

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS QUÍMICOS E
BIOTECNOLÓGICOS**

DEISY KARINA ARENHART

**DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE EXTRATO E FRAÇÕES DE
PRÓPOLIS VERDE, PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E APLICAÇÃO EM
EMULSÕES COSMÉTICAS**

DISSERTAÇÃO

**TOLEDO
2017**

DEISY KARINA ARENHART

**DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE EXTRATO E FRAÇÕES DE
PRÓPOLIS VERDE, PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E APLICAÇÃO EM
EMULSÕES COSMÉTICAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Processos Químicos e Biotecnológicos, do Programa de Pós Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Área de Concentração: Processos Químicos e Biotecnológicos.

Orientadora: Profa Dra. Tatiana Shioji Tiuman

Coorientadora: Profa Dra. Solange Maria Cottica

**TOLEDO
2017**

TERMO DE APROVAÇÃO

DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE EXTRATO E FRAÇÕES DE PRÓPOLIS VERDE, PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E APLICAÇÃO EM EMULSÕES COSMÉTICAS

Por

DEISY KARINA ARENHART

Essa dissertação foi apresentada às treze e trinta horas do dia três de maio de dois mil e dezessete, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Processos Químicos e Biotecnológicos, Linha de Pesquisa Processos Biotecnológicos, no Programa de Pós Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos – PPGPQB, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Tatiana Shioji Tiuman (Orientadora)
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Profa. Dra. Solange Maria Cottica (Co-orientadora)
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – PPGPQB

Prof. Dr. Ricardo Fiori Zara
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Euclides Lara Cardozo Júnior
Universidade Paranaense

“O termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Programa”.

Aos meus pais, Dária e Carlos, meus maiores exemplos, por terem me mostrado a direção correta e me ensinarem a jamais desistir diante das dificuldades.

Ao meu amor, Jonatha, pela cumplicidade e incentivo tão essenciais neste caminho trilhado.

Esta conquista é dedicada a vocês!

Agradecimentos

Creio que sempre que concluimos os nossos trabalhos acadêmicos, sentimos um prazer enorme ao redigir os agradecimentos, pois é o momento em que nos lembramos das pessoas amigas e dos familiares que estiveram próximos apoiando e acompanhando as dúvidas, os medos, as angústias e, também, os momentos de alegria e contemplação das nossas próprias reflexões e elaborações.

Certamente precisaria elencar aqui muitas das pessoas que são co-responsáveis por esse trabalho. Primeiramente, os meus pais Dária e Carlos, aos quais devo absolutamente tudo o que sou e conquistei até hoje. Sou muito grata por terem me ensinado, desde criança, a sempre dar o melhor de mim em tudo que faço. Obrigada por entenderem todas as vezes em que não pude estar por perto devido às atividades do mestrado. Amo vocês incondicionalmente.

Também agradeço à minha irmã Daiane, por ser minha amiga, ouvir meus desabafos e me aconselhar sempre que precisei. Ao meu “irmãozinho” Luís Gustavo, pelo amor que transmite toda vez que me dá um abraço apertado.

Ao meu primo Marcos, por me ajudar a não enlouquecer com seu jeito brincalhão de ser, me fazendo dar risada mesmo nos momentos difíceis.

A presença de uma pessoa em especial foi essencial para chegar até aqui: o meu namorado Jonatha, que esteve sempre ao meu lado acreditando, colaborando e oferecendo todo o suporte emocional e afetivo necessário. Obrigada por me fazer acreditar que posso mais do que eu imagino. Aqui e para sempre eternizo a minha enorme felicidade em poder compartilhar com essa pessoa tão incrível os momentos mais marcantes da minha vida.

A minha orientadora, Professora Doutora Tatiana Shioji Tiunan, que merece todo o meu respeito e reconhecimento. Sou grata por sua dedicação, competência e especial atenção nas revisões e sugestões, fatores fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Também agradeço minha coorientadora Professora Doutora Solange Maria Cottica, que me auxiliou nos momentos em que minha orientadora não se pôde fazer presente, bem como nas correções que contribuíram para a finalização deste trabalho.

Grata também a todos os professores do mestrado que de uma forma ou de outra contribuíram para minha formação. Em especial professor Clayton Antunes

Martins e Ricardo Fiori Zara, que corrigiram e deram muitas sugestões importantes na etapa de qualificação, auxiliando na conclusão deste trabalho da melhor maneira possível.

Aos meus colegas do mestrado, a parceria de vocês principalmente no início, quando passamos pelas disciplinas obrigatórias, foi fundamental. Em especial à Erica, Daieni e Andressa que estiveram mais próximas na reta final, compartilhando as angústias e dando estímulo a seguir em frente.

Felizmente tenho também muitos amigos, pessoas com as quais convivo e tenho a felicidade e o orgulho de poder contar sempre que preciso. Não citarei nomes, mas sou grata a vocês por todas as vezes que entenderam a minha ausência e também por todos os momentos que passamos juntos, pelos abraços e demonstrações de amor e carinho que foram e são de extrema importância para seguir em frente com ainda mais motivação.

Sou muito grata à UNISEP, por permitir minha ausência no trabalho para realizar as atividades do mestrado e também por disponibilizar os laboratórios para a execução dos meus experimentos.

Deixo também meu agradecimento especial às minhas colegas de trabalho, especialmente Tayná, pelo apoio em todos os aspectos, tanto emocional, me ouvindo e dando conselhos, como também pelo suporte no laboratório para que eu conseguisse concluir a dissertação.

Agradeço também àqueles que, apesar de não citados aqui, direta ou indiretamente me incentivaram, auxiliaram ou facilitaram a realização deste trabalho.

Para finalizar, agradeço a Deus, razão da minha existência, por ter colocado todas estas pessoas especiais ao meu lado, sem as quais certamente eu não teria conseguido chegar até aqui.

RESUMO

ARENHART, D.K. Determinação de compostos bioativos de extrato e frações de própolis verde, propriedades biológicas e aplicação em emulsões cosméticas. 2017. 87f. Dissertação (Mestrado em Processos Químicos e Biotecnológicos) – Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Toledo.

Própolis é uma substância resinosa produzida por abelhas, com composição química variada, destacando-se os compostos fenólicos e flavonoides, que conferem suas atividades biológicas, como antioxidante e antimicrobiana. A aplicação de matérias-primas de origem natural em cosméticos é uma tendência promissora do mercado, visto os potenciais benefícios à saúde e possível eficácia em minimizar os fenômenos de degradação durante as fases de processamento e armazenagem. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar o teor de compostos bioativos e atividades biológicas de extrato e frações de própolis verde, com aplicação em emulsões cosméticas. Para tanto, obteve-se o extrato bruto etanólico (EBE) e, por extração líquido-líquido, as frações hexano (F-HEX), acetato de etila (F-ACT) e aquosa (F-AQ) de própolis verde e então se determinou os teores de compostos fenólicos totais (CFT) e flavonoides (FLA) por espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD). Ainda, avaliou-se a atividade antioxidante por três métodos (DPPH, ABTS e FRAP) e a atividade antimicrobiana por concentração inibitória mínima (CIM). Avaliada a fração com melhores resultados, foi construída curva de morte bacteriana a fim de verificar o tempo necessário para inibição ou morte microbiana. Aplicou-se esta fração em uma emulsão O/A não-iônica a fim de verificar sua influência na estabilidade do produto elaborado, observado através dos ensaios de estabilidade preliminar e acelerada. Obteve-se os melhores resultados na F-ACT, com média para CFT de 138,41 mg EAG g⁻¹ e FLA de 85,84 mg EQ g⁻¹ e para atividade antioxidante 1160,17 μmol ET g⁻¹ (DPPH), 1023,30 μmol ET g⁻¹ (ABTS) e 2020,22 μmol de Fe (II) g⁻¹ (FRAP). As CIM mais efetivas foram obtidas frente às bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* MRSA (5,0 mg mL⁻¹ e 10,0 mg mL⁻¹, respectivamente) e frente a levedura *Candida albicans* (2,5 mg mL⁻¹). Por HPLC identificou-se 4 compostos, sendo estes os ácidos fenólicos cafeico, *p*-cumárico e flavonoides pinocembrina e crisina, com maiores concentrações de ácido *p*-cumárico e cafeico na F-ACT. No teste de cinética de morte microbiana, todos os microrganismos apresentaram redução no crescimento com o decorrer do tempo expostos à F-ACT de própolis em CIM e CIM*2, caracterizando atividade microbicida e/ou microbiostática. Com a incorporação da F-ACT, obteve-se emulsões com aspecto homogêneo, com coloração e odor característico de própolis, e que submetidas aos testes de estabilidade preliminar mantiveram-se estáveis do ponto de vista físico-químico, indicando compatibilidade entre os componentes da formulação. Nos testes de estabilidade acelerada, as emulsões controle (sem conservante) e contendo F-ACT 0,2 % não se mantiveram estáveis durante os 60 dias, apresentando alterações físico-químicas e/ou microbiológicas. Todavia, as emulsões contendo 2,0 % de própolis mantiveram-se estáveis durante todo o período compreendido pelo estudo, indicando que possuem potencial aplicação como conservantes dos produtos analisados.

