulo de material nas paredes do recipiente (Figura 36).

Os flavonoides podem sofrer degradação em meio alcalino, por serem ácidos fracos e, como são substâncias polares ou moderadamente polares, são solúveis em etanol, metanol e butanol e combinações de solventes com água (NUNES et al. 2012). Ficou evidente que a incorporação da própolis vermelha em

meio básico resultou em um escurecimento na solução, o que possivelmente estaria oxidando tais compostos (Figura 36).

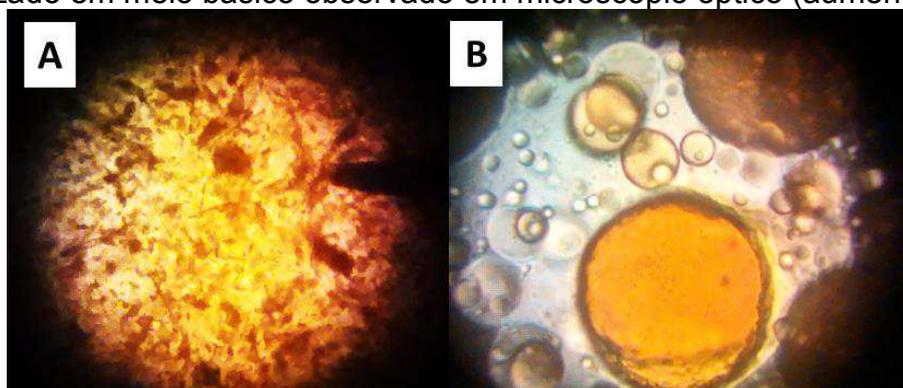
Figura 36 – (A) EHA de própolis vermelha solubilizado em alginato em meio ácido; (B) EHA de própolis vermelha solubilizado em meio básico.



Fonte: elaborada pelo autor.

Ao observar a mistura de própolis vermelha com alginato em meio ácido ao microscópio óptico percebeu-se que não havia uma distribuição uniforme entre própolis e polímero, já que o alginato não apresentava compatibilidade com a solução de própolis (Figura 37 – A). Quando incorporava própolis com polímero em meio alcalino havia melhor compatibilidade (Figura 36 – B).

Figura 37 – (A) EHA de própolis vermelha solubilizado em alginato em meio ácido observado em microscópio óptico (aumento 200X); (B) EHA de própolis vermelha solubilizado em meio básico observado em microscópio óptico (aumento 400X).



Fonte: elaborada pelo autor.

O pó obtido com a solução de alginato em meio alcalino foi extremamente higroscópico e em 24 horas após a obtenção todas as partículas estavam aglomeradas tornando-as inviáveis para as análises seguintes.

III. Própolis com Carboximetilcelulose

A carboximetilcelulose (CMC), por apresentar características semelhantes às do alginato, também demonstrou os mesmos inconvenientes. Em meio ácido a mistura de própolis vermelha com CMC não ocorria, a própolis não se distribuiu homogeneamente na solução de CMC e acumulava-se isoladamente (Figura 38). Como alternativa, alcalinizou-se o meio sob aquecimento, nas condições vistas para incorporação da própolis vermelha com alginato, o que proporcionou incorporação do polímero à própolis, e a mistura foi levada para *Spray Dryer* a fim de obter micropartículas de própolis vermelha com CMC.

Figura 38 – Incorporação de própolis vermelha em carboximetilcelulose.



Fonte: elaborada pelo autor.

O pó obtido foi coletado e acondicionado em recipiente hermeticamente fechado. Esse pó também apresentou características higroscópicas que o tornaram um aglomerado com aspecto semelhante ao do alginato (Figura 39).

Figura 39 – Formação de grémulo com as micropartículas de própolis vermelha e carboximetilcelulose.



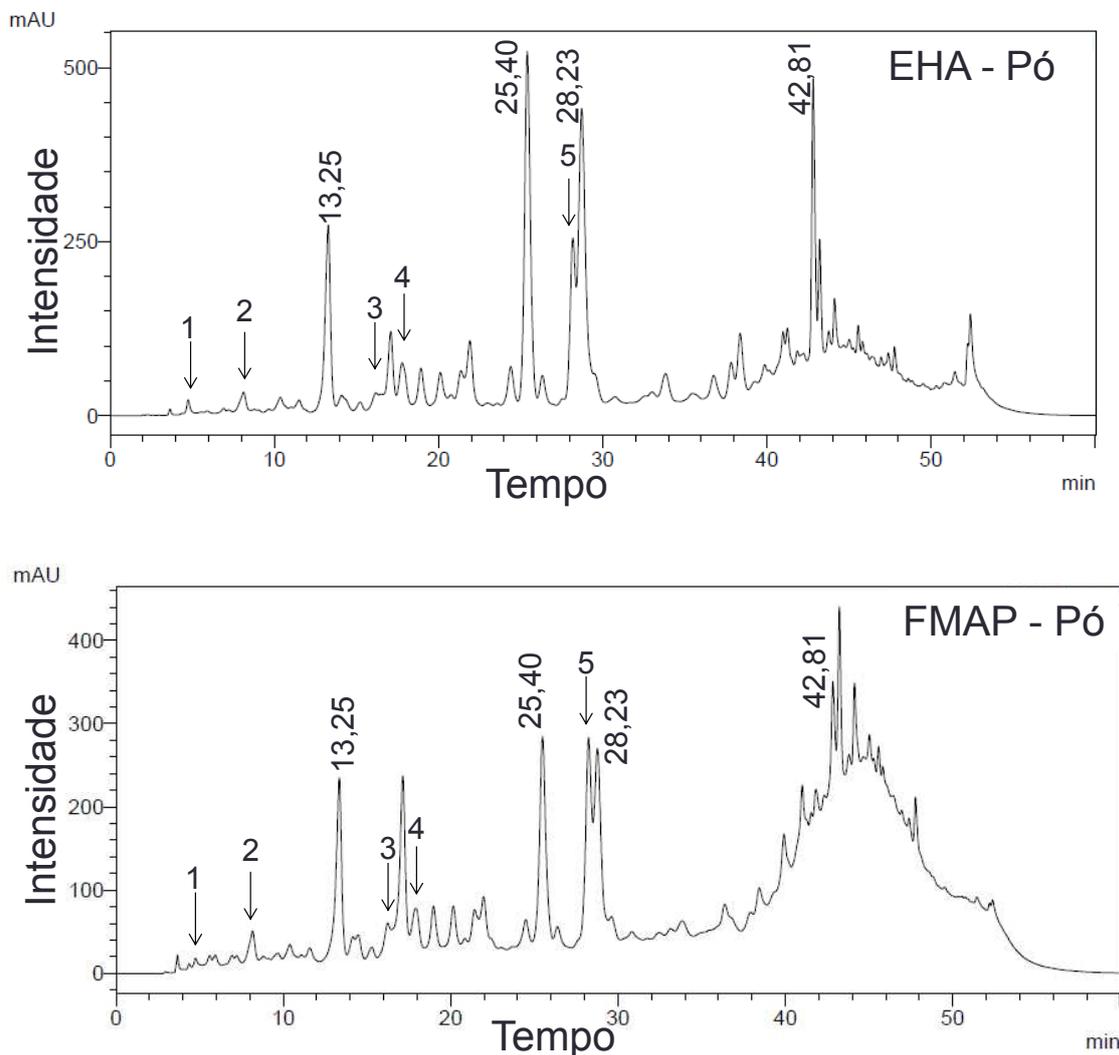
Fonte: elaborada pelo autor.

5.5 Marcadores nas Micropartículas

Os picos majoritários identificados no EHA e FMAP também foram identificados nas amostras microparticuladas, onde a intensidade dos picos foram semelhantes (Figura 40).

Analisando o teor dos marcadores nas micropartículas notamos uma discreta elevação no EHA Microparticulado e na FMAP uma discreta redução. Entretanto, o teor de formononetina foi elevado nos dois microparticulados (Tabela 13).

Figura 40 - Cromatogramas das micropartículas de própolis com quitosana na concentração de 10mg/mL (max.281 nm). (1) Ácido Gálico, (2) Ácido Felúrico, (3) Daidizeína, (4) Quercetina e (5) Formononetina.



Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 13 – Teor dos marcadores da própolis nas micropartículas. Os valores obtidos estão expressos em média \pm desvio padrão.

Composto	EHA (%)	FMAP (%)
Formononetina	109,34 \pm 7,80	113,39 \pm 3,61
Acido gálico	112,80 \pm 6,31	102,16 \pm 4,13
Acido felúrico	99,91 \pm 8,16	102,18 \pm 3,86
Daidzeína	111,8 \pm 6,99	99,78 \pm 2,87
Quercetina	98,12 \pm 7,13	101,17 \pm 2,36

Fonte: elaborada pelo autor.

Robert et al. (2010) em trabalho realizado para microencapsulação de polifenóis e antocianinas com maltodextrina utilizando a técnica *spray drying* conseguiram obter teor desses compostos em até 100%. Nunes & Mercadante (2007) encapsularam cristais de licopeno utilizando goma arábica por *spray drying* conseguindo obter até 96% de rendimento, demonstrando que essa técnica é eficiente quanto à preservação do material encapsulado. Além disso a técnica também se mostrou eficiente para materiais voláteis como 4-alil-2-metoxifenol, um composto fenólico que foi encapsulado utilizando quitosana em diferentes proporções com rendimento de até 88,65% desse composto nas micropartículas (PEREIRA, 2007).

5.6 Caracterização da Micropartículas

I. Teor de Umidade

Os microparticulados de FMAP com quitosana mostraram-se mais higroscópicos que os obtidos com EHA conforme mostra tabela 14. Micropartículas obtidas com extrato etanólico de própolis e goma arábica, dextrina e maltodextrina apresentaram respectivamente teor de umidade de 5,63%, 7,08% e 7,51% demonstrando que micropartículas de própolis com quitosana possui menor teor de umidade (TOSONI et al. 2013).

Tabela 14 – Teor de umidade das micropartículas de própolis vermelha.

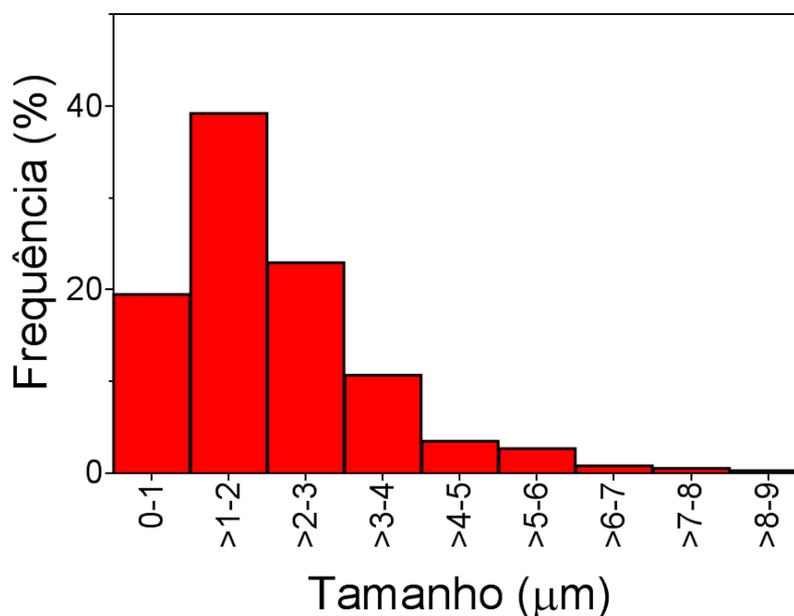
Amostra	Teor de umidade (%)
EHA (microparticulado)	3,37
FMAP (microparticulado)	8,70

Fonte: elaborada pelo autor.