Palavras-chave: extração líquido-líquido; compostos bioativos; atividade antioxidante; atividade antimicrobiana; estudo de estabilidade

ABSTRACT

ARENHART, D.K. Determination of bioactive compounds of extracts and fractions of green propolis, biological properties and application in cosmetic emulsions. 2017. 87f. Dissertation (Master's Degree in Chemical and Biotechnological Processes) – Graduate Program in Chemical and Biotechnological Processes, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Toledo

Propolis is a resinous substance produced by bees, with a varied chemical composition, especially phenolic and flavonoid compounds, which give its biological activities, as antioxidant and antimicrobial. The application of raw materials of natural origin to cosmetics is one of the promising trends in the market, given the potential health benefits and possible efficacy in minimizing the phenomena of degradation during the processing and storage phases. Thus, the objective of this study was to determine the content of bioactive compounds and biological activities of extract and fractions of green propolis, with application in cosmetic emulsions. The crude ethanolic extract (CEE) and, by liquid-liquid extraction, the green propolis hexane (F-HEX), ethyl acetate (ACT-F) and aqueous (AQ-F) fractions were obtained. The total phenolic compounds (TFC) and flavonoids (FLA) were determined by spectrophotometry and high performance liquid chromatography (HPLC-DAD). In addition, it was to evaluate antioxidant activity by three methods (DPPH, ABTS e FRAP) and antimicrobial activity by minimum inhibitory concentration (MIC). Evaluating the fraction with better results, A bacterial death curve was constructed to verify the time required for inhibition or microbial death. This fraction was then applied to a nonionic O/W emulsion in order to verify its influence on the stability of the processed product as observed through the preliminary and accelerated stability tests. The best results were obtained in ACT-F, with a mean for TFC of 138.41 mg EAG g⁻¹ and FLA of 85.84 mg EQ g⁻¹ and for antioxidant activity 1160.17 μmol TE g⁻¹ (DPPH), 1023.30 μmol TE g⁻¹ (ABTS) and 2020.22 μmol Fe (II) g⁻¹ (FRAP). The most effective MICs were obtained against Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus aureus* MRSA (5.0 mg mL⁻¹ and 10.0 mg mL⁻¹, respectively) and against yeast *Candida albicans* (2.5 mg mL⁻¹). By HPLC, 4 compounds were identified: the caffeic and *p*-coumaric phenolic acids and flavonoid pinocembrina and chrysin, with the highest concentrations of *p*-coumaric and caffeic acid in ACT-F. In the microbial death kinetics test, all microorganisms showed reduced growth over time in exposure to ACT-F of própolis in MIC and MIC*2, characterizing microbicidal and/or microbiostatic activity. With the incorporation of ACT-F, emulsions with a homogeneous appearance and characteristic odor of propolis were obtained and, subjected to the preliminary stability tests, they remained stable from a physico-chemical point of view, indicating compatibility between the components. In the accelerated stability tests, the control emulsions (without preservative) and containing 0.2 % ACT-F did not remain stable during the 60 days, presenting phycico-chemical and/or microbiological alterations However, emulsions containing 2.0 % própolis remained stable throughout the study period, indicating that they have potential application as preservatives of the products analyzed.

Keywords: Liquid-liquid extraction; bioactive compounds; antioxidant activity; antimicrobial activity; stability study.

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AMH – Ágar Mueller Hinton
ABTS - 2,2'-azino bis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfonado
ASD – Ágar Sabouraud Dextrose
ATCC – American Type Culture Collection
ATP – Adenosina trifosfato
BHT – Di-terc-butil metil fenol
CFT – Compostos fenólicos totais
CIM – Concentração inibitória mínima
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
CLSI - Clinical & Laboratory Standards Institute
CMH – Caldo Mueller Hinton
CSD – Caldo Sabouraud Dextrose
CTT – Ácido 2,3,5-trifeniltetrazólio
DAD – detector de arranjo de diodos
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DPPH – Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EBE – Extrato bruto etanólico
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
ELL – Extração líquido-líquido
EROs – Espécies reativas de oxigênio
F-ACT – Fração acetato de etila
F-AQ – Fração aquosa
F-HEX – Fração hexânica
FC – Folin Ciocalteau
FLA – Flavonoides
FRAP – Poder antioxidante de redução do ferro
HCl – Ácido clorídrico
IP – Índice de Peróxidos
KI – Iodeto de Potássio
mEq – Miliequivalente
mg – Miligrama

mL – Mililitros

mmol – Milimol

MOPS – Ácido 3-(n-morfolino) propanosulfônico

nm – Nanômetro

pH – Potencial hidrogeniônico

ppm – Parte por milhão

RL – Radical livre

rpm – Rotações por minuto

RPMI - Roswell Park Memorial Institute médium

TPTZ – 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina

TR – Tempo de retenção

TROLOX – Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico

UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

UV - Ultravioleta

μmol – Micromol

μHg – Micrômetros de mercúrio.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Própolis marrom (A), amarela (B), verde (C) e vermelha (D).....	21
Figura 2 – Estrutura básica dos flavonoides (A) e ácido cafeico, um exemplo de ácido fenólico presente na própolis (B)	24
Figura 3 – Fluxograma geral de partição e separação provável dos principais metabólitos secundários presentes em plantas.....	25
Figura 4 – Grupamento prenil (3-metil-but-2-en-1-il)	29
Figura 5 – Tempo de morte microbiana após exposição das bactérias e levedura à F-ACT de própolis em CIM e CIM*2 durante o período de 24 horas.....	51
Figura 6 – Cromatograma do mix de padrões (ácidos fenólicos e flavonoides) preparados a $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$	53
Figura 7 - Cromatogramas do extrato bruto etanólico (EBE), fração acetato de etila (F-ACT) e fração hexânica (F-HEX) e comparações entre os picos dos padrões de referência (linha azul) com os compostos identificados nas amostras (linha vermelha)	54
Figura 8 - Estrutura química dos flavonoides crisina(A), pinocembrina(B) e ácidos fenólicos p-cumárico(C) e cafeico(D) identificados nas amostras analisadas por CLAE-DAD	57
Figura 9 - Valores de pH das amostras armazenadas em temperatura de $50,0 \pm 2,0$ °C (A) e $-10,0 \pm 2,0$ °C (B) durante os 15 dias dos ensaios de estabilidade preliminar.	62
Figura 10 - Valores de espalhabilidade ($\text{mm}^2 \text{ g}^{-1}$) das amostras armazenadas em temperatura de $50,0 \pm 2,0$ °C, (A) e $-10,0 \pm 2,0$ °C (B) durante os 15 dias dos ensaios de estabilidade preliminar.	63
Figura 11 - Valores de densidade (g cm^{-3}) das amostras armazenadas em temperatura de $50,0 \pm 2,0$ °C (A) e $-10,0 \pm 2,0$ °C (B) durante os 15 dias dos ensaios de estabilidade preliminar.....	64
Figura 12 - Variação no pH das formulações (F1, F2, F3, F4 e F5) armazenadas nas condições de $40,0 \pm 2,0$ °C (A), exposição à radiação ultravioleta (B) e $5,0 \pm 2,0$ °C (C) durante os 60 dias dos ensaios de estabilidade acelerada.	66
Figura 13 - Variação no índice de peróxidos (mEq Kg^{-1}) das formulações (F1, F2, F3, F4 e F5) armazenadas nas condições de $40,0 \pm 2,0$ °C (A), exposição à radiação	

ultravioleta (B) e $5,0 \pm 2,0$ °C (C) durante os 60 dias dos ensaios de estabilidade acelerada.....67

Figura 14 - Variação nos valores de densidade (g cm^{-3}) das formulações (F1, F2, F3, F4 e F5) armazenadas nas condições de $40,0 \pm 2,0$ °C (A), exposição à radiação ultravioleta (B) e $5,0 \pm 2,0$ °C (C) durante os 60 dias dos ensaios de estabilidade acelerada.....68

Figura 15 - Variação nos compostos fenólicos totais (CFT) (mg EAG g^{-1}) das formulações (F1, F2, F3, F4 e F5) armazenadas nas condições de $40,0 \pm 2,0$ °C (A), exposição à radiação ultravioleta (B) e $5,0 \pm 2,0$ °C (C) durante os 60 dias dos ensaios de estabilidade acelerada.70

Figura 16 - Variação na espalhabilidade ($\text{mm}^2 \text{g}^{-1}$) das formulações (F1, F2, F3, F4 e F5) armazenadas nas condições de $40,0 \pm 2,0$ °C (A), exposição à radiação ultravioleta (B) e $5,0 \pm 2,0$ °C (C) durante os 60 dias dos ensaios de estabilidade acelerada.....72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição das formulações cosméticas preparadas com fração de própolis verde (F-ACT) com finalidade antioxidante (F3), antibacteriana (F4), antioxidante + antibacteriana (F5) e controles com conservantes sintéticos (F1) e sem conservantes (F2).....	39
Tabela 2 – Teores médios de compostos fenólicos totais (CFT), flavonoides (FLA) e atividade antioxidante (AA) pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP no extrato bruto (EBE) e frações (F-HEX, F-ACT e F-AQ) de própolis verde.....	46
Tabela 3 – Resultados de concentração inibitória mínima (CIM) do extrato bruto (EBE) e frações (F-HEX, F-ACT, F-AQ) de própolis verde frente a bactérias (<i>S. aureus</i> , <i>S. aureus</i> MRSA, <i>E. coli</i> , <i>S. Typhi</i> e <i>P. aeruginosa</i>) e à levedura (<i>C. albicans</i>).....	49
Tabela 4 – Tempo de retenção (TR) (minutos), dados de calibração externa dos padrões (equação da reta e R^2) e concentração (mg g^{-1}) dos compostos identificados no extrato bruto etanólico (EBE), fração acetato de etila (F-ACT) e fração hexânica (F-HEX) de própolis verde.....	55
Tabela 5 - Parâmetros avaliados nas formulações controle com conservantes sintéticos e sem conservantes (F1 e F2, respectivamente) e testes como antioxidante antimicrobiano e antioxidante + antimicrobiano (F3, F4 e F5, respectivamente) após 24 horas do preparo, considerado tempo zero (T0)	58
Tabela 6 - Comparação dos parâmetros avaliados nas formulações controle com conservantes sintéticos e sem conservantes (F1 e F2, respectivamente) e testes (F3, F4 e F5) antes e após centrifugação.....	59
Tabela 7 - Comparação dos parâmetros avaliados nas formulações controle com conservantes sintéticos e sem conservantes (F1 e F2, respectivamente) e testes como antioxidante, antimicrobiano e antioxidante + antimicrobiano (F3, F4 e F5, respectivamente) antes e após estresse térmico.	59
Tabela 8 - Avaliação das características organolépticas durante os 15 dias ensaios de estabilidade preliminar à temperatura de $50,0 \pm 2,0$ °C em estufa.....	60
Tabela 9 - Avaliação das características organolépticas durante os 15 dias de ensaios de estabilidade preliminar à temperatura de $-10,0 \pm 2,0$ °C em freezer.	60