II. Granulometria

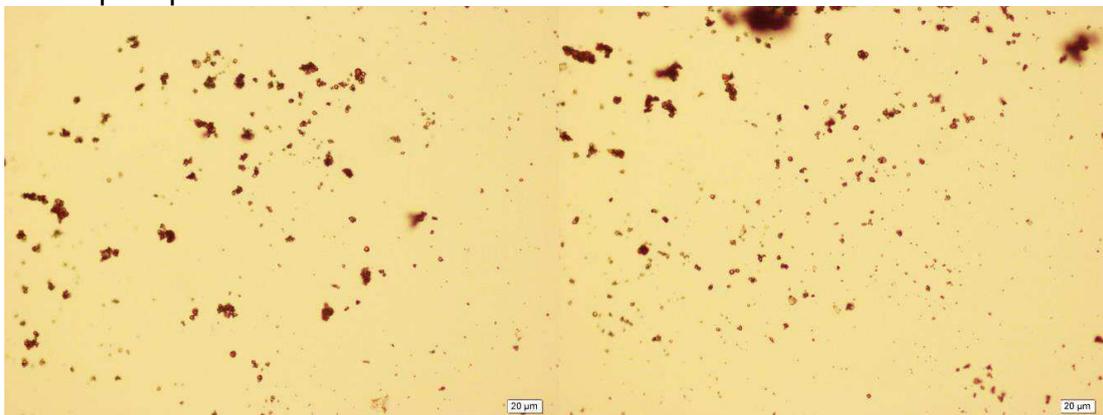
A maioria das micropartículas de EHA com quitosana apresentou tamanho entre 1,0 e 2,0 micrômetros de diâmetro, cerca de 40% do total. Houve uma variação no tamanho que sugere uma distribuição normal e monomodal dessa amostra (Figura 41).

Figura 41 – Curva de distribuição do tamanho das partículas obtidas do EHA com quitosana.



Fonte: elaborada pelo autor.

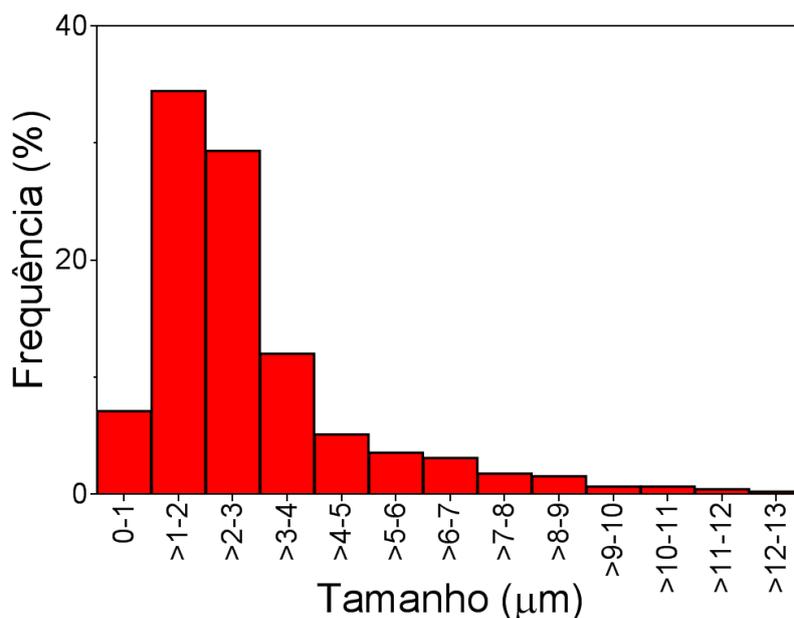
Figura 42 – Imagens das micropartículas de EHA com quitosana capturadas por microscópio óptico aumento 400X.



Fonte: elaborada pelo autor.

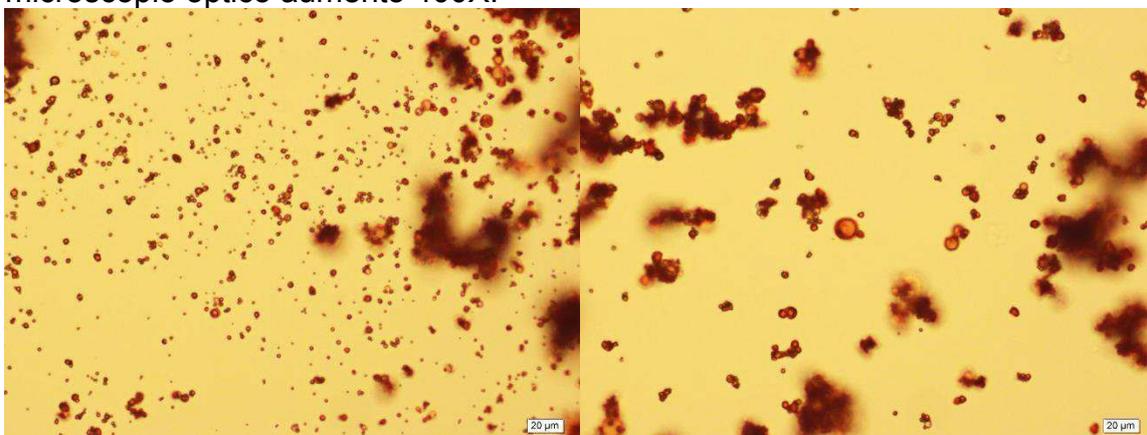
A FMAP com quitosana apresentou uma maior quantidade de micropartículas entre 1,0 e 3,0 micrômetros de diâmetro, com distribuição de partículas de até 13,0 micrômetros de diâmetro, maiores que as observadas para o EHA (Figura 43).

Figura 43 – Curva de distribuição do tamanho das partículas obtidas da FMAP com quitosana.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 44 – Imagens das micropartículas de FMAP com quitosana capturadas por microscópio óptico aumento 400X.

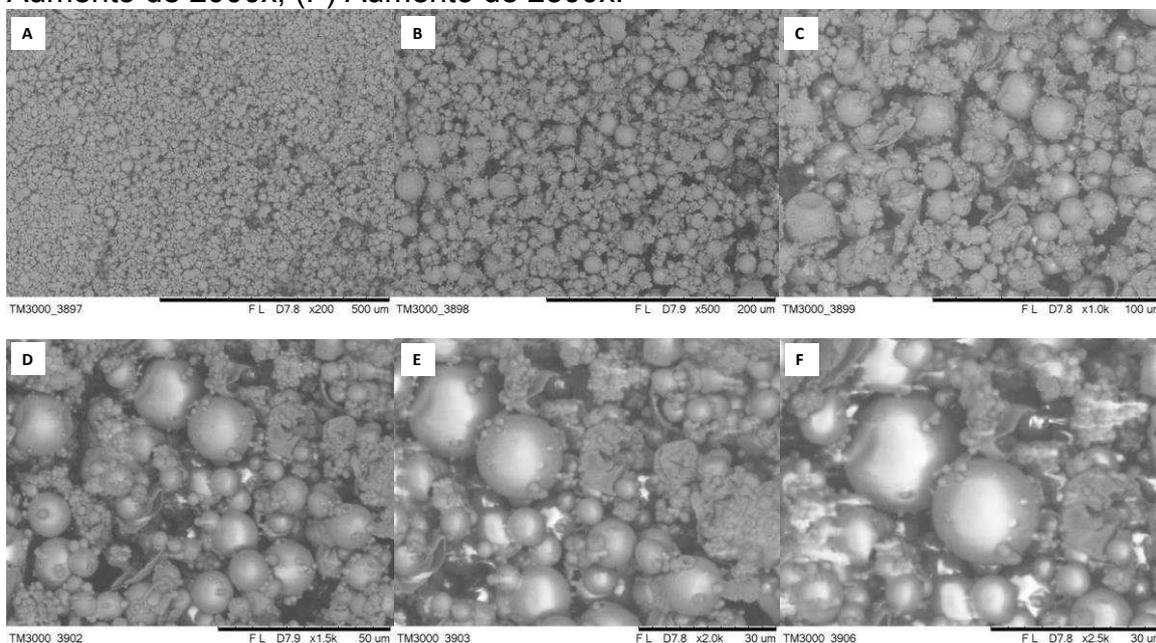


Fonte: elaborada pelo autor.

III. MEV

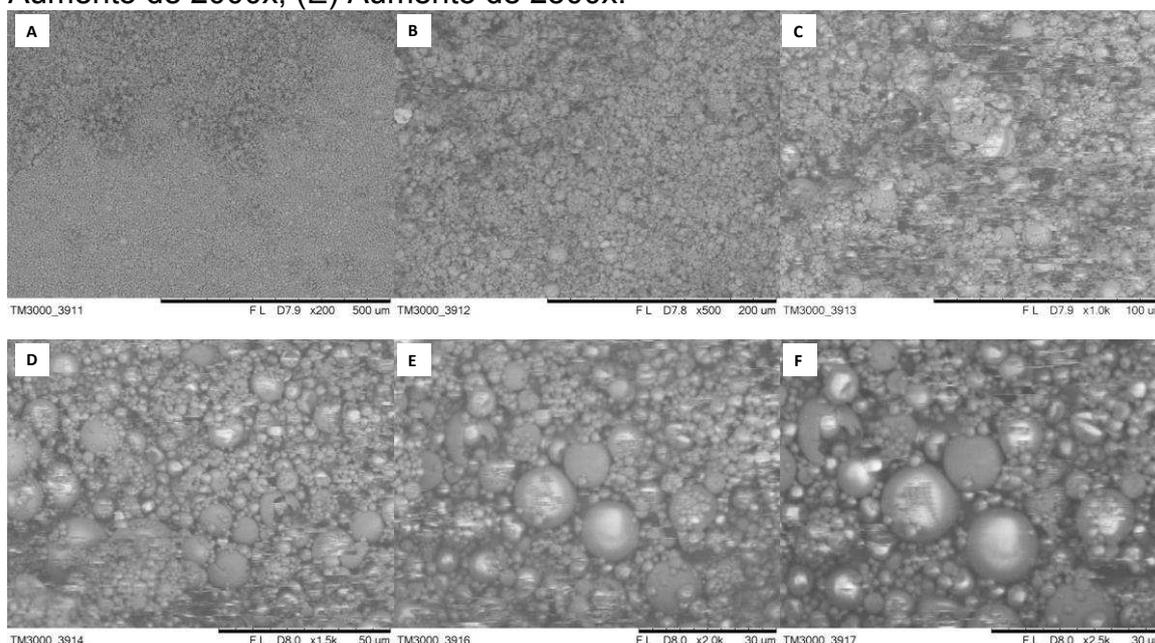
As micropartículas de EHA e FMAP com quitosana apresentaram superfície com formação esférica. Houve variação no tamanho dessas micropartículas e pôde-se observar que não havia ruptura das esferas (Figura 45 e 46).

Figura 45 – MEV das micropartículas de EHA com quitosana. (A) Aumento de 200x; (B) Aumento de 500x; (C) Aumento de 1000x; (D) Aumento de 1500x; (E) Aumento de 2000x; (F) Aumento de 2500x.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 46 – MEV das micropartículas da FMAP com quitosana. (A) Aumento de 200x; (B) Aumento de 500x; (C) Aumento de 1000x; (D) Aumento de 1500x; (E) Aumento de 2000x; (F) Aumento de 2500x.



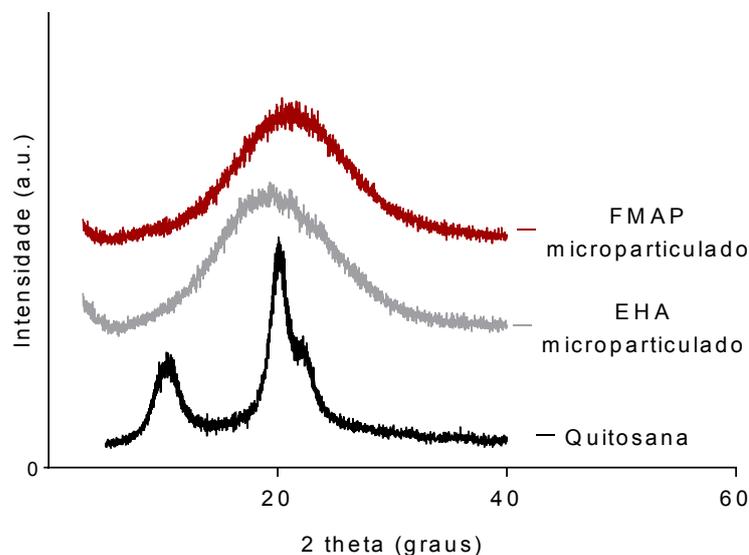
Fonte: elaborada pelo autor.

IV. Difração de Raios X – DRX

A quitosana possui comportamento semicristalino devido às fortes interações intra- e intermoleculares caracterizadas pelas ligações de hidrogênio formadas entre os grupos amino, álcool, amida e outros grupos funcionais presentes na molécula de quitosana. Essas fortes interações fornecem certa organização à estrutura cristalina da quitosana (URAGAMI; TOKURA, 2006).

A adição de EHA e FMAP reduziu a cristalinidade da quitosana observado pelo alargamento do pico em $2\theta = 20$ dos materiais microparticulados (Figura 47), o que pode proporcionar uma melhor solubilidade destes em água, como foi observado nos experimentos realizados por Muzzarelli et al. (2004). Os autores produziram microesferas de quitosana com guaran, polissacarídeo neutro, mais solúveis em água quando comparadas somente ao polissacarídeo.

Figura 47 – Difratoograma de raios X para amostras de quitosana, EHA e FMAP microparticulados.



Fonte: elaborada pelo autor.

V. FTIR-ATR

A espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi empregada para confirmar a presença dos grupos funcionais em amostras de própolis e quitosana, bem como possíveis mudanças destes grupos após a formação das micropartículas.

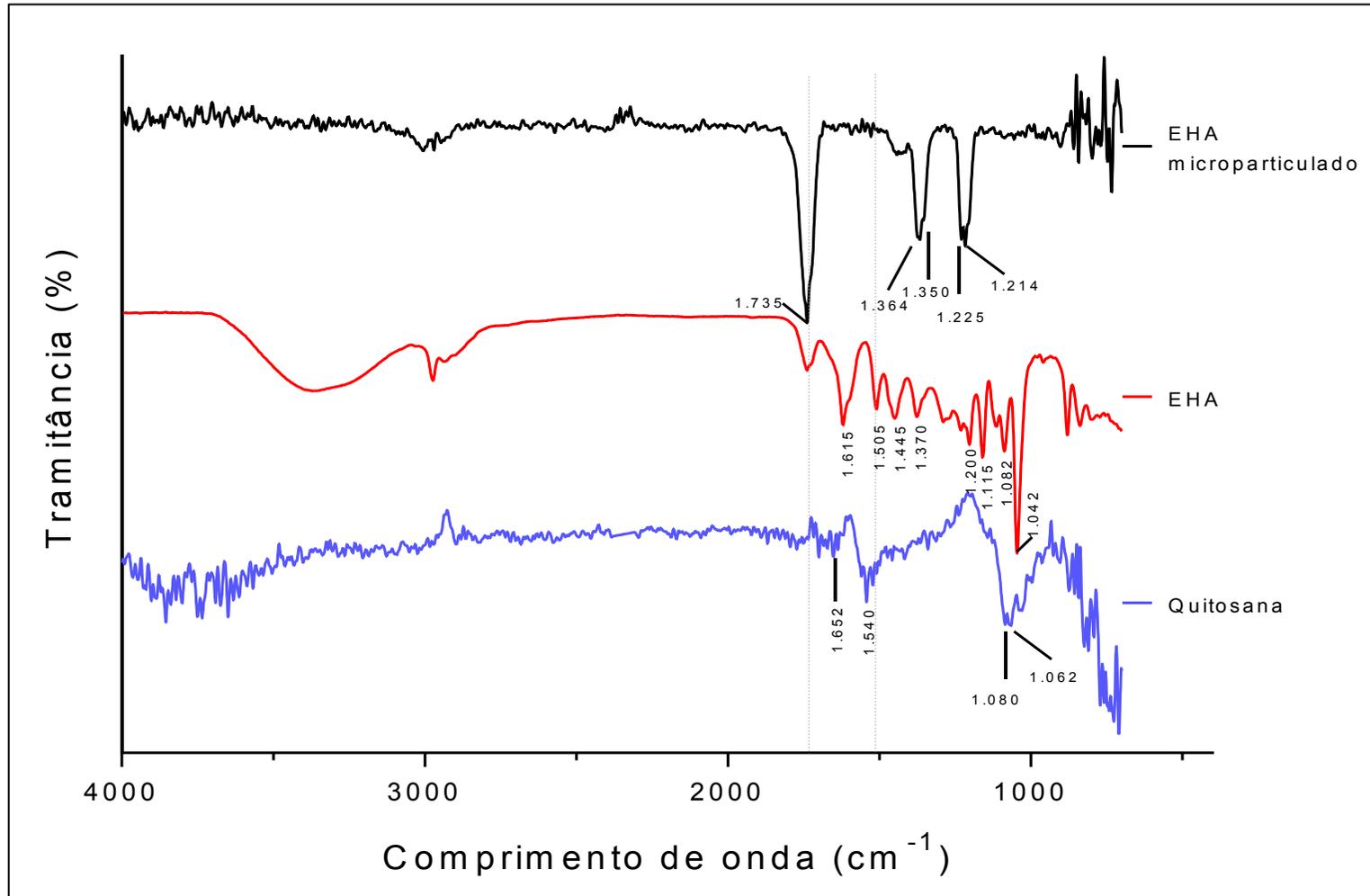
O espectro de infravermelho da quitosana apresentou as bandas características de estiramento N-H em 1652 cm^{-1} , deformação angular N-H em 1540 cm^{-1} e bandas de estruturas polissacarídicas (anéis piranosídicos) em 1080 e 1062 cm^{-1} (FRANCA et al., 2014).

A própolis apresentou bandas em 1735 e 1615 cm^{-1} que correspondem ao estiramento de C=O de compostos lipídicos e fenólicos, banda em 1505 cm^{-1} que corresponde ao estiramento C=C de compostos aromáticos, bandas em 1445 , 1370 e 1200 cm^{-1} que correspondem ao dobramento C-H e estiramento C-OH de

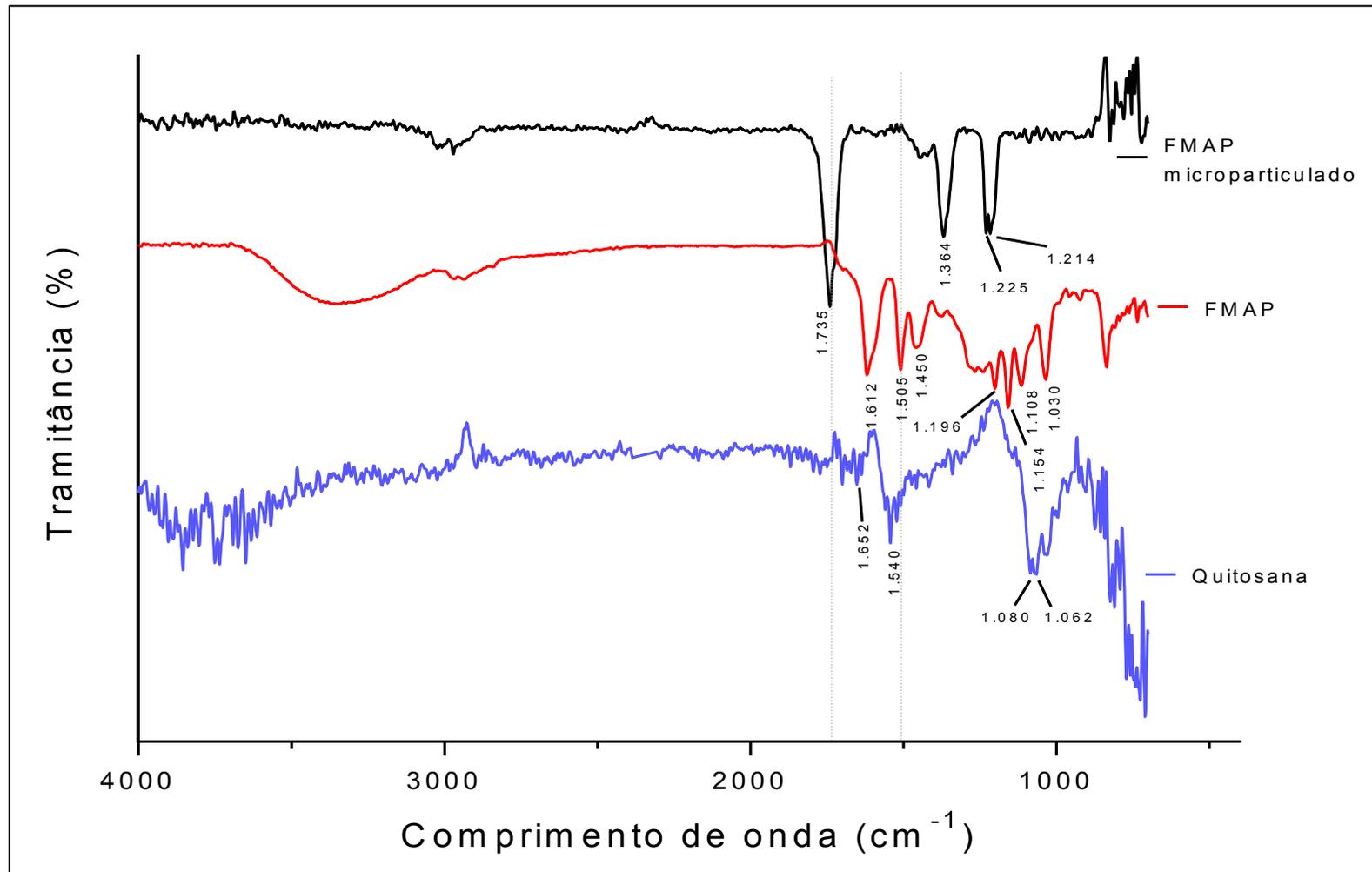
flavonóides e compostos aromáticos e bandas em 1115, 1082 e 1042 cm^{-1} que correspondem a álcoois terciário, secundário e primário. Segundo Mot et al. (2011) a banda 1515 cm^{-1} é uma banda característica de amostras de própolis referente a deformação angular C=C provavelmente referente a presença de flavonóides e anéis aromáticos. Nesse estudo foi encontrada uma banda em 1505 cm^{-1} para o extrato.

Nas amostras EHA pó e FMAP pó a adição de quitosana à PVA acarretou na diminuição das intensidades das vibrações relativas aos picos característicos à própolis ressaltando-se a banda em 1505 cm^{-1} . No EHA a banda 1735 cm^{-1} é intensificada na amostra EHA microparticulado e essa banda também aparece na amostra FMAP microparticulado o que indica a interação entre os grupamentos C=O de amida e amina presentes na quitosana com grupamentos fenólicos de compostos presentes na própolis através de ligações de hidrogênio provocando uma reorganização das frequências vibracionais. Dessa forma, a quitosana pode ter criado novas interações entre as cadeias modificando os grupos funcionais o que corrobora com os dados de Petruta et al. (2015).

Figura 48 – Espectros FTIR –ATR de quitosana, EHA e EHA Microparticulado.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 49 – Espectros FTIR –ATR de quitosana, FMAP e FMAP Microparticulado.

Fonte: elaborada pelo autor.