Tabela 10 - Parâmetros avaliados nas formulações controle com conservante e sem conservante (F1 e F2, respectivamente) e testes (F3, F4 e F5) logo após o preparo, considerado tempo zero (T0)65

Tabela 11 - Avaliação das características organolépticas durante os 60 dias dos testes de estabilidade acelerada à temperatura de $40,0 \pm 2,0$ °C em estufa (condição A), exposição à radiação ultravioleta (condição B) e temperatura de $5,0 \pm 2,0$ °C em refrigerador (condição C).....70

Tabela 12 - Avaliação microbiológica qualitativa das formulações (F1, F2, F3, F4 e F5) após 60 dias de exposição à temperatura de $40,0 \pm 2,0$ °C em estufa (condição 1), exposição à radiação ultravioleta (condição 2) e temperatura de $5,0 \pm 2,0$ °C em refrigerador (condição 3).72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classes de compostos presentes na própolis.	21
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo Geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1. Própolis	20
3.1.2. Composição química.....	21
3.2. Extração líquido-líquido	24
3.3. Atividades biológicas	26
3.2.1. Atividade antioxidante	27
3.2.2. Atividade antimicrobiana	28
3.3. Emulsões	29
3.3.1. Estabilidade das emulsões.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1. Coleta da própolis verde	32
4.2. Obtenção do extrato bruto e frações de própolis verde	32
4.3. Determinação da atividade antioxidante do extrato e frações de própolis verde	32
4.3.1. Capacidade de captura do radical DPPH [•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)	32
4.3.2. Capacidade antioxidante frente ao radical livre ABTS ^{•+} (2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolína-6-sulfonado)	33
4.3.3. Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP)	34
4.4. Determinação de compostos fenólicos totais no extrato e frações de própolis verde	34
4.5. Determinação do teor de flavonoides no extrato e frações de própolis verde	35
4.6. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)	35
4.7. Determinação da atividade antimicrobiana do extrato e frações de própolis verde	36
4.7.1. Padronização dos inóculos.....	36
4.7.2. Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	37

4.8. Determinação da cinética de morte microbiana frente à F-ACT de própolis verde.....	38
4.9. Determinação do pH da fração (F-ACT) de própolis incorporada nas emulsões.....	38
4.10. Preparo das emulsões	38
4.11. Avaliação da estabilidade das emulsões	39
4.11.1. Testes de Estabilidade Preliminar	40
4.11.1.1. Centrifugação	40
4.11.1.2. Estresse Térmico.....	40
4.11.1.3. Parâmetros avaliados.....	41
4.11.1.3.1. Características organolépticas	41
4.11.1.3.2. pH.....	41
4.11.1.3.3. Espalhabilidade	42
4.11.1.3.4. Densidade	42
4.11.2. Testes de Estabilidade acelerada	43
4.11.2.1. Determinação do Índice de Peróxidos (IP)	43
4.11.2.2. Determinação de Compostos Fenólicos Totais (CFT) nas emulsões.....	44
4.11.2.3. Avaliação microbiológica qualitativa nas emulsões	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1. Rendimento, compostos bioativos e atividade antioxidante	46
5.2. Atividade antimicrobiana.....	48
5.3. Cinética de morte microbiana	51
5.4. Análise por CLAE-DAD	53
5.5. Testes de estabilidade preliminar	57
5.6. Testes de Estabilidade Acelerada.....	65
6. CONCLUSÃO	74
7. REFERÊNCIAS	76

1. INTRODUÇÃO

Própolis é um material resinoso produzido por abelhas da espécie *Apis mellifera* a partir de brotos, flores e exsudados de plantas, onde são acrescentadas secreções salivares para elaboração do produto final. Sua composição química varia de acordo com diversos fatores, como tipo de planta visitada pelas abelhas, estação do ano e espécie de abelhas (VARGAS et al., 2004; CABRAL et al., 2009).

Por esse motivo, a própolis possui mais de 200 substâncias identificadas, incluindo os compostos fenólicos, considerados seus principais compostos bioativos. Os flavonoides constituem os principais compostos fenólicos encontrados na própolis, sendo responsáveis pela maior parte dos efeitos biológicos atribuídos a esta substância (COTTICA, 2013; MELLO, 2013; FUJIMOTO, 2016). Da mesma forma, os extratos de uma mesma própolis podem apresentar composição química variada, dependendo do solvente utilizado, da concentração da própolis e do método de extração (COTTICA et al., 2011).

A própolis pode apresentar cores que variam de amarelo-esverdeado até marrom-escuro, de acordo com o material botânico que a origina. A própolis verde contém exsudados de alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) e se destaca pela presença majoritária dos ácidos fenólicos *p*-cumárico, clorogênico e cafeico e flavonoides artepelin C e bacarina. Estes e outros vários compostos presentes têm demonstrado potencial aplicação associada a diferentes efeitos biológicos, destacando-se as atividades antioxidante, imunossupressora, anticarcinogênica e antimicrobiana. A utilização de extratos de própolis verde como antimicrobianos alternativos, pode apresentar vantagens em relação aos demais grupos de própolis, especialmente em virtude da sua composição fenólica diferenciada (LUSTOSA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2012; FUJIMOTO, 2016; SALGUEIRO; CASTRO, 2016).

A aplicação de matérias-primas de origem vegetal em diversos produtos é uma das tendências promissoras do mercado consumidor, que tem se tornado cada vez mais exigente e criterioso com a qualidade dos produtos que consome. É cada vez maior a preocupação em fazer uso de produtos menos agressivos, de origem natural ou o mais próximo possível disto e esta é a realidade a que está se submetendo a indústria cosmética. Neste sentido, tem-se buscado a formulação de produtos naturais, sem inclusão ou em menores teores de matérias-primas

sintéticas, para conservação do produto final, por exemplo (ALLEN, POPOVICH; ANSEL, 2007; PACKER; DA LUZ, 2007; OLIVEIRA, 2007; BALOGH, 2011).

Dentre as preparações semi-sólidas, os sistemas emulsionados são amplamente utilizados em formulações destinadas à aplicação tópica, pois apresentam várias vantagens sob o ponto de vista farmacêutico, como facilidade de aplicação, espalhabilidade sobre a pele e facilidade de veiculação de princípios ativos (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007; BALOGH, 2011). Consistem de misturas termodinamicamente instáveis de dois líquidos (óleo e água) praticamente imiscíveis, que apresentam uma estabilidade aceitável pela ação de um agente emulsificante. Portanto, no desenvolvimento de uma emulsão para uso farmacêutico/cosmético existe o desafio de produzir um sistema que permanecerá estável durante a vida útil do produto (OLIVEIRA, 2007; SOUZA; CAMPOS; PACKER, 2013).

Os ensaios de estabilidade de produtos cosméticos visam determinar o comportamento das formulações durante meses ou anos, submetendo-os a diferentes condições de armazenamento. Os parâmetros analisados podem ser determinados pelo próprio formulador, entretanto, são comumente avaliadas as características organolépticas (cor, odor, aspecto), parâmetros físico-químicos (pH, viscosidade, espalhabilidade, densidade ou componentes da formulação) e parâmetros microbiológicos, segundo o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2004; MARIOTTI; FRASSON, 2011).

Apesar das já comprovadas ações da própolis justificarem o uso dos seus extratos pela indústria cosmética, existe a necessidade de estudos científicos que comprovem os benefícios destes componentes quando adicionados em diferentes formulações, tanto agregando atividades biológicas quanto minimizando os fenômenos de degradação durante as fases de processamento e armazenagem (SIMOES et al., 2007; DAL'BELO, 2008; IHA et al., 2008).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Determinar o teor de compostos bioativos e atividades biológicas de extrato e frações de própolis verde, com aplicação em emulsões cosméticas.

2.2. Objetivos específicos

- Preparar extrato bruto etanólico (EBE) de própolis verde.
- Obter frações de própolis verde por separação líquido-líquido com solventes de diferentes polaridades.
- Quantificar, por métodos espectrofotométricos, compostos fenólicos totais (CFT) e flavonoides (FLA) no extrato e frações de própolis verde.
- Determinar a atividade antioxidante do extrato e frações de própolis verde pelos métodos DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), ABTS (2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato) e FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro).
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato e frações de própolis verde através dos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM).
- Identificar e quantificar compostos presentes no extrato bruto e frações de própolis verde por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD).
- Determinar o tempo de morte microbiana dos microrganismos testados frente ao extrato ou fração a ser incorporado nas emulsões.
- Preparar emulsões óleo em água (O/A) não-iônicas e incorporar o extrato ou fração que apresentar os melhores resultados nos testes prévios.
- Submeter as emulsões preparadas aos testes de estabilidade preliminar e acelerada.
- Monitorar os teores de compostos fenólicos totais (CFT) e índice de peróxidos (IP) durante os ensaios de estabilidade.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Própolis

A palavra própolis é proveniente do grego, onde “pro” denota “em defesa de” e “polis” designa “cidade”, ou seja, “em defesa da cidade”, ou da colmeia. A própolis sempre foi considerada um produto de propriedades especiais para a saúde humana, sendo que já é conhecida e empregada pelo homem desde a antiguidade. O uso desta substância já era descrito pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios. No primeiro texto médico, conhecido por "Livro de produção de Medicamentos para todas as partes do Corpo Humano", narrado no papiro de Ebers e escrito cerca de 1.700 anos antes de Cristo, se faz menção à própolis como produto medicinal. No antigo Egito era utilizada como um dos materiais para embalsamar os mortos ("cera negra") (PEREIRA et al., 2002; ADELMANN, 2005; PAULA, 2012).

Trata-se de uma mistura complexa formada por substâncias resinosas, gomas e balsâmicas, extraídas por abelhas de brotos, flores e exsudatos de materiais vegetais, às quais adicionam secreção salivar, cera e pólen para a elaboração do produto final (FUNARI; FERRO, 2006; LUSTOSA et al., 2008; CABRAL et al., 2009). É composto predominantemente por resinas e bálsamos, que representam 55%, enquanto 30% da composição da própolis é cera de abelha, 8 a 10% óleos essenciais e 5% pólen e outros compostos orgânicos, além de microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e pequenas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E (LUSTOSA et al., 2008; MELLO, 2013).

A própolis bruta pode apresentar coloração e consistência variada, conforme pode ser observado na Figura 1, e se encontra no estado sólido, sendo dura a 15 °C e maleável a partir dos 30 °C. É utilizada pelas abelhas dentro da colmeia para preencher as cavidades e frestas, reparar danos, regular a temperatura, reduzir as dimensões da entrada, desinfetar a colmeia e os alvéolos onde é feita a postura dos ovos e cobrir qualquer animal ou inseto morto que seja demasiadamente grande para ser carregado para fora, evitando que ocorra a putrefação da colmeia (RAMOS; MIRANDA, 2007; MELLO, 2013).

Figura 1- Própolis marrom (A), amarela (B), verde (C) e vermelha (D).



Fonte: (BALOGH, 2011).

3.1.2. Composição química

A composição química da própolis depende da biodiversidade da região em que as abelhas se encontram, sua variabilidade genética e o período de coleta da resina, sendo que há mais de 200 compostos identificados (HAYACIBARA et al., 2005; HU et al., 2005; LUSTOSA et al., 2008; MIGUEL et al., 2014). Os compostos gerais presentes na própolis estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1 – Classes de compostos presentes na própolis (continua)

Estrutura básica / classe	Compostos
Álcoois	Metanol benzeno; álcool cinamílico, glicerol, α -glicerofosfato, hidroquinona, isobutenol, álcool fenetil, álcool prenil.
Aldeídos	Benzaldeído, aldeído caproico, <i>p</i> -hidroxibenzaldeído, isovanilina, protocatechualdeído, vanilina.
Ácidos alifáticos e ésteres alifáticos	Ácido acético, ácido angelico, ácido butírico, ácido crotonic, ácido fumárico, ácido isobutírico, ácido metilbutírico, acetato de isobutila, acetato de isopentila, acetato de isopentenila.
Aminoácidos	Alanina, β -alanina, ácido α -amino butírico, ácido δ -amino butírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, cistina, cisteína, ácido glutâmico, glicina, histidina, hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, ornitina, fenilalanina, prolina, ácido piroglutâmico, sarcosina, serina, treonina, triptofano, tirosina, valina.

Quadro 1 – Classes de compostos presentes na própolis (continuação)

Ácidos aromáticos	Ácido <i>p</i> -anísico, ácido benzóico, ácido cafeico, ácido cinâmico, ácido cumárico (<i>-p,-o,-m</i>), ácido 3,4-dimetoxicinâmico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido gentísico, ácido hidroxicinâmico, ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico, ácido isoferúlico, ácido 4-metoxicinâmico, ácido salicílico, ácido vanílico, ácido verátrico.
Ésteres aromáticos	Acetato de benzila, benzoato de benzila, cafeato de benzila, cumarato de benzila, 3,4-dimetoxicinamato de benzila, ferulato de benzila, isoferulato de benzila, salicilato de benzila, cafeato de butenila, cafeato de butila, benzoato de cinamilo, cafeato de cinamilo, cafeato, cumarato de cinamilo, isoferulato de cinamilo, benzoato de etila, 2-metil-2-butenil cafeato, 3-metil-3-butenil cafeato, 3-metil-3-butenil cumarato, 3-metil-3-butenil ferulato, 2-metil-2-butenil isoferulato, 3-metil-3-butenil isoferulato, salicilato de metila, cumarato de fenil etila, isoferulato de fenil etila, cafeato de pentila, cafeato de fenetila, ferulato de fenetila, prenilcafeato, prenilcumarato, fenilferulato, fenilisoferulato.
Chalconas e dihidrochalconas	Chalcona de: alpinetina, naringenina, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato, pinocembrina, pinostrobina, sakuranetina, 2,6-trihidroxí-4-metoxichalcona, 2,6-dihidroxí-4-metoxidiidrochalcona, 2,4,6-trihidroxídiidrochalcona.
Flavanonas	Naringenina, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato, pinobanksina-3-butilato, pinobanksina-3-hexanoato, pinobanksina-3-metil éter, pinobanksina-3-pentanoato, pinobanksina-3-pentenoato, pinobanksina-3-propanoato, pinocembrina, pinostrobina, sakuranetina, 3,7-dihidroxí-5-metoxiflavanona, 2,5-dihidroxí-7-metoxiflavanona.
Flavonas e flavonóis	Acacetina, apigenina, apigenina-7-metil éter, crisina, fisetina, galangina, galangina-3-metil éter, izalpinina, isoramnetina, kaempferol, kaempferide, kaempferol-3-metil éter, kaempferol-7-metil éter, kaempferol-7,4-dimetil éter, pectolinaerigenina, quercetina, quercetina-3,7-dimetil éter, ramnetina, ramnocitrina, tectocrisina.

Quadro 1 – Classes de compostos presentes na própolis (conclusão)

Ácidos cerosos	Ácido araquidônico, ácido beénico, ácido cerótico, ácido láurico, ácido linoléico, ácido lignocérico, ácido montânico, ácido mirístico, ácido oléico, ácido palmítico, ácido esteárico
Cetonas	Acetofenona, <i>p</i> -acetopenolacetofenona, dihidroxiacetofenona, metilacetofenona, hept-5-ona, 6-metilcetona.
Terpenóides	Cimeno, 1,8-cineol, sesquiterpenóides, estireno, hexanolactona, limoneno, naftaleno.
Esteróides	Acetato de calinasterol, β -hidroxifucosterol acetato, acetato de uosterol, acetato de estigmasterol.
Açúcares	d-ribofuranose, d-frutose, d-glucitol, d-glucose, talose, sacarose e xilitol, xilose, galactose, manose, ácido galacturônico, lactose, maltose, melibiose, eritritol e inositol.
Lignanas	Sesamina, aschantina, sesartenina, dihidrobenzofurano.
Vitaminas	A, B1, B2, B6, C, E, ácido nicotínico e ácido pantotênico.
Minerais	Alumínio, bário, bismuto, cálcio, cobalto, cobre, cromo, estrôncio, ferro, magnésio, manganês, níquel, prata, silício, vanádio e zinco.

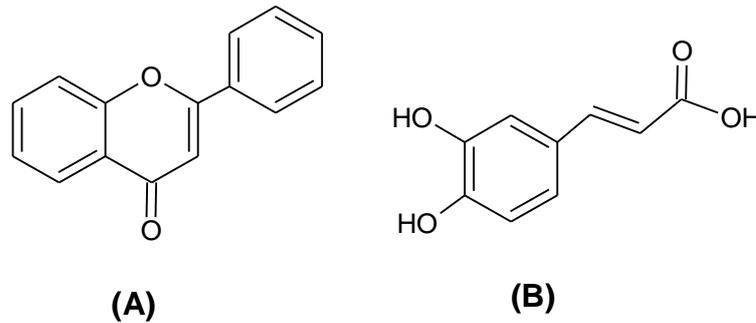
Fonte: (MARCUCCI, 1995; BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000; PEREIRA, 2008)

Visto que a própolis está sujeita a diferenças em sua composição química, pode haver variações nas suas propriedades biológicas e farmacológicas. A própolis brasileira, por exemplo, é classificada em 12 grupos conforme sua composição físico-química, sendo que os tipos de compostos aromáticos e terpênicos encontrados podem indicar as espécies vegetais visitadas pelas abelhas (MELLO, 2013).

Os principais grupos químicos encontrados na própolis são os compostos fenólicos. A presença destes diversos compostos, principalmente os flavonoides (Figura 2), justifica a grande variedade de propriedades biológicas relatadas por diversos pesquisadores (PINTO, 2000; FUNARI; FERRO, 2006; MELLO, 2013). Os ácidos fenólicos representam outro grupo de compostos que podem ser encontrados na própolis, sendo caracterizados por apresentarem um grupo hidroxila ligado a um

anel benzênico e um ou mais grupamentos hidroxila. São subdivididos em ácidos benzoicos, cinâmicos e seus derivados, sendo alguns exemplos comuns nos produtos apícolas o ácido gálico, cumárico e cafeico (Figura 3) (SOARES, 2002).