5.7 Atividade Biológica das Micropartículas

5.7.1 Determinação do FPS

Os microparticulados obtidos com EHA e FMAP mantiveram a capacidade fotoprotetora observada com as amostras fluidas. Para a concentração de 0,1% essas amostras microparticuladas apresentaram um incremento no FPS quando comparadas às amostras fluidas e se comparada ao metoxicinamato de octila a capacidade fotoprotetora é de 53,29%. Contudo a proporcionalidade de incremento do FPS não foi observada para as concentrações seguintes (Tabela 15).

Foi possível perceber que a obtenção das micropartículas de FMAP com quitosana não afetou o FPS na concentração de 1%, não diferindo significativamente da amostra fluida (Tabela 15).

Tabela 15 – Determinação do FPS *in vitro* das micropartículas de própolis vermelha e metoxicinamato de octila comparados ao FPS das amostra fluidas.

Concentração	EHA m*	EHA	FMAP m*	FMAP	Metox*
0,1%	1,076 ± 0,040 ^a	0,096 ± 0,002 ^b	1,047 ± 0,014 ^a	0,345 ± 0,017 ^c	2,019 ± 0,018 ^d
0,5%	1,164 ± 0,172 ^a	0,561 ± 0,005 ^e	2,040 ± 0,018 ^f	1,643 ± 0,032 ^g	3,732 ± 0,035 ^h
1,0%	1,679 ± 0,069 ^g	0,850 ± 0,013 ⁱ	2,248 ± 0,052 ^j	2,321 ± 0,055 ^j	7,394 ± 0,050 ^k

Legenda: m*= Microparticulado.

Os valores obtidos estão expressos em média do FPS ± desvio padrão, aceitando um nível de significância com $p < 0,05$. Letras diferentes demonstram diferença significativa, letras iguais, não houve diferença significativa pelo teste de Tukey.

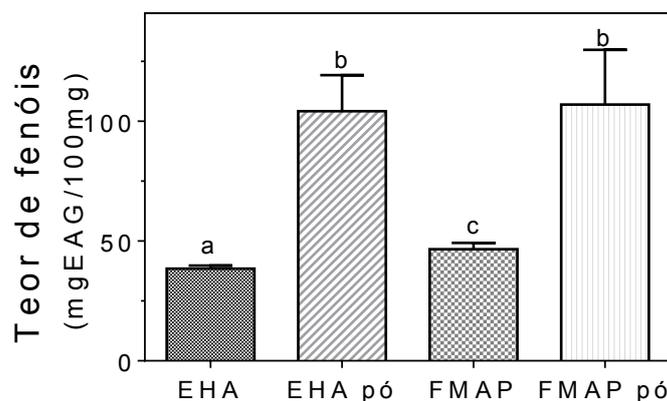
Fonte: elaborada pelo autor.

5.7.2 Atividade Antioxidante

I. Teor de Fenóis Totais

Houve elevação no teor de fenóis totais para as amostras microparticuladas, contudo o teor de fenóis foi igual estatisticamente entre as micropartículas obtidas com EHA e FMAP (Figura 50).

Figura 50 – Teor de fenóis totais em mg EAG/ 100 mg de extrato seco para o EHA e FMAP microparticulados comparados às amostras fluidas.



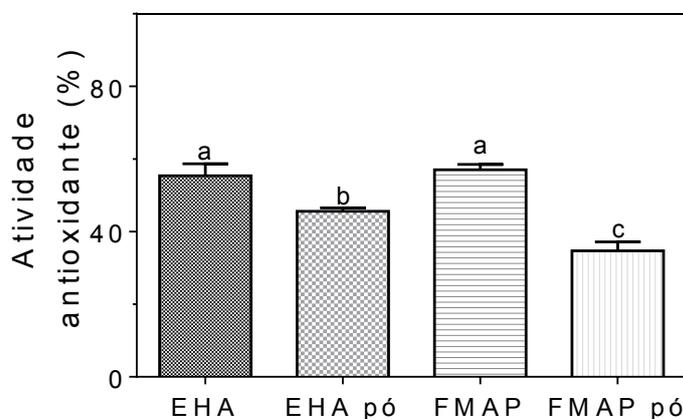
Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão, aceitando um nível de significância com $p < 0,05$. Letras diferentes demonstram diferença significativa, letras iguais, não houve diferença significativa pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborada pelo autor.

II. Atividade Sequestradora do Radical Livre DPPH

Houve uma diminuição na capacidade de captura do radical DPPH para as amostras microparticuladas. Sendo a acessibilidade estérica o fator determinante da reação, moléculas grandes aparentemente podem apresentar uma menor atividade quando comparadas a moléculas menores, devido ao impedimento de acesso ao sítio do radical DPPH, sem que isso represente diminuição da capacidade antioxidante (ALVES et al. 2010).

Figura 51 – Atividade sequestradora do radical DPPH para o EHA e FMAP microparticulados comparados às amostras fluidas. Os valores obtidos estão expressos em média \pm desvio padrão, aceitando um nível de significância com $p < 0,05$.

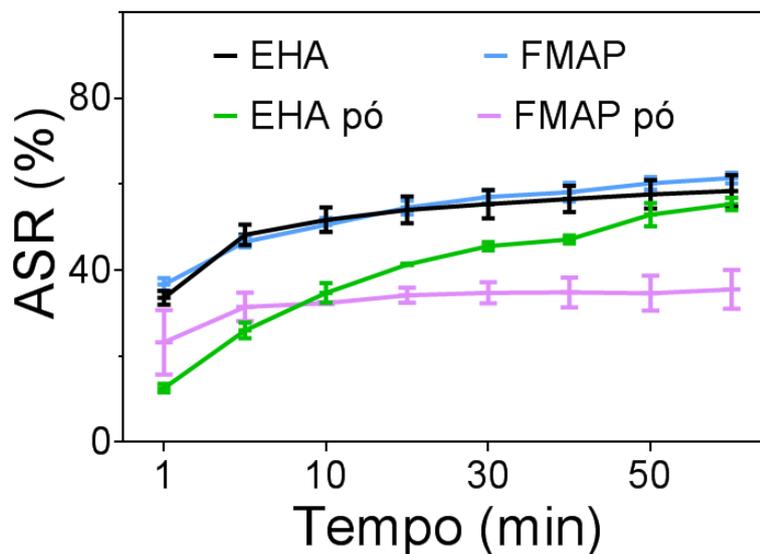


Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão, aceitando um nível de significância com $p < 0,05$. Letras diferentes demonstram diferença significativa, letras iguais, não houve diferença significativa pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborada pelo autor.

A cinética dos microparticulados apresentou uma modificação em relação às amostras fluidas. As micropartículas de EHA assemelharam-se ao perfil cinético da amostra fluida em 60 minutos, porém o início da ação antioxidante foi reduzido. Já para as micropartículas da FMAP a cinética apresentou um perfil mais linear a partir de 5 minutos (Figura 52).

Figura 52 – Cinética da atividade sequestradora do radical DPPH (ASR) para o EHA e FMAP microparticulados comparados às amostras fluidas.



Os valores obtidos estão expressos em média \pm desvio padrão.

Fonte: elaborada pelo autor.

A CE_{50} dos microparticulados de própolis com quitosana aumentou quando comparados às amostras fluidas. Para o EHA microparticulado o aumento foi de 59,94% e para o FMAP Microparticulado foi de 53,24%, contudo a acessibilidade estérica pode ter sido o fator determinante desse aumento (Tabela 16).

Tabela 16 – Determinação da CE_{50} para os microparticulados de própolis vermelha comparados às amostras fluidas.

Amostra	Equação	R^2	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
EHA	$y = 1,56x + 15,88$	0,9939	21,87
EHA (microparticulado)	$y = 0,9995x + 15,042$	0,956	34,98
FMAP	$y = 1,33x + 20,47$	0,9702	22,20
FMAP (microparticulado)	$y = 1,0892x + 12,946$	0,970	34,02
Ac. Gálico	$y = 11,55x + 36,82$	0,9901	1,14
Trolox	$y = 8,87x + 13,65$	0,9811	4,09
Quercetina	$y = 8,44x + 18,44$	0,9350	3,74

Fonte: elaborada pelo autor.

5.7.3 Atividade Antimicrobiana

Ao compararmos a capacidade inibitória do EHA e FMAP com seus respectivos pós notamos que não houve alteração para a *C. albicans*. Para os microrganismos Gram-positivos a FMAP pó apresentou melhores resultados em relação ao EHA pó que teve a CIM aumentada, comparando as respectivas amostras fluidas. Em relação aos microrganismos Gram-negativos houve uma variação na CIM a depender do microrganismo analisado, havendo redução da CIM para alguns pós e elevação, para outros (Tabela 17).

Tabela 17 – CIM e CBM para os microparticulados de própolis vermelha comparados às amostras fluidas.

Microrganismos	EHA CIM (CBM)mg/mL	EHA pó CIM (CBM)mg/mL	FMAP CIM (CBM)mg/mL	FMAP pó CIM (CBM)mg/mL
Gram-positivos				
<i>S. aureus</i>	0,70 (50,00)	3,00 (25,00)	25,00 (25,00)	1,50 (25,00)
<i>S. epidermidis</i>	1,50 (12,50)	12,50 (100,00)	0,70 (12,50)	0,70 (100,00)
Gram-negativos				
<i>K. pneumoniae</i>	1,50 (50,00)	12,50 (100,00)	0,70 (100,00)	12,50 (100,00)
<i>S. flexneri</i>	0,70 (6,20)	0,30 (50,00)	0,70 (50,00)	50,00 (>100,00)
<i>E. coli</i>	3,00 (100,00)	1,50 (12,50)	1,50 (100,00)	1,50 (25,00)
<i>S. entérica</i>	0,70 (50,00)	1,50 (100,00)	0,70 (25,00)	3,00 (>100,00)
<i>P. aeruginosa</i>	3,00 (>100,00)	3,00 (50,00)	3,00 (25,00)	12,50 (>100,00)
Fungo				
<i>C. Albicans</i>	12,50 (50,00)	12,50 (50,00)	1,50 (100,00)	1,50 (100,00)

Concentração máxima testada de 100,00mg/mL.

Fonte: elaborada pelo autor.

6. CONCLUSÃO

A FMAP apresentou os requisitos exigidos pela ANVISA para ser um produto multifuncional, onde foram constatadas as atividades fotoprotetora, antioxidante, cicatrizante e antimicrobiana. Ela também não demonstrou toxicidade quando aplicada na via tópica.

As micropartículas de própolis-QUI sem adição de glutaraldeído apresentaram-se com superfície uniforme, distribuição de tamanho variada e baixo teor de umidade.

Os padrões utilizados para monitorar a qualidade das micropartículas de própolis foram ácido gálico, ácido felúrico, ácido vanílico, daidizeína, formononetina e quercetina. Não houve perda no teor desses marcadores nas micropartículas e as atividades biológicas foram preservadas.

Assim, foi possível obter micropartículas da FMAP-QUI com ação fotoprotetora, antioxidante e antimicrobiana que podem ser utilizadas para aplicação tópica na prevenção de injúrias na pele como um produto multifuncional.

7. REFERÊNCIAS

ABIHPEC – Associação Brasileira da Indústria da Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. Disponível em: <<http://www.abihpec.org.br/>>. Acesso em: 26 de janeiro 2015.

ADELMANN, Juliana. Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana / antioxidante. 2005. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêutica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

AFTABROUCHAD; DOELKER, E. Preparation methods for biodegradable microparticles loaded with water-soluble drugs. **STP Pharma Sciences**, Paris, v. 2, p. 365-380, 1992.

ALENCAR, S.M.; OLDONI, T.L.; CASTRO, M.L.; CABRAL, I.S.; COSTA-NETO, C.M.; CURY, J.A.; Rosalen, P.L.; Ikegaki, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113 n.2, p. 278-83, 2007.