Figura 2 – Estrutura básica dos flavonoides (A) e ácido cafeico, um exemplo de ácido fenólico presente na própolis (B)



Fonte: (SOARES, 2002; ASSIMOS, 2014)

A variabilidade dos compostos fenólicos presentes na própolis é dependente da sua origem botânica, bem como sazonalidade e região de produção. A própolis verde contém compostos originários do alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) e se destaca por ter em sua composição aproximadamente 16 tipos de compostos fenólicos, com a presença majoritária dos ácidos fenólicos *p*-cumárico, clorogênico, cafeico e os flavonoides artepelin C e bacarina (FUJIMOTO, 2016; SALGUEIRO; CASTRO, 2016).

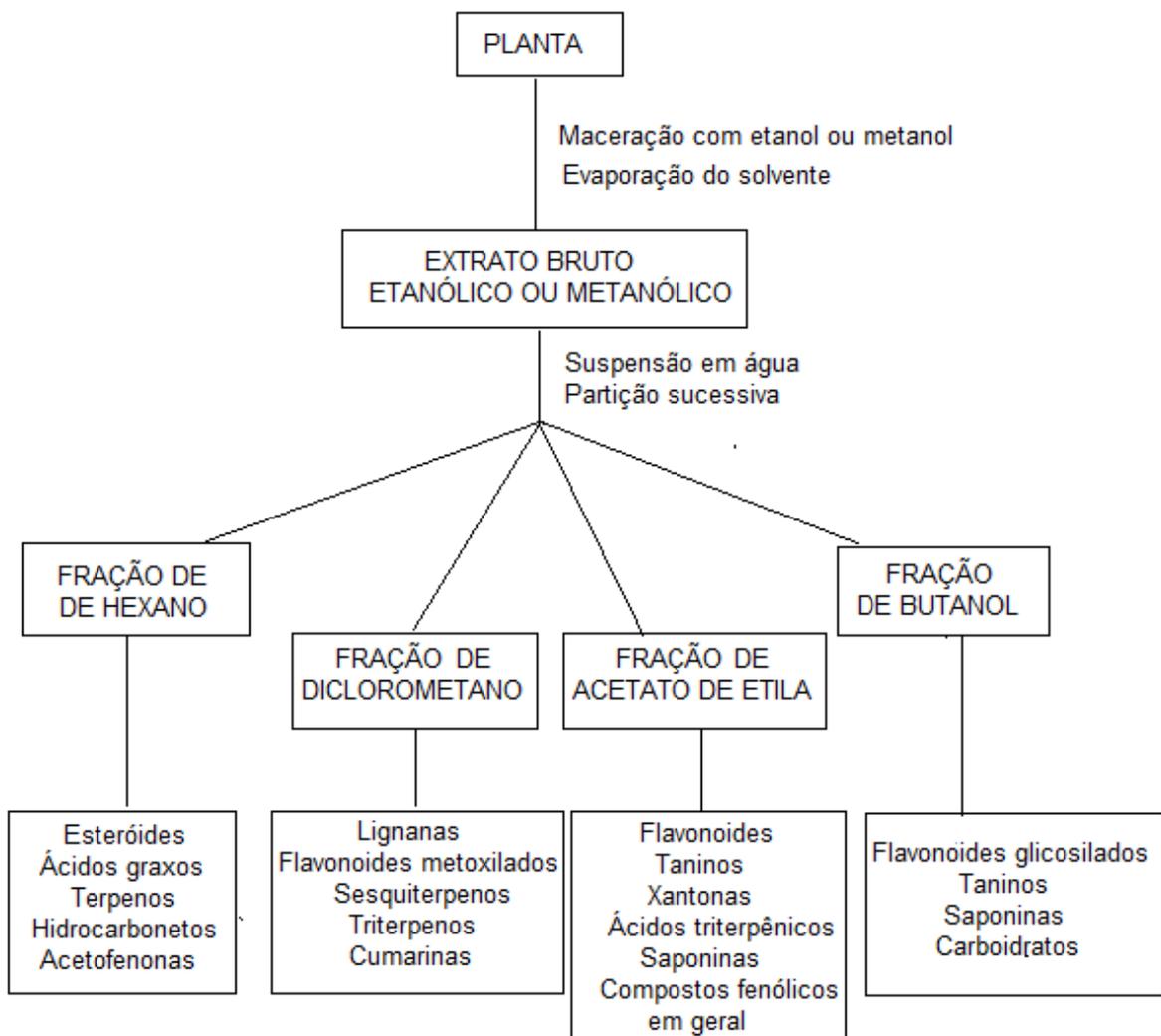
3.2. Extração líquido-líquido

A extração visa retirar seletivamente e da maneira mais completa possível, as substâncias ou fração ativa contida em um material vegetal, fazendo uso de líquido ou mistura de líquidos apropriados e toxicologicamente seguros (PINTO, 2005). Na escolha do método extrativo deve-se avaliar a eficiência, estabilidade das substâncias extraídas, disponibilidade dos meios e custo do processo escolhido, considerando a finalidade do extrato que se deseja preparar (SIMOES et al., 2003).

Inicia-se o fracionamento do extrato por partição com solventes orgânicos de polaridade crescente, o que implica em dissolução seletiva e distribuição entre as fases de dois solventes imiscíveis, visando a separação de componentes da mistura.

A concentração dos componentes em cada fase está relacionada com o coeficiente de partição de cada substância e os melhores rendimentos são obtidos quando o volume total de solvente a ser utilizado na partição é dividido em alíquotas, o que é realizado em funil de separação (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001; SIMOES et al., 2003; PINTO, 2005). A Figura 3 ilustra os procedimentos mencionados, indicando as prováveis classes de compostos que podem ser separados.

Figura 3 – Fluxograma geral de partição e separação provável dos principais metabólitos secundários presentes em plantas.



Fonte: (Adaptado de PINTO, 2005)

Como a seletividade depende, dentre outros fatores, da polaridade, o conhecimento do grau de polaridade do grupo de substâncias que se deseja preferencialmente extrair define o solvente ou mistura de solventes ideal para

determinada extração. Quando não se conhece previamente o conteúdo do material, é comum submeter o material a sucessivas extrações com solventes de polaridade crescente, obtendo uma extração fracionada e contendo compostos também de polaridades crescentes. Finalizada a extração, realiza-se uma semi-purificação do extrato bruto obtido por extração líquido-líquido (ELL) e/ou métodos cromatográficos (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001; SIMOES et al., 2003; PINTO, 2005)

A ELL apresenta as vantagens de ser simples (na configuração mais comum usa-se um funil de separação) e poder utilizar um número grande de solventes, puros e disponíveis comercialmente, os quais fornecem uma ampla faixa de solubilidade e seletividade. É considerada uma técnica clássica de preparação de amostra e é utilizada em análises de diversos tipos de substâncias presentes em fluidos biológicos, pois extratos bastante puros podem ser obtidos com alta seletividade para alguns analitos (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

3.3. Atividades biológicas

Desde a antiguidade, a própolis já era utilizada como medicamento popular no tratamento de feridas e infecções. Nos últimos anos, tem atraído muita atenção como substância natural útil aplicada em medicina, sendo utilizada, principalmente, pelas indústrias cosméticas e farmacêuticas. Extratos etanólicos, hidro-alcóolicos e aquosos de própolis têm sido utilizados e estudados avaliando diferentes atividades biológicas (SFORCIN; BANKOVA, 2011).

Estudos apontam que a própolis ou seus derivados apresentam atividade antitumoral *in vitro* (FROZZA, 2016; HERRERA, 2016) e *in vivo* (ORSOLIC et al., 2005), imunomoduladora *in vitro* (CONTE, 2017) e *in vivo* (ORSATTI et al., 2010), anti-inflamatória *in vitro* (TIVERON et al., 2016) e *in vivo* (REIS et al., 2000), antioxidante *in vitro* (MELLO, 2013; FALCÃO et al., 2014; VEIGA et al., 2017), antibacteriana *in vitro* (VARGAS et al., 2004; CASTRO et al., 2007; BISPO JUNIOR et al., 2012; FALCÃO et al., 2014), antiviral *in vitro* (BÚFALO et al., 2009), antifúngica *in vitro* (BISPO JUNIOR et al., 2012; FALCÃO et al., 2014), antiparasitária *in vitro* (FREITAS et al., 2006; FALCÃO et al., 2014), anti-úlceras *in vivo* (BARROS et al., 2007), anti-diabetes *in vivo* (ZAMAMI et al., 2007), dentre outras.

3.2.1. Atividade antioxidante

As espécies reativas de oxigênio são átomos ou moléculas que contêm oxigênio e apresentam um elétron desemparelhado na sua órbita externa, e que são capazes de reagir com outras moléculas contra as quais colidem, retirando elétrons destas substâncias e modificando suas estruturas moleculares (ANDRADE JUNIOR et al., 2005). A geração de radicais livres (RL) constitui um processo contínuo e fisiológico durante os processos metabólicos, nos quais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas que ocorrem nas membranas mitocondriais e que levam à produção de energia (ATP) necessária para as atividades essenciais das células (ROESLER et al., 2007; BARBOSA et al., 2010)

Essa produção contínua de RL durante os processos metabólicos culminou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante pelo próprio organismo. O processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses, o que ocorre durante processos patofisiológicos ou devido a fatores ambientais adversos (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; BARBOSA et al., 2010).

Espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como radical hidroxila, radical superóxido e peróxido de hidrogênio causam danos ao DNA ou podem oxidar lipídios e proteínas. Os EROs atacam as cadeias de ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolipídios e do colesterol, iniciando o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares. Os radicais de carbono formados neste processo podem reagir com oxigênio originando radicais peroxila, que por sua vez podem atacar novas cadeias de ácidos graxos poli-insaturados, propagando a reação. O resultado deste processo é a oxidação de várias moléculas de ácidos graxos (SOUSA et al., 2007b).

Algumas doenças, tais como envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, neoplasias, doenças neurológicas, dentre outras, estão relacionadas com o aumento de RL no organismo. Uma tendência crescente nos últimos anos é a possibilidade do emprego de produtos naturais com propriedades antioxidantes, para o controle e prevenção das patologias supracitadas. Neste

contexto, a própolis contém os polifenóis, compostos com a propriedade de remover esses RL em excesso de nosso organismo (MENEZES, 2005; SILVA, 2009).

A atividade antioxidante depende da estrutura química dos polifenóis, sendo que em geral, quanto maior o número de hidroxilas, maior a capacidade de doar H⁺ e elétrons. Portanto, a ação antioxidante dos compostos fenólicos está relacionada com sua capacidade de quelar metais, inibir a ação da enzima lipoxigenase e captar radicais livres. No geral, os polifenóis, especialmente os flavonoides, possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais, sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; DELMONDES et al., 2013).

3.2.2. Atividade antimicrobiana

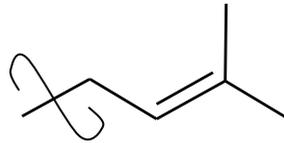
Certamente a capacidade da própolis em inibir o crescimento de microrganismos é a atividade farmacológica mais popularmente conhecida. As investigações sobre as propriedades antimicrobianas da própolis têm sido conduzidas, sobretudo, nas áreas médica e veterinária, nas quais o produto tem demonstrado uma eficiente atividade em relação a diversos gêneros de bactérias, sendo as gram-positivas mais sensíveis aos extratos de própolis que as gram-negativas (PINTO et al., 2001; MENEZES, 2005).

A propriedade antimicrobiana da própolis é amplamente relatada, sendo o mecanismo desta atividade considerado complexo e atribuído possivelmente ao sinergismo entre flavonoides, hidroxiácidos e sesquiterpenos (FERNANDES JUNIOR et al., 2006). Destaca-se sua ação *in vitro* sobre *Staphylococcus aureus* (MIORIN et al., 2003), *Streptococcus pyogenes* (BOSIO et al., 2000), *Candida sp* (OTA et al., 2001) e sobre vários outros microrganismos (BISPO JUNIOR et al., 2012).

A própolis brasileira possui baixa concentração de flavonoides e ésteres de ácidos fenólicos, mas possui altas concentrações de ácido hidroxicinâmico, acetofenonas preniladas e alguns terpenóides específicos. O efeito sinérgico dos componentes proporciona maior atividade antimicrobiana quando comparada a análise dos compostos isolados. Além disso, compostos prenilados são os maiores constituintes da própolis brasileira e estudos relatam que a atividade antibacteriana destes compostos pode ser exacerbada com o aumento dos grupos prenil, radical

alifático insaturado ramificado 3-metil-but-2-en-1-il, ilustrado na Figura 4 (NUNES et al., 2009; JUIZ, ALVES; BARROS, 2010).

Figura 4 – Grupamento prenil (3-metil-but-2-en-1-il)



Fonte: (NUENFELDT, 2015)

3.3. Emulsões

As formas farmacêuticas semi-sólidas de uso tópico são preparações destinadas a agir sobre a pele e mucosas. As utilizadas com maior frequência são pomadas, cremes, loções e soluções tópicas, embora outras formas farmacêuticas como pastas, linimentos, pós, géis e aerossóis sejam também usadas, mas em menor proporção. Dentre estas, merecem destaque os cremes, em especial os do tipo óleo em água (O/A), obtidos por emulsão, visto que apresentam facilidade de aplicação, espalhabilidade sobre a pele e facilidade de veiculação de princípios ativos (ALLEN, POPOVICH; ANSEL, 2007).

Através da emulsificação, é possível obter misturas estáveis e homogêneas de dois líquidos imiscíveis ou relativamente imiscíveis entre si. Tem-se uma emulsão quando um líquido estiver dividido (fase interna, dispersa ou descontínua) em pequenos glóbulos de outro (fase externa, dispersante ou contínua). As emulsões são classificadas de acordo com a natureza lipofílica (ou hidrofóbica) da fase dispersante em sistemas óleo em água (O/A) ou sistemas água em óleo (A/O) (ANTONIO, 2007).

A fase aquosa consiste geralmente de água destilada ou deionizada, na qual podem ser incorporados os elementos hidrossolúveis, como princípios ativos, conservantes, tampões, corretivos de pH, antioxidantes, conservantes, sequestrantes, corantes, edulcorantes, aromatizantes. A fase oleosa é composta de componentes oleosos ou emolientes e é responsável por características importantes da emulsão que podem ser moduladas conforme a natureza do elemento oleoso escolhido (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001)

As bases de cremes e loções cremosas mais indicadas são as bases auto-emulsionantes. Dentre as mais empregadas há muito tempo estão uma aniônica, base tipo Lanette (álcool cetoestearílico e cetilestearil sulfato de sódio) e uma não-iônica, muito comum e também bastante utilizada, a base tipo Polawax (álcool cetoestearílico e monoestearato de sorbitanopolioxietileno 20 O.E.), escolhidas pela boa estabilidade que apresentam (ZANIN et al., 2001).

3.3.1. Estabilidade das emulsões

As emulsões são termodinamicamente instáveis, possuindo um tempo de vida limitado. A instabilidade destas formulações pode ser detectada em alguns casos por uma mudança na aparência física, na cor, no odor e na textura, enquanto em outros casos, podem ocorrer alterações químicas que não são evidentes e que só podem ser verificadas por análises químicas (ANTONIO, 2007).

A instabilidade das emulsões se manifesta das seguintes formas: floculação, onde as gotículas se agregam em aglomerados frouxos, dentro da emulsão, conservando sua identidade individual, mas cada aglomerado comporta-se fisicamente como uma unidade única; coalescência, que é caracterizada por uma larga distribuição de tamanho das gotículas, resultando na separação de fases de forma visível ao olho nu; *creaming*, onde a fase dispersa, conforme sua densidade relativa à fase contínua sobe até a superfície ou desce até o fundo da emulsão, formando uma camada de emulsão mais concentrada; amadurecimento de Ostwald, onde as partículas maiores crescem de tamanho devido à dissolução das partículas menores (MORAIS, 2006; OLIVEIRA, 2007; FRANGE; GARCIA, 2009).

Dentre os fenômenos que provocam a instabilidade das emulsões pode-se citar a instabilidade química (principalmente hidrólise dos tensoativos), oxidação e degradação dos lipídios, destruição microbiana de um componente crítico na emulsão ou processos fotoquímicos (OLIVEIRA, 2007; LANGE; HEBERLÉ; MILÃO, 2009). Durante o armazenamento ou processamento das emulsões, os lipídios presentes podem sofrer degradação por oxidação, um fenômeno espontâneo e com implicação direta no valor comercial e funcional dos produtos elaborados. As principais consequências deste processo são a modificação da cor original, aparecimento de odores e sabor característico de ranço, o que representa para o

consumidor e para a indústria uma importante causa de depreciação ou rejeição do produto (CHORILLI; LEONARDI; SALGADO, 2007; COTTICA, 2013).

Essa causa de instabilidade pode ser evitada com a adição de antioxidantes na formulação, sendo os sintéticos amplamente empregados nas formulações cosméticas. Porém, atualmente há uma busca notável pela utilização de produtos de origem natural, tanto pela indústria farmacêutica, como cosmética, visando atender às exigências do mercado (LANGE; HEBERLÉ; MILÃO, 2009).

Os ensaios de estabilidade de emulsões são empregados para prever a “vida útil” das mesmas em condições normais de armazenamento. Estes testes, em condições específicas e controladas para acelerar o envelhecimento, avaliam a capacidade de um produto em manter seu aspecto original, as características físicas, químicas e microbiológicas (MORAIS, 2006).

Segundo preconiza a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os estudos de estabilidade se dividem em estabilidade preliminar e acelerada. O primeiro tem duração de 15 dias e é conhecido como teste de triagem, onde se empregam condições extremas de temperatura com o objetivo de acelerar possíveis reações entre os componentes e surgimento de sinais que indicam instabilidade, utilizado como triagem das formulações. A estabilidade acelerada procura prever o tempo de vida útil e compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento, tendo duração de aproximadamente 90 dias, variando de acordo com as necessidades da formulação. De modo geral se avaliam parâmetros organolépticos (cor, aspecto, odor e sabor, quando aplicável), parâmetros físico-químicos (pH, viscosidade, densidade, espalhabilidade e monitoramento de ingredientes da formulação) e parâmetros microbiológicos (contagem microbiana e/ou *Challenge Test*) (BRASIL, 2004).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta da própolis verde

A própolis verde utilizada neste estudo foi adquirida no apiário Seiva das Flores, em São José do Rio Preto, SP. Conforme atestado fornecido pela empresa, a amostra foi coletada no mês de outubro de 2015 na mesoregião da Zona da Mata Mineira, proveniente de colmeias de abelhas da espécie *Apis mellifera*.

4.2. Obtenção do extrato bruto e frações de própolis verde

A extração foi realizada conforme metodologia de Boroski (2011) com modificações. Triturou-se 200 g de própolis bruta, submetida à maceração em temperatura ambiente, sob agitação magnética por 60 minutos com etanol absoluto (1:10 v/v). Esgotou-se o resíduo da filtração com 200 mL do solvente e procedeu-se filtração à vácuo, sendo o extrato bruto etanólico (EBE) resultante submetido a evaporação rotativa (Quimis[®]) sob pressão reduzida (680 mmHg) a 50 °C.