ALENCAR, S.M.; OLDONI, T.L.C.; CASTRO, M.L.; CABRAL, I.S.R.; COSTA-NETO, C.M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. In: CABRAL, J.S.R. Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira. 2008. 94p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M. I.; DAVID, J. P. I.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v.33, n.10, p. 2202-2210, 2010.

ALVIM, N.A.T.; FERREIRA, M.A.; CABRAL, I.E.; FILHO, A.J.A. O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 14, n. 3, 2006.

ALZOGHAIBI, M. A. Concepts of oxidative stress and antioxidant defense in Crohn's disease. **World Journal of Gastroenterology**, v.19, n.39, p. 6540-6547, 2013.

ANVISA, Resolução - RDC N° 30 de 1º de junho de 2012.

ANVISA, Resolução RDC nº 211, de 14 de julho de 2005.

AYRES, D.C.; MARCUCCI, M.C.; GIORGIO, S. Effects of Brazilian própolis on *Leishmania amazonensis*. In: PINTO, L.M.A.; PRADO, N.R.T.; CARVALHO, L.B. Propriedades, usos e aplicações da própolis. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 3, p. 76-100, 2011.

ASCHERI, Diego P. R.; MARQUEZ, Márcia O. M. e MARTUCCI, Enny T.. Microencapsulação de óleo essencial de laranja: seleção de material de parede. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** [online]., vol.23, suppl. [citado 2015-11-17], pp. 1-6, 2003.

ASSIMOS, ARIANE ARAÚJO. Avaliação da Concentração e dos Tipos de Flavonoides na Própolis Utilizando Métodos Quimiométricos de Classificação e Calibração. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS. Dissertação. 2014.

AZEVEDO, I. C.; COSTA, R. K. S.; TORRES, G. V.; FERREIRA JÚNIOR, M. A. Tratamento de Feridas: A Especificidade das Lesões Oncológicas. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 7, n. 2, p. 303-313, 2014.

BARACHO, N. C. V., OLIVEIRA, H. C., MAGLHÃES, I. N., GIL, B. L., & IRULEGUI, R. S. C. Extrato hidroalcoólico de própolis e cicatrização de feridas no diabetes tipo I: Estudo experimental. **Revista Científic@ Universitas**, v.2, n.2, 2009.

BANDEIRA, PAULO N.; LEMOS, TELMA L. G.; COSTA, SÔNIA M. O. AND SANTOS, HÉLCIO S. dos. Obtenção de derivados da mistura triterpenoídica alfa e beta-amirina. **Rev. bras. farmacogn.** [online]. vol.17, n.2 [cited 2015-11-19], pp. 204-208, 2007.

BARACHO,,N.C.V.; OLIVEIRA, H.C.; MAGLHÃES, I.N; GIL, B.L.; IRULEGUI, S.C. Extrato hidroalcoólico de própolis e cicatrização de feridas no diabetes tipo I: Estudo experimental. **Revista Científica da FEPI**, v.2, n.2, 2009.

BARBOSA, M. H.; ZUFFI, F.B.; MARUXO, H.B.; JORGE, L.L.R. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 22, n. 3, p.318-322, out. 2008.

BARTH, A.L. Fator de proteção solar versus coeficiente de carga de filtros solares químicos: avaliação fotobiológica de uma mistura de filtros solares químicos. Dissertação. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2000.

BATISTA, L.L.V.; CAMPESATTO, E. A.; DE ASSIS, M. L. B.; BARBOSA, A. P. F.; GRILLO, L. A. M.; DORNELAS, C. B. Estudo comparativo do uso de própolis verde e vermelha na reparação de feridas em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.39, n.6, p.515-520, 2012.

BENINI, E.B.; REMPEL, C.; STROSCHOEN, A.A.G.; HOERLLE, J.L; PÉRICO, E. Perfil glicêmico da população de usuários adultos do Posto de Saúde de Arvorezinha – RS. **ConScientiae Saúde**, v.8, n.3, p. 439-445, 2009.

BEPPU, MARISA M., EDUARDO J. ARRUDA E CESAR C. SANTANA. Síntese e Caracterização de Estruturas Densas e Porosas de Quitosana. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. P.163-169, 1999.

BIANCO, É. M.; SANTOS, C. A. M. Propriedades antioxidantes de folhas e caules de *Bauhinia microstachya* (Raddi) J. F. Macbr. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 3, p.238-241, 2010.

BOTELHO, N.H.; CARVALHO, R.K.V.; MATOS, L.T.M.B.; LOBATO, R.C.; CORRÊA, S.C. Efeito subagudo de altas doses de óleo de copaíba nos níveis de enzimas hepáticas em soro de ratos. **Revista Paranaense de Medicina**, v.24, n.3/4, p. 1-7, 2011.

BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHMIDT, E.M.; SANTOS, M.T.; ROSA, M.R.; QUINÁIA, S.P.; TORRES, Y.R.; SANTA, H.S.D.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; CABRAL, I. S. R. Isolamento e Identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira. 2008. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução normativa nº3, de 19 de Janeiro de 2001. Anexo VII, Regulamento da identidade e qualidade de extrato de própolis. 2001.

CHANG-BRAVO, LILIAM., ALEX LÓPEZ-CÓRDOBA, MIRIAM MARTINO. Biopolymeric matrices made of carrageenan and corn starch for the antioxidant extracts delivery of Cuban red propolis and yerba mate. **Reactive & Functional Polymers** v.85, p. 11–19, 2014.

CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v.32, n.6, p. 1523-1527, 2009.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D. Estudo das interações entre o complexo polieletrólítico trimetilquitosana/carboximetilcelulose e Cu^{+2} , ácido húmico e atrazina em solução aquosa. **Química Nova**, v.32, n.6, p.1461-1466, 2009.

CASTALDO, S. & CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v.73, p.S1-S6, 2002.

CHANG, R. Estudos químicos da própolis do estado de Minas Gerais. 2005. 130f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química. Belo Horizonte. 2005.

CHORILLI, M.; SCARPA, M. V.; LEONARDI, G. R.; FRANCO, Y. O. Toxicologia dos Cosméticos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.26, n.1, p. 144-54, 2007.

CICCO, N.; LANORTE, M. T.; PARAGGIO, M.; VIGGIANO, M.; LATTANZIO, V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. **Microchemical Journal**, n. 91, p.107-110, 2010.

COQUEIRO, D.P.; BUENO, P.C.S.; GUIGUER, E.L.; BARBALHO, S.M.; SOUZA, M.S.S.; ARAÚJO, A.C.; TORRES, C.S.; SCACCO, G.; TIVERON, A.M.; COSTA, J.M., VANZO, L.A.; SILVA, L.O.; GIL, M.S.; ABIB, M.D.; ROSSI, P.B.R.; OZI, R.F.; ABIB, T.D.; GONÇALVES, U.M. Efeito do chá de orégano (*Origanum vulgare*) no perfil bioquímico de ratos Wistar. **Scientia Médica**, v.22, n.4, p.191-196, 2012.

COSTA SILVA, H.S. R.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v.29, n.4, p. 776-785, 2006.

COSTA, P.R.R. Produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas: Candidatos a fármacos com ação antiofídica, anticâncer e antiparasitária. **Revista Virtual de Química**, v.1, n.1, p. 58-66, 2009.

CUETO, A. P.; ALVES, S. H.; WEIBLEN, M. P. R.; KUBIÇAR, T. F.; LOVATO, L. T. Atividade antiviral do extrato de própolis contra o calicivírus felino, adenovírus canino 2 e vírus da diarreia viral bovina. **Ciência Rural**, v. 41, n. 10, p.1800-1806, out. 2011.

CUNHA, L.C.; AZEVEDO, F.S.; MENDONÇA, A.C.V.; VIEIRA, M.S.; PUCCI, L.L.; VALADARES, M.C.; FREITAS, H.O.G.; SENA, A.A.S.; JUNIOR, R.S.L. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico de folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.2, p. 403-411, 2009.

DAUGSCH, A. MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian red propolis – chemical composition and botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.5, n.4, 435-441, 2007.

DEVASAGAYAM, T.P.; TILAK, J.C.; BOLOOR, K.K.; SANE, K.S.; GHASKADBI, S.S.; L. ELE, R.D. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects, 2004. In: MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 405-411, 2005.

DINIZ, M.F.F.M.; MEDEIROS, I.A.; SANTOS, H.B.; OLIVEIRA, K.K.; AGUIAR, F.B.; TOSCANO, M.G.; RIBEIRO, E.A.N. Padronização dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos Swiss e Ratos Wistar. **Revista Brasileira de Ciência de Saúde**, v.10, n.2, p. 171-176, 2006.

D'OLIVEIRA, R.J.D. Composição bucal de uso tópico, enxaguatório bucal, solução bucal e dentífrico, bem como o uso da referida composição. In: PINTO, L.M.A.; PRADO, N.R.T.; CARVALHO, L.B. Propriedades, usos e aplicações da própolis. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 3, p. 76-100, 2011.

FANG, L.; LEU, Y.; WANG, Y.; TSAI, T. *In vitro* topical application and *in vivo* pharmacodynamic evaluation of nonivamide hydrogels using *Wistar* rat as an animal model. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.15, n.5, p.417-423, 2002.

FERNANDES JR, A.; LOPES, M. M. R.; COLOMBARI, V.; MONTEIRO, A. C. M.; VIEIRA, E.P. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.1, p. 294-297, 2006.

FERNANDES, LUCIANA PINTO. Desenvolvimento tecnológico de produtos particulados obtidos a partir de *Lippia sidoides* pela técnica de spray drying e avaliação das propriedades antifúngicas. Tese USP. 2008.

FERNANDES-SILVA, C. C. "Caracterização química de quatro amostras de própolis brasileira. isolamento de substâncias e testes das atividades antioxidante e anti-HIV". 2013. 139 f. Tese Doutorado (Doutorado em Ciências na área de Botânica) –Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

FERNÁNDEZ, J. Y.; MONTOYA, J. A. S.; MARTÍNEZ, L. C.; HERNÁNDEZ, J. J.; ROBLES, M. M.; RAMÍREZ, E. G. R. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. **Avance y Perspectiva**, v. 21, p. 313-319, 2002.

FISHER, G.; HÜBNER, S. O.; VARGAS, G. D.; VIDOR, T. Imunomodulação pela própolis. **Arquivo Instituto Biologia**, v.75, n.2, p.247-253, 2008.

FONTANA, J.D.; ADELMANN, J.; PASSOS, M.; MARASCHIN, M.; LACERDA, C.A.; LANÇAS, F.M. Propolis: chemicalmicro-heterogeneity and bioactivity. In: PINTO, L.M.A.; PRADO, N.R.T.; CARVALHO, L.B. Propriedades, usos e aplicações da própolis. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n.3, p. 76-100, 2011.

FLORIDO, DANIELA MARTINS. Produção de Microesferas de Nanocompósitos de Quitosano e Argila para Libertação Controlada de Fármacos. Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica. 2013.

FRANCA, JUÇARA R. MARIANA P DE LUCA, TATIANA G RIBEIRO, RACHEL O CASTILHO,, ALLYSON N MOREIRA. Propolis - based chitosan varnish: drug delivery, controlled release and antimicrobial activity against oral pathogen bactéria. **BMC Complementary and Alternative Medicine** p. 14:478, 2014.

FROZZA, C.O.; GARCIA, C.S.; GAMBATO, G.; SOUZA, M.D.; SALVADOR, M.; MOURA, S.; PADILHA, F.F.; SEIXAS, F.K.; COLLARES, T.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O.A.; HENRIQUES, J.A.; ROESCH-ELY, M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v.52, p. 137–142, 2013.

GALEMBECK, F.; CSORDAS, Y. Cosméticos: a química da beleza. Disponível: [file:///C:/Users/Valter/Downloads/cosm%C3%A9tico..%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/Valter/Downloads/cosm%C3%A9tico..%20(2).pdf) Acesso em: 26 de janeiro 2015.

GARCIA-MATEOS, Rosario et al. Total phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity in the flowers of *Crataegus* spp. from México. **Agrociencia** [online]. vol.46, n.7 [citado 2015-11-20], pp. 651-662, 2012.

GHISALBERTI, E.L. Própolis: a review In: CABRAL, I. S. P. Isolamento e Identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira. 2008. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

GRANADA, A.; NEMEN, D.; DORA, C.L.; NECKEL, G.L.; LEMOS-SENNA, E. O emprego de sistemas de liberação como estratégia para melhorar as propriedades terapêuticas de fármacos de origem natural: o exemplo da camptotecina e seus derivados. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n.2, p.129-139, 2007.

GRÉGIO, A. M. T. et al. Efeito da propolis mellifera sobre o processo de reparo de lesões ulceradas na mucosa bucal de ratos. **Estud. Biolog.** V.27, n. 58, p. 43-47, 2005.

GREGORY, S.R.; PICCOLO, N.; PICCOLO, M.T.; PICCOLO, M.S.; HEGGERS, J.P. Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: a naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. In: LUSTOSA, S.R.; GALINDO, A.B.; NUNES, L.C.C.; RANDAU, K.P.; NETO, P.J.R. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n.3, p. 447-458, 2008.

HABICTH, J.P. - Some characteristics of indicators of nutritional status for use in screening and surveillance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.33, p. 531-5, 1981.

HEDLUND, A.; GERGÅRD, U. Some aspects on the kinetics of etherification in the preparation of CMC. **Cellulose**, v.14, p. 161-169, 2007.

HELFENBERG, K.D.; The analysis of beeswax and propolis. *Chemilker-Zeitung*. Cap. 31, n.987, 1908.

HOU, Q.; WALSH, M. C.; FREEMAN, R.; BARRY, J. J. A.; HOWDLE, S. M.; SHAKESHEFF, K. M. Incorporation of proteins within alginate fibre-based scaffolds using a post-fabrication entrapment method. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.58, p. 895-902, 2006.

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

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. In: MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 405-411, 2005.

KUMAZAWA, S.; UEDA, R.; HAMASAKA, T.; FUKUMOTO, S.; FUJIMOTO, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant Prenylated Flavonoids from Propolis Collected in Okinawa, Japan. In: PINTO, L.M.A.; PRADO, N.R.T.; CARVALHO, L.B. Propriedades, usos e aplicações da própolis. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 3, p. 76-100, 2011.

LAB REDE. Laboratório de referência em diagnóstico especializado. Disponível em: <www.labrede.com.br>. Acesso em: 27/07/2014.

LONGHINI, R.; RAKSA, S. M.; OLIVEIRA, A.C.P.; SVIDZINSKI, T.I.E.; FRANCO S. L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista brasileira de farmacognosia**, v.17, n.3, p. 388-395, 2007.

LUSTOSA, S.R., GALINDO, A.B., NUNES, L.C.C., RANDAU, K.P.; ROLIM NETO, P.J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p. 447-454, 2008.

MAGALHÃES, M.E.C.; FREITAS, E.V.; POZZAN, R.; BRANDÃO, A.P. Novas perspectivas no tratamento de dislipidemias. **Revista da SOCERJ**, v.17, n.2, p. 105-111, 2004.

MANRIQUE, A.J.; SANTANA, W.C Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona* sp. (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) de Brasil y Venezuela. In: PINTO, L.M.A.; PRADO, N.R.T.; CARVALHO, L.B. Propriedades, usos e aplicações da própolis. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n.3, p. 76-100, 2011.

MANSUR J.S.; BREDER, M.N.R.; MANSUR, M.C.A., et al. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.61, n.4, p. 121-124, 1986.

Manual de utilização de animais/Fiocruz. Fundação Oswaldo Cruz- FIOCRUZ. Comissão de ética no uso de animais de experimentação-CEUA. Rio de Janeiro, 2008.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. In: PINTO, L.M.A.; PRADO, N.R.T.; CARVALHO, L.B. Propriedades, usos e aplicações da própolis. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 3, p. 76-100, 2011.

MARCUCCI, M.C.; Custódio A. R.; Pereira R. M. S. Própolis tipificada: um novo caminho para a elaboração de medicamentos de origem natural, contendo este produto apícola. Disponível em: < <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/90/artigo2.htm> >. Acesso em: 14/10/2014.

MARQUELE-OLIVEIRA, Franciane , Yris M. FONSECA, Sandra R. GEORGETTI, Fabiana T.M.C. VICENTINI, Viviane BRONZATI & Maria J.V. FONSECA. Evaluation of the Antioxidant Activity as an Additional Parameter to Attain the Functional Quality of Natural Extracts. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, n.3, p. 325-32, 2008.

MARTINAC, A.; FILIPOVIC-GRCIC, J.; BARBARIC, M.; ZORC, B.; VOINOVICH, D.; JALSENJAK, I. Gemfibrozil encapsulation and release from microspheres and macromolecular conjugates. **Eur. J. Pharm. Sci.** v.17, n.4-5, p. 207-216, 2002.

MELLO, P. B; SAMPEDRO, R. M. F; PICCININI, A. M. Efeitos do laser He Ne e do modo de aplicação no processo de cicatrização de queimaduras em ratos. **Fisioterapia e pesquisa**, v.14, n.2, p.6-13, 2007.

MENDONÇA, L. S. Aspectos ambientais, químicos e biológicos relacionados à própolis vermelha. 2011. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Saúde e Ambiente, Universidade Tiradentes, Aracaju, 2011.

MENDONÇA, I.C.G.; PORTO, ICCM.; NASCIMENTO, TG.; et al. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, p.15:357, 2015.

MENEZES, F. F. Avaliação da *Callendulla officinales* L. na cicatrização cutânea de cães. Aspectos clínicos, histopatológicos e histoquímico. 2006. 82 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arq. Inst. Biol.**, v. 72, n. 3, p. 405-411, 2005.

MIGUEL, L.M. Tendências do uso de produtos naturais nas indústrias de cosméticos da França. *Revista Geográfica de América Central*, Número Especial EGAL, 2011.

MORAES E AMORIM, E. A.; TORRES, C. A. A.; BRUSCHI, J. H.; FONSEXA, J. F.; GUIMARAES, J. D.; CECON, P. R.; CARVALHO, G. R. Produção e composição do leite, metabólitos sanguíneos e concentração hormonal de cabras lactantes da raça Toggenburg tratadas com somatotropina bovina recombinante. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.1, p.147-153, 2006.

MOȚ, AUGUSTIN CĂȚĂLIN, , RADU SILAGHI-DUMITRESCU, COSTEL SÂRBU. Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV-vis spectroscopic data. *Journal of Food Composition and Analysis*. Volume 24, Issues 4–5, Pages 516–522, 2011.

MOTTA, V.T. *Bioquímica Clínica para o Laboratório - Princípios e Interpretações*. 5ª ed. Medbook, 2009.

MÜLLER, J. M.; SANTOS, R. L.; BRIGIDO, R. V. Produção de Alginato por Microrganismos. **Polímeros**, v.21, n.4, p. 305-310, 2011.

MUZZARELLIA, C.; VESNA STANICC, LUIGI GOBBIC, GIORGIO TOSIB, RICCARDO A.A. MUZZARELLI. Spray-drying of solutions containing chitosan

together with polyuronans and characterisation of the microspheres. **Carbohydrate Polymers**, v.57, p. 73–82, 2004.

NASCIMENTO, C. S.; NUNES, L. C. C.; LIMA, Á. A. N.; GRANGEIRO JÚNIOR, S.; ROLIM NETO, P. J. Incremento do FPS em formulação de protetor solar utilizando extratos de própolis verde e vermelha. **Rev. Bras. Farm.**, v.90, n.4, p.334-339, 2009.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; HOLBECK, S.; SAUSVILLE, E.A. Natural products and derivatives as leads to cell cycle pathway targets in cancer chemotherapy. In: CABRAL, J.S.R. Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira. 2008. 94p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

NIE, H.; LIU, M; ZHAN, F.; GUO, M. Factors on the preparation of carboxymethylcellulose hydrogel and its degradation behavior in soil. **Carbohydrate Polymers**, v.58, p.185-189, 2004.

NIU, X.; FENG, Q.; WANG, M.; GUO, X.; ZHENG, Q. Preparation and characterization of chitosan microspheres for controlled release of synthetic oligopeptide derived from BMP-2. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, n. 4, p. 297–305, 2009.

NUNES, C. R.; BERNARDES, N. R.; GLÓRIA, L. L.; OLIVEIRA, D. B. Flavonoides em *Annonaceae*: ocorrência e propriedades biológicas. **Vértices**, v.14, n.1, p. 39-57, 2012.

NUNES, ITACIARA LARROZA AND MERCADANTE, ADRIANA ZERLOTTI. Encapsulation of lycopene using spray-drying and molecular inclusion processes. **Braz. arch. biol. technol.** [online]. vol.50, n.5 [cited 2015-11-24], pp. 893-900, 2007.

OLDONI, TATIANE LUIZA CADORIN. Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira por abelhas da espécie *Apis mellifera*. USP. Dissertação, 2007.

OLIVEIRA, Olivia Werner e PETROVICK, Pedro Ros. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Rev. bras. farmacogn.** [online]. vol.20, n.4 [citado 2015-11-17], pp. 641-650, 2010.

OKAMOTO Y, YANO R, MIYATAKE K, TOMOHIRO I, SHIGEMASA Y, MINAMI S. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. **Carbohydrate Polymers**, v.53, p.337–342, 2003.

OKAMOTO, Y.; KAWAKAMI, K.; MIYATAKE, K.; MORIMOTO, M.; SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Analgesic effects of chitin and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v.49, n.3, p. 249-252, 2002.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.4, p.641-650, 2010.

OLIVEIRA, T. C. Fósforo: função, metabolismo e recomendações. Nutrir gerais – **Revista Digital de Nutrição**, v.1, n.1, 2007.

OLIVEIRA, Inês Rosane Welter Zwirtes de; FATIBELLO-FILHO, Orlando; FERNANDES, Suellen Cadorin e VIEIRA, Iolanda Cruz. Imobilização da lacase em micropartículas de quitosana obtidas por spray drying e usadas na construção de biossensores. **Quím. Nova** [online], vol.32, n.5 pp. 1195-1201, 2009.

ORSOLIC, N.; KNEZEVIC, A.H.; SVER, L.; TERZIC, S.; BASIC, I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds, .In: LUSTOSA, S.R.; GALINDO, A.B.; NUNES, L.C.C.; RANDAU, K.P.; NETO, P.J.R. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 447-458, 2008.

ORSOLIC, N.; KNEZEVIC, A.H.; SVER, L.; TERZIC, S.; BASIC, I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p.307–315, 2004.

PAIVA, RAFAEL GONÇALVES. Obtenção e caracterização de membranas multicamadas de quitosana e alginato contendo cobre. Universidade Estadual De Campinas. 2009.

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

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. Disponível em: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/58/artigo.htm#fig4>
Acesso em: 29 de janeiro de 2015.

PAULA, V.M.B. Caracterização química e biológica do própolis da “Serra de Bornes” por TLC.2012. 89p. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar) - Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, 2012.

PAULINO, A. I. S. Estudo da aplicação de carboximetilcelulose em vinhos brancos e rosados, 2013, 34p. Dissertação de mestrado (Mestrado em Engenharia Alimentar), Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Beja, 2013.

PAULINO, N. Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato padronizado de própolis p1 e de seu principal constituinte ativo, artepillin c ®. 2005. 137 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

PAVAN, R.; JESUS, A. M.X.; MACIEL, L. M.Z. A amiodarona e a tireoide. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabolismo**, v.48, n.1, p.176-182, São Paulo, 2004.