Solubilizou-se 80 g do EBE em água destilada (1:10 v/v) e pela técnica de partição líquido-líquido, adicionou-se os solventes hexano e acetato de etila, nesta ordem, em 8 alíquotas de 100 mL ao funil de extração. Após agitação, a fração superior hexano (F-HEX) e acetato de etila (F-ACT) foram coletadas em balão de fundo chato e submetidas a evaporação do solvente sob pressão reduzida a 50 °C. A última fração no funil correspondeu à aquosa (F-AQ), submetida à liofilização (Liotop[®] L108), com temperatura em torno de -50 °C e pressão menor que 500 µHg e até 50 µHg, para evaporação da água. Todas foram armazenadas em frascos plásticos estéreis e mantidas congeladas durante a realização dos estudos.

4.3. Determinação da atividade antioxidante do extrato e frações de própolis verde

4.3.1. Capacidade de captura do radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

A medida da atividade sequestrante do radical DPPH[•] foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Boroski et al. (2015), utilizando o Trolox (ácido 6-

hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico – Sigma Aldrich®) como antioxidante padrão. Preparou-se inicialmente uma curva de calibração com o Trolox nas concentrações de 100,0, 500,0, 750,0, 1000,0, 1250,0, 1500,0 e 2000,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e as amostras (EBE e frações) foram preparadas a 2,0 mg mL^{-1} em metanol. Transferiu-se alíquota de 30 μL de cada concentração do padrão e amostras para tubos de ensaio, aos quais se adicionou 2,0 mL de solução metanólica de DPPH (Sigma Aldrich®) na concentração de 0,06 mmol L^{-1} , mantendo-se as misturas no escuro por 30 minutos. Procedeu-se então a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro UV-Vis (PG Instruments-T80+) em 517 nm. Os testes foram realizados em triplicata.

A atividade antioxidante foi determinada por comparação da absorbância das amostras contra a curva de calibração construída com o padrão Trolox e expressa como μmol de Equivalentes Trolox (ET) por grama de amostra.

4.3.2. Capacidade antioxidante frente ao radical livre ABTS^{•+} (2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolína-6-sulfonado)

A medida da atividade sequestrante do radical ABTS^{•+} foi realizada em triplicata de acordo com a metodologia descrita por Boroski et al. (2015), sendo necessário o preparo prévio de solução catiônica de ABTS (Sigma Aldrich®) pela reação do radical com persulfato de potássio durante 16 horas, na ausência de luz. Formado o radical ABTS^{•+}, obteve-se solução etanólica com absorbância de $0,700 \pm 0,05$ em comprimento de onda de 734 nm.

Preparou-se curva de calibração com o padrão Trolox nas concentrações de 100,0, 500,0, 750,0, 1000,0, 1250,0, 1500,0 e 2000,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e as amostras (EBE e frações) foram preparados com o solvente etanol em concentração de 2,0 mg mL^{-1} . Transferiu-se 30 μL de cada concentração do padrão e das amostras para tubos de ensaio e então se acrescentou 3,0 mL do radical ABTS^{•+}. Após 6 minutos de reação, procedeu-se a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro UV-Vis em comprimento de onda de 734 nm.

A atividade antioxidante foi determinada por comparação das absorbâncias das amostras (EBE e frações) contra a curva de calibração construída com

diferentes concentrações do padrão Trolox e expressa como μmol de Equivalentes Trolox (ET) por grama de amostra.

4.3.3. Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP)

A medida da atividade antioxidante por redução do ferro foi realizada em triplicata de acordo com a metodologia descrita por Boroski et al. (2015), sendo primeiramente preparadas soluções de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) (Sigma Aldrich®) 10 mM em HCl (ácido clorídrico) 40 mM e tampão de acetato de sódio 0,3 M (pH 3,6). Para o preparo da solução do reagente de FRAP, combinou-se 25 mL do tampão acetato 0,3 M com 2,5 mL da solução TPTZ e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico 20 mM, utilizando-se imediatamente.

Preparou-se uma curva de calibração com o padrão sulfato ferroso nas concentrações de 500,0, 1000,0, 1500,0 e 2000 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ e as amostras (EBE e frações) foram preparadas na concentração de 1,0 mg mL^{-1} . Transferiu-se 3,0 mL da solução de reagente FRAP recém preparada e aquecida a 37 °C e a leitura foi realizada em 593 nm (branco). Em seguida, adicionou-se 100 μL da solução contendo amostra ou padrão e 300 μL de água destilada, incubou-se estas 30 minutos a 37 °C, centrifugou-se por 5 minutos a 3000 rpm e então procedeu-se a leitura das absorbâncias.

A atividade antioxidante foi determinada por comparação da absorbância das amostras contra a curva de calibração construída com o padrão Sulfato Ferroso e expressa como poder de redução de $\mu\text{mol de Fe(II) g}^{-1}$ de extrato.

4.4. Determinação de compostos fenólicos totais no extrato e frações de própolis verde

Os compostos fenólicos totais foram determinados pelo método Folin-Ciocalteu, em triplicata, seguindo o procedimento descrito por Singleton e Rossi (1965). Preparou-se inicialmente uma curva de calibração com padrão ácido gálico cujas concentrações variaram de 20 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para as amostras (EBE e frações) preparou-se soluções metanólicas a 2,5 mg mL^{-1} . Transferiu-se, das diferentes concentrações do padrão, bem como das amostras, 250 μL em tubo de

centrífuga e adicionou-se 200 µL do reagente Folin-Ciocalteu (1:1 em água destilada), 500 µL de solução saturada de carbonato de sódio (Na_2CO_3) e 4,0 mL de água destilada. Incubaram-se os tubos no escuro por 25 minutos, centrifugou-se por 10 minutos e se procedeu a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro UV-Vis em comprimento de onda de 725 nm.

Os teores de compostos fenólicos totais foram determinados por comparação das absorvâncias das amostras contra a curva de calibração construída com o padrão ácido gálico e expressa como miligrama de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de amostra.

4.5. Determinação do teor de flavonoides no extrato e frações de própolis verde

A determinação de flavonoides seguiu a metodologia proposta por Woisky e Salatino (1998), preparando-se inicialmente uma curva de calibração com o padrão quercetina, com concentrações variando de 10 a 160 µg mL⁻¹. Para as amostras (EBE e frações) foram preparadas soluções metanólicas a 2,5 mg mL⁻¹. A partir das diferentes concentrações dos padrões e das amostras, transferiu-se 500 µL para tubos de ensaio, adicionou-se 250 µL de solução metanólica de cloreto de alumínio (AlCl_3) 5 % e 4,25 mL de metanol, mantendo-se os tubos em repouso por 30 minutos para em seguida proceder a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro UV-Vis em 425 nm. As análises foram realizadas em triplicata.

Os teores de flavonoides foram determinados por comparação das absorvâncias das amostras contra a curva de calibração construída com o padrão quercetina e expressa como miligrama de equivalentes de quercetina (EQ) por grama de amostra.

4.6. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)

A identificação e quantificação dos ácidos fenólicos e flavonoides nas amostras de própolis foi realizada utilizando um cromatógrafo líquido VARIAN – 900 LC acoplado a um detector de arranjo de fotodiodo (DAD) e uma coluna de fase

reversa MICROSORB-MV C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m). A metodologia foi realizada de acordo com o descrito por Nie et al. (2013) com adaptações.

Os padrões utilizados, da marca Sigma Aldrich[®], foram os ácidos fenólicos: ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico e ácido transcinâmico; e os flavonoides rutina, quercetina, pinocembrina, crisina, canferol, mangiferina e galangina. As condições do equipamento foram: fluxo de 1,0 mL min⁻¹, temperatura da coluna de 30 °C, composição da fase móvel (A) H₂O:H₃PO₄ (99,8:0,2 v/v) e (B) CH₃OH (100 %), com gradiente iniciando com 30 % de B, em 15 min 64 % de B, 11 min 75 % de B, 2 min 95 % de B, 1 min 95 % de B, 3 min 20 % de B e 10 min em 20 % de B, totalizando 42 min de análise.

Para as amostras se preparou diluições com uma mistura de a) H₂O:CH₃COOH (98:2) e b) H₂O:CH₃COOH:CH₃CN (58:2:40) na proporção de 80 % de “a” e 20 % de “b” em balão de 10 mL. Pesou-se aproximadamente 10,0 mg do EBE, F-HEX e F-ACT, respectivamente, diluindo-se em 10 mL da mistura de solventes, o que resultou em concentrações de 1 mg mL⁻¹.

A identificação das substâncias presentes nos extratos foi baseada na comparação dos tempos de retenção e seus espectros de absorção no UV com os de padrões autênticos (mix a 0,03 mg mL⁻¹), e a quantificação foi realizada usando dados de calibração externo para os mesmos compostos.

Cada padrão foi analisado individualmente em 10 concentrações distintas, sendo elas 0,0005, 0,001, 0,0025, 0,005, 0,0075, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05 e 0,06 mg mL⁻¹ e então obtidas as equações da reta de cada composto através do gráfico da área do pico do padrão em função da sua concentração. O monitoramento dos cromatogramas foi realizado a 280 e 320 nm e todas as análises foram realizadas em três repetições.