PEREIRA, A.S; SEIXAS, F.R.M.S; AQUINO NETO, F.R, Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, Vol. 25, No. 2, 321-326, 2002.

PEREIRA, M.R.; CRUZ, L.; RÉ, M.I.; GUTERRES, S.S. Micropartículas Secas contendo Fármaco Modelo Lipofílico preparadas a partir de Suspensão Aquosa: Estudo de Formulação. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.25, n.2, p.198-205, 2006.

PEREIRA, TAIZE. Microencapsulação do óleo eugenol pelo método de spray drying. Microencapsulação do óleo eugenol pelo método de spray drying. Universidade Federal de Santa Catarina. 2007.

PETRUTA MIHAELA MATEI, PABLO MARTÍN-RAMOS, MERCEDES SÁNCHEZ-BÁSCONES, et al., "Synthesis of Chitosan Oligomers/Propolis/Silver Nanoparticles Composite Systems and Study of Their Activity against *Diplodia seriata*," **International Journal of Polymer Science**, vol. 2015, Article ID 864729, 11 pages, 2015. doi:10.1155/2015/864729

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, n.1, p.45-61, 2002.

PINTO, L. M. A.; PRADO, N. R. T.; CARVALHO, L. B. Propriedades, usos e aplicações da própolis. **Revista Eletrônica de Farmácia** Vol. VIII (3), 76 - 100, 2011.

PIRIZ, M.A.; MESQUITA, M.K.; CAVADA, C.T.; PALMA, J.P.; CEOLIN, T.; HECK, R.M. Uso de plantas medicinais: impactos e perspectivas no cuidado de enfermagem em uma comunidade rural. **Revista Eletrônica de Enfermagem**.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5216/ree.v15i4.19773>. doi: 10.5216/ree.v15i4.19773. V.15, n.4, p.992-999, 2013.

PONTIN, K.; FILHO, A.A.S.; SANTOS, F.F.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; NANAYAKKARA, N.P.; et al. In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. In: PINTO, L.M.A.; PRADO, N.R.T.; CARVALHO, L.B. Propriedades, usos e aplicações da própolis. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 3, p. 76-100, 2011.

Própolis Vermelha e sua origem botânica. Disponível em: <www.apacame.org.br/mensagemdoce/89/artigo.htm>. Acesso em: 20 de janeiro de 2015.

RAMOS, M.F.S.; SANTOS, E.P.; DELLAMORA-ORTIZ, G.M. Avaliação da Atividade Antisolar e Estudos Preliminares de Fotodegradação da Própolis. **Revista Fitos**, v.5, p.73-84, 2010.

REIS, M.C. Comportamento eletroquímico do sistema níquel(II)-carboximetilcelulose-água. (Dissertação), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

RIGHI, A. A. Perfil químico de amostras de própolis. 102p. Dissertação (Mestrado em Ciências, na área de Botânica)- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

RITA, L. P. S.; TONHOLO J.; SÁ, E. M. O. et al. Indicação geográfica da Própolis Vermelha de Alagoas: antecedentes e apropriabilidade em um sistema setorial de inovação. Disponível em: www.altec2013.org/programme_pdf/127.pdf. Acesso em 15 de janeiro de 2015.

ROBERT, P., GORENA, T., ROMERO, N., SEPULVEDA, E., CHAVEZ, J. AND SAENZ, C. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. **International Journal of Food Science & Technology**, v.45, p.1386–1394, 2010.

ROCHA, S.; PIMENTA, E.; OLIVAES, F.; CARVALHO, A.; SILVA, H.; ALVES, T. C.; PONDE, M. P. Avaliação da função tireoidiana de paciente em uso de carbamazepina. **Revista de Ciência Médica**, v.15, n.4, p.353-357, 2006.

RODRIGUES, E.R.; MORETI, D.L.C.; MARTINS, C.H.G.; KASAI, A.; STOPPA, M.A.; ALVES, E.G.; PAZ, K.; LOPES, R.A.; SALA, M.A.; PETENUSCI, S.O. Estudo de parâmetros bioquímicos em ratos sob ação de planta medicinal. [XI. *Chiococca Alba* (L.) Hitchc]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.4, p.169-172, 2006.

ROSA, M. B.; OLIVEIRA, T. G.; CARVALHO, C. A.; SILVA, F. D.; CARVALHO, L. M.; NASCIMENTO, P. C.; PERES, R. L. Estudo espectrofotométrico da atividade fotoprotetora de extratos aquosos de *Achillea millefolium*, *Brassica oleracea* var. *Capitata*, *Cyperus rotundus*, *Plectranthus barbatus*, *Porophyllum ruderale* (jacq.) cass e *Sonchus oleraceus*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.5, n.1, p.101-110, 2008.

ROSENBERG, M.; YOUNG, S. L. Whey proteins as microencapsulating agents. Microencapsulation of anhydrous milkfat-structure evaluation. **Food Structure, Chicago**, v. 12, n. 1, p. 31-41, 1993.

RUFER, C.E.; KULLING, S.E. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different *in vitro* assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.2926–2931, 2006.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E.W.; NEGREI, G.; MESSAGE, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Evidencebased Complementary and Alternative Medicine**, v.2, n.1, p.33-38, 2005.

SANTOS, L.O.M.; SIMÕES, M.L.P.B.; MACHADO, A.P.B.; MATIOSKI FILHO, G.R.; ENDO, P.C.; GRUEN, G.R.; CIPRIANI, V.R.; MESQUITA, L.D. Efeito da somatotropina sobre a cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Acta Cir Bras**. V.17, n.4, p.220-4, 2002.

SEBRAE. Cosméticos à base de produtos naturais. Estudos de mercado SEBRAE/ESPM. Novembro de 2008.

SFORCIN, J.M. Propolis and the immune system: a review. In: PAULA, V.M.B. Caracterização química e biológica do própolis da “Serra de Bornes” por TLC.2012. 89p. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar) - Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, 2012.

SILICI, S.; KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. In: MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 405-411, 2005.

SILVA, A.S.; FERNADES, E.S.; PINTO, R.M.; REIS, J.E.P.; GUERRA, M.O.; PETERS, V.M. Avaliação hematológica e bioquímica em rats prenhes tratadas com extrato de *Ginkgo biloba*. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v.2, n.3, p.81-88, 2010.

SILVA, E.J.R.; AGUIAR, F.J.S.; GONÇALVES, E.S.; SOUSA, I.M.V.; DIEMECH, G.S.; FRAGA, M.C.C.A.; COELHO, M.C.O.C.; WANDERLEY, A.C. Avaliação do

tratamento subcrônico com o extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* L. sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratos Wistar. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.2, p.88-93, 2005.

SILVA, F.C.; FAVARO-TRINDADE, C.S.; ALENCAR, S. M.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J.C C. Physicochemical properties, antioxidant activity and stability of spray-dried propolis. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v.3, n.2, p.94 – 100, 2011.

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

SITHISARN, P e GRITSANAPAN, W. Free Radical Scavenging Activity and Total Flavonoid Content of Siamese Neem Tree Leaf Aqueous Extract from Different Locations. **Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.32, n.1-2, p.31-35, 2005.

SOUZA, A. V.; FERNANDES, J. F.; TRALLI, J. B.; GALVÃO, P. Aplicação da secagem por spray drying para a produção de extratos vegetais secos. Revista Científica UNILAGO. Disponível em: <http://www.unilago.edu.br/>. Acesso em 26 de janeiro de 2015.

SOUZA, S.A.; DIAS, T.L.M.F.; SILVA, T.M.G.; FALCÃO, R.A.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S.; SILVA, E.M.S.; CAMARA, C.A.; SILVA, T.M.S. Chemical composition, antinociceptive and free radical-scavenging activities of geopropolis from *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Sociobiology** v.61, n.4, p.560-565, 2014.

SPIN-NETO, R.; PAVONE, C.; FREITAS, R. M.; MARCANTONIO, R. A. C.; MARCANTONIO-JÚNIOR, E. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 37, n. 2, p. 155-161, 2008.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 7, n. 2, 2006.

SUTTON, M. A., SCHREIER, H. W., & ORTEU, J. J. Image Correlation for Shape, Motion and Deformation Measurements: Basic Concepts, Theory and Applications. Editora Springer. 2009.

TONELI, Juliana Tófano de Campos Leite; PARK, Kil Jin; MURR, Fernanda Elizabeth Xidieh e NEGREIROS, Alessandra Alves. Efeito da umidade sobre a microestrutura da inulina em pó. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** [online]., vol.28, n.1 [citado 2015-11-17], pp. 122-131, 2008.

TOSONI, S.F.; RODRIGUES, V.C. Características físico-químicas e antioxidantes de própolis microencapsulada com diferentes tipos de materiais encapsulantes. 2013.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M. C.; MIORIN, P. L; PASIN, F. R. e TSVETKOVA, I.; Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. V. 3, N° 2, páginas 249-254, 2006.

TUROLLA, M.S.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. In: FIRMO, W.C.A.; MENEZES, V.J.M.; PASSOS, C.E.C.; DIAS, C.N.; ALVES, L.P.L.; DIAS, I.C.L.; NETO, M.S.; OLEA, R.S.G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Caderno de Pesquisa**, v. 18, n. especial, p. 289-306, 2011.

URQUIAGA, I.; LEIGHTON, F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. In: MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 405-411, 2005.

URAGAMI T.; TOKURA S, (eds.) Material Science of Chitin and Chitosan, Japan:Kodansha Ltd., Editora Springer, 2006.

VARGAS, A.C.; LOGUERCIO, A.P.; WITT, N.M.; COSTA, M.M.; SILVA, M.S.; VIANA, L.R. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.159-63, 2004.

VASCONCELOS, E.A.F.; MEDEIROS, M.G.F.; RAFFIN, F.N. and MOURA, T.F.A.L.. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil®200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius Raddi* (Anacardiaceae). **Rev. bras. farmacogn.** [online]. 2005, vol.15, n.3 [cited 2015-11-17], pp. 243-249 .

VASCONCELOS, S.M.L; GOULART, M.O.F. MOURA, J.B.F; MANFREDINI, V. e BENFATO, M.S; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 5, 1323-1338, 2007.

VIJAYALAKSHMI; MUTHULAKSHMI; SACHADANANDAM RANG, H. P.; DALE, M. M. *Farmacologia*. 6. ed. São Paulo: Elsevier, 2007.

VIOLANTE, I.M.P; SOUZA, I.M.; VENTURINI, C.L.; RAMALHO, A.F.S.; SANTOS, R.A.N.; FERRARI, M. Avaliação in vitro da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.2A, p.452-457, 2009.

WANG, Q.; HU, X.; DU, Y.; KENNEDY, J. Alginate/starch blend fibers and their properties for drug controlled release. **Carbohydrate Polymers**, v.82, p. 842-847, 2010.

WANG, W.; WENG, X.C.; CHENG D.L. Antioxidant activities of natural phenolic components from *Dalbergia odorifera* T. Chen. **Food Chemistry**, v.71, p. 45–49, 2000.

WANG, Y.; ZHU, Y.; GAO, L.; YIN, H.; XIE, Z.; WANG, D.; ZHU, Z.; HAN, X. Formononetin attenuates IL-1 β -induced apoptosis and NF- κ B activation in INS-1 cells. **Molecules**, v.24, n.17, p.10052-64, 2012.

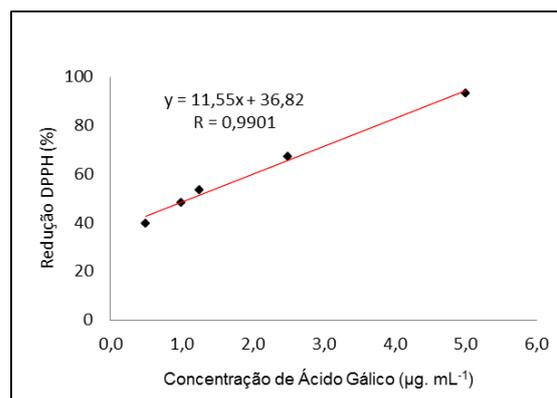
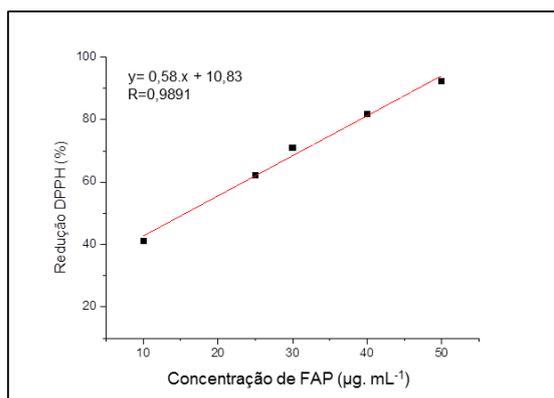
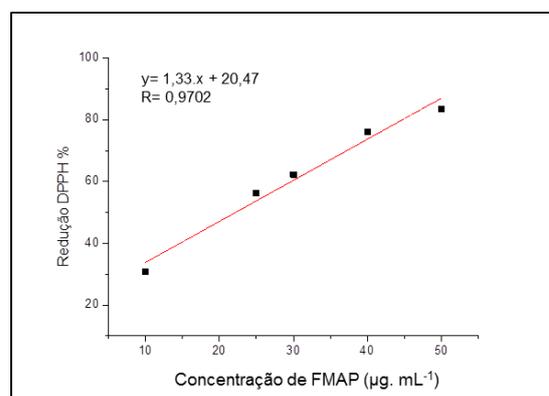
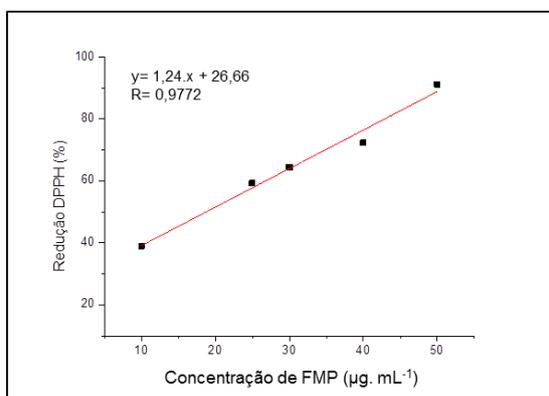
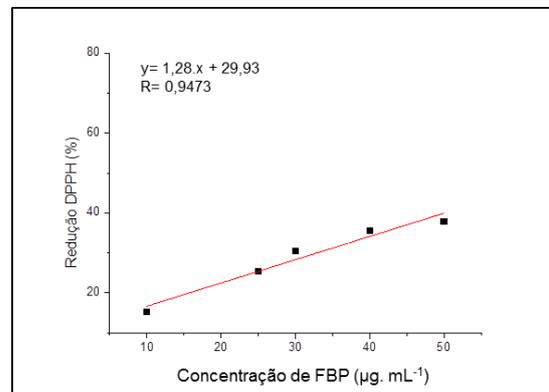
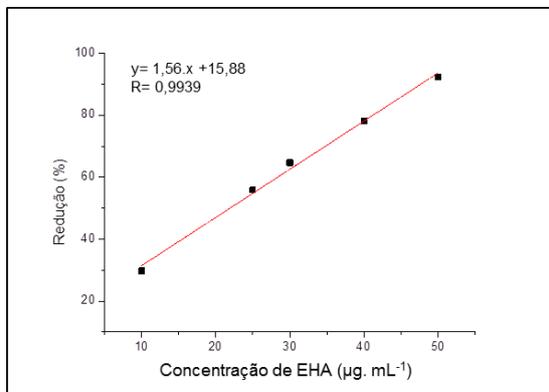
Y, L.B.; WU, Y.; CHIANG, B.; WANG, Y.; WU, W. Propolis extracts exhibit an immunoregulatory activity in an OVA-sensitized airway inflammatory animal model. In: LUSTOSA, S.R.; GALINDO, A.B.; NUNES, L.C.C.; RANDAU, K.P.; NETO, P.J.R. *Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 447-458, 2008.

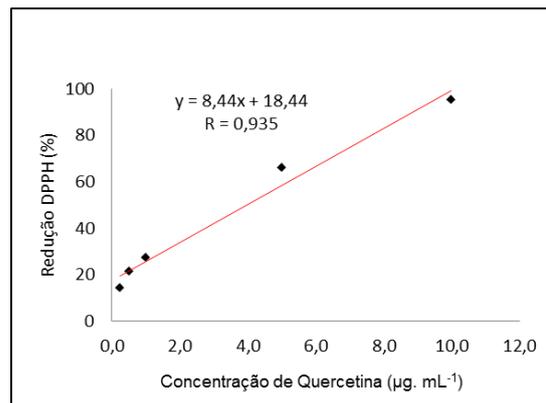
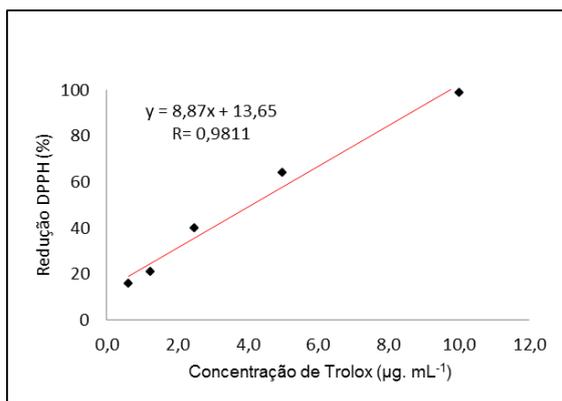
YE, Y.; HOU, R.; CHEN, J.; MO, L.; ZHANG, J.; HUANG, Y.; MO, Z. Formononetin induced apoptosis of human prostate cancer cells through ERK1/2 mitogen-activated protein kinase inactivation. **Hormone and Metabolic Research**, v.44, n.4, p.263-7, 2012.

ZACCARON, M. C.; OLIVEIRA R.V.B.; GUIOTOKU, M.; PIRES, A.T.N.; SOLDI, V. Blends of hydroxypropylmethylcellulose and poly(1-vinylpyrrolidone-co-vinyl acetate): Miscibility and thermal stability. **Polymer Degradation and Stability**, v.90, p.21-27, 2005.

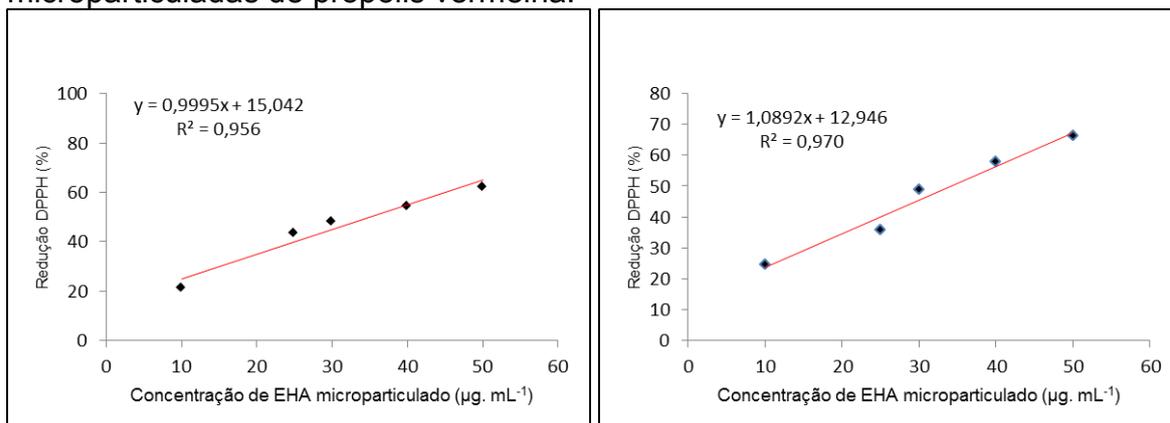
8. APÊNDICES

Apêndice A – Gráficos utilizados para a determinação do CE_{50} das amostras fluidas de própolis vermelha e dos padrões.





Apêndice B – Gráficos utilizados para a determinação do CE_{50} das amostras microparticuladas de própolis vermelha.



9. ANEXOS

Anexo A – Formulário utilizado para análise macroscópica das feridas tratadas com própolis vermelha.



PROTOCOLO DE OBSERVAÇÃO CLÍNICA E
AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DAS LESÕES



GRUPO: _____

ANIMAL: _____ MACHO () FÊMEA ()

Critérios	Dias pós-operatório				
	D0 (12/03)	3º (15/03)	7º (19/03)	14º (26/03)	21º (02/04)
1 – Peso					
2 – Temperatura					
3 – Aspecto geral do animal					
4 – Tamanho da Lesão					
5 – Tecido de Granulação	Ausente				
	Presente				
6 – Extensão da crosta (total, parcial ou ausente)					
7 – Inflamação	Ausente				
	Presente				
8 – Hemorragia	Ausente				
	Presente				
9 – Cor da lesão OU NECROSE					
10 – Exsudato	Ausente				
	Presente				

Anexo B – Formulário utilizado para análise microscópica das feridas tratadas com própolis vermelha.



PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DAS LESÕES



GRUPO: _____

ANIMAL: _____ MACHO () FÊMEA ()

Variáveis	Dias pós-operatório			
	3º (15/03)	7º (19/03)	14º (26/03)	21º (02/04)
1 – Fibrina				
2 – Hemorragia				
3 – Hiperemia				
4 – Infiltrado inflamatório				
5 – Grau de proliferação vascular				
6 – Células mononucleares e polimorfonucleares				
7 – Fibroblastos				
8 – Hiperplasia epitelial	-	-		
9 – Reepitelização	Total	-	-	
	Parcial	-	-	
10 – Fibras colágenas				

Escores:

Ausente (0)

Discreto (1 a 25%)

Moderado (25 a 50%)

Intenso (acima de 50%)

3 e 7º DPO – Fibrina, hemorragia, hiperemia, infiltrado inflamatório, grau de proliferação vascular, células e mononucleares e polimorfonucleares e fibroblastos.

14ºDPO – Hiperplasia epitelial

Anexo C – Parecer de aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da UFAL na experimentação com Animais e Humanos.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Maceió – AL, 21/01/2013

Senhor (a) Pesquisador (a), Adriana Santos Ribeiro
Valter Alvino da Silva

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), em 18/01/2013 e com base no parecer emitido pelo (a) relator (a) do processo nº **013852/2011-79** sob o título, **Desenvolvimento de preparação de uso tópico a base de micropartículas própolispolímero para avaliação das atividades fotoprotetora, antioxidante, cicatrizante e repelente**, vem por meio deste instrumento comunicar a aprovação do processo supra citado, com base no item VIII.13, b, da Resolução nº 196/96.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 196/96, item V.4).

É papel do(a) pesquisador(a) assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e sua justificativa. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o (a) pesquisador (a) ou patrocinador(a) deve enviá-los à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem incluídas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item IV. 2.e).

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos no Cronograma do Protocolo e na Res. CNS, 196/96.

Na eventualidade de esclarecimentos adicionais, este Comitê coloca-se a disposição dos interessados para o acompanhamento da pesquisa em seus dilemas éticos e exigências contidas nas Resoluções supra - referidas.

Esta aprovação não é válida para subprojetos oriundos do protocolo de pesquisa acima referido.

(*) Áreas temáticas especiais

Válido até: janeiro de 2014

Profª Drª Deise Juliana Francisco
Secretária do Comitê de
Ética em Pesquisa UFAL