4.7. Determinação da atividade antimicrobiana do extrato e frações de própolis verde

4.7.1. Padronização dos inóculos

As bactérias selecionadas para a realização dos testes foram *Staphylococcus aureus* (ATCC14458), *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA)

(ATCC25923), *Escherichia coli* (ATCC10536), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) e *Salmonella enterica* sorovar Typhi (ATCC06539). Quanto aos fungos, testou-se a levedura *Candida albicans* (ATCC10231). Inicialmente os microrganismos foram reativados a partir das culturas estoque para placas de Agar Mueller-Hinton (AMH) para as bactérias e Ágar Sabouraud-Dextrose (ASD) para a levedura, incubadas a 37 °C por 24 horas.

O inóculo foi preparado a partir de 5 colônias (diâmetro de aproximadamente 1 mm) inoculadas em Caldo Mueller-Hinton (CMH) e Caldo Sabouraud-Dextrose (CSD) para bactérias e levedura, respectivamente, incubados por 24 horas a 37 °C, e a densidade celular ajustada em solução salina 0,85 % por comparação visual com padrão da escala de McFarland 0,5 (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ bactérias mL⁻¹ e $3,0 \times 10^6$ leveduras mL⁻¹). A suspensão de trabalho é obtida por diluição em CMH para bactérias e RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) para leveduras, a fim de se obter $5,0 \times 10^5$ UFC mL⁻¹ e $1,5 \times 10^3$ células mL⁻¹, respectivamente.

Os testes de sensibilidade seguiram os protocolos do *Clinical & Laboratory Standards Institute* para batérias (CLSI, 2009) e leveduras (CLSI, 2002).

4.7.2. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A sensibilidade dos microrganismos ao EBE e frações foi avaliada em triplicata, pela técnica de microdiluição em caldo, utilizando 100 µL de CMH para bactérias ou RPMI 1640 (sem bicarbonato, com L-glutamina e vermelho fenol como indicador de pH) com tampão MOPS (ácido 3-(n-morfolino)propanosulfônico) para leveduras. As concentrações testadas, obtidas por diluições seriadas, variaram entre 80 e 0,625 mg mL⁻¹ sendo adicionados 10 µL de cada inóculo.

Foram ainda avaliados os controles, onde se utilizou o antibacteriano Ampicilina (125 a 0,98 µg mL⁻¹) e antifúngico Fluconazol (0,125 a 64 µg mL⁻¹), bem como o solvente (etanol absoluto) nas mesmas concentrações utilizadas para dissolver as amostras (15 a 0,12 %) e os meios de cultura sem adição de bactéria ou fungo. Após incubação das microplacas em estufa a 37 °C por 24 horas, identificou-se a menor concentração onde houve inibição do crescimento bacteriano (CIM), através da adição de 10 µL do corante 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT) a 0,5 %, que revela coloração rósea nos poços onde houve crescimento.

4.8. Determinação da cinética de morte microbiana frente à F-ACT de própolis verde

Avaliou-se, para a fração de própolis a ser utilizada na aplicação (F-ACT), a curva de tempo de morte microbiana. Para tanto, preparou-se 5,0 mL de solução contendo F-ACT nas concentrações CIM e CIM*2 para cada microrganismo a ser testado, utilizando-se CMH para preparar as soluções dos testes para bactérias e RPMI 1640 para os testes com fungo.

Padronizaram-se as bactérias (*S. aureus*, *S. aureus* MRSA, *E. coli*, *S. Typhi* e *P. aeruginosa*) e a levedura (*C. albicans*) com a escala 0,5 de McFarland e então se adicionou $5,0 \times 10^5$ UFC mL⁻¹ de cada um dos microrganismos aos respectivos frascos. Incubou-se a 35 °C em banho térmico com agitação e nos intervalos de 0, 2, 4, 8, 12 e 24 horas pós-incubação, preparou-se suspensões diluídas seriadamente (10^{-1} a 10^{-5}) e uniformemente inoculadas em placa contendo AMH para bactérias ou ASD para levedura. Realizou-se ainda controle com 5,0 mL de CMH e RPMI 1640 sem o extrato, com e sem adição de 100 µL de etanol absoluto, incubado a 35 °C por 24 horas. Após o fim do período de incubação, realizou-se a contagem do número de células viáveis, expressas em log de UFC mL⁻¹ e a curva construída plotando a contagem média de colônias (dos testes feitos em duplicata) em função do tempo (horas).

4.9. Determinação do pH da fração (F-ACT) de própolis incorporada nas emulsões

A determinação do pH foi realizada em uma dispersão a 10 % (p/v) em etanol 30 %. Utilizou-se pHmetro digital (Bel Engineering® W38) previamente calibrado. Mediu-se também o pH da solução utilizada para dissolver o extrato a fim de descartar possíveis interferências na medida.

4.10. Preparo das emulsões

Conforme se pode observar na Tabela 1, foram preparadas cinco emulsões O/A não iônicas, contendo diferentes concentrações da fração de própolis (F-ACT),

de acordo com a finalidade, sendo estas formulações numeradas de 1 a 5 (F1, F2, F3, F4 e F5). A F1 corresponde a um controle com antioxidantes (BHT – di-terc-butil metil fenol ou hidroxitolueno butilado e EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético) e antimicrobianos (metilparabeno e propilparabeno) sintéticos frequentemente utilizados em emulsões, enquanto F2 não contém nenhum tipo de conservante, servindo como parâmetro para observação de provável deterioração do produto. A F3 não contém antioxidante sintético, sendo utilizada a F-ACT de própolis a 0,2 % para este fim, enquanto a F4 não foi adicionada de antimicrobiano sintético, mas F-ACT de própolis a 2,0 % com esta finalidade. Por fim, na F5 adicionou-se somente a F-ACT de própolis a 2,0 % com o intuito de avaliar sua eficácia como antioxidante e antimicrobiana, não sendo adicionado nenhum tipo de conservante sintético.

Tabela 1 – Composição das formulações cosméticas preparadas com fração de própolis verde (F-ACT) com finalidade antioxidante (F3), antibacteriana (F4), antioxidante + antibacteriana (F5) e controles com conservantes sintéticos (F1) e sem conservantes (F2).

	Componente	F1	F2	F3	F4	F5
Fase Oleosa	Polawax®	12,0 %	12,0 %	12,0 %	12,0 %	12,0 %
	Vaselina líquida	5,0 %	5,0 %	5,0 %	5,0 %	5,0 %
	Propilparabeno	0,1 %	----	0,1 %	----	----
	BHT	0,1 %	----	----	0,1 %	----
	F-ACT	----	----	0,2 %	2,0 %	2,0 %
Fase Aquosa	Propilenoglicol	5,0 %	5,0 %	5,0 %	5,0 %	5,0 %
	Metilparabeno	0,1 %	----	0,1 %	----	----
	EDTA	0,1 %	----	----	0,1 %	----
	F-ACT	----	----	0,2 %	2,0 %	2,0 %
	Água destilada qsp	100,0 mL				

BHT: di-terc-butil metil fenol; EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético; F-ACT: fração acetato de etila; qsp: quantidade suficiente para.

Todas as formulações foram preparadas por aquecimento das fases a 70 °C, então a fase aquosa foi vertida sobre a oleosa, sob agitação mecânica (Fisatom® 715) a 400 rpm, até obter a consistência final da emulsão a temperatura ambiente. As formulações foram acondicionadas em frascos de poliestireno opacos brancos, e distribuídas de acordo com a condição desejada para os testes de estabilidade.

4.11. Avaliação da estabilidade das emulsões

Todos os testes para avaliar a estabilidade das emulsões preparadas, seguiram o preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)

através do Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (BRASIL, 2004), sendo primeiramente realizados os ensaios de estabilidade preliminar e após aprovação das emulsões nesta primeira etapa prosseguiu-se os testes de estabilidade acelerada.

4.11.1. Testes de Estabilidade Preliminar

Os ensaios preliminares de estabilidade têm duração de 15 dias, sendo que a primeira avaliação foi realizada após 24 horas do preparo da emulsão, considerada o tempo zero (T0), necessário para a emulsão adquirir consistência final. As avaliações subsequentes foram realizadas diariamente, durante todo o período de duração do teste, sendo os parâmetros avaliados o aspecto, cor, odor, pH, densidade e espalhabilidade, apresentados como a média aritmética dos valores obtidos nos testes realizados em triplicata.

4.11.1.1. Centrifugação

Inicialmente, submeteu-se 5,0 gramas de cada amostra à centrifugação em centrífuga de bancada (Nova Instruments[®] NI 1812) em uma rotação de 3000 rpm durante 30 minutos. Neste teste, o produto deve permanecer estável a alta rotação e diante de qualquer sinal de instabilidade se faz necessária a reformulação da emulsão.

4.11.1.2. Estresse Térmico

Submeteram-se alíquotas das emulsões a condições extremas de temperatura, com a finalidade de detectar de sinais de instabilidade a mudanças de temperaturas e sob manutenção de temperaturas baixas e elevadas por um determinado intervalo de tempo. Para isso, uma amostra de 30,0 gramas acondicionada em frasco de poliestireno fechado foi submetida a aquecimento em banho térmico na faixa de 50,0 a 80,0 °C, com aumento da temperatura de 5,0 °C a cada 30 minutos. As amostras foram avaliadas depois de mantidas 30 minutos na

temperatura máxima (80,0 °C) e novamente após arrefecimento natural à temperatura ambiente.

Ainda 30,0 gramas de cada amostra foram armazenadas durante todo o período compreendido pelo estudo preliminar de estabilidade em alta temperatura em estufa (50,0 ± 2,0 °C) e freezer (-10,0 ± 2,0 °C), sendo avaliados os parâmetros diariamente. A não ocorrência de separação de fases é indicativa de estabilidade física do produto ensaiado, seguindo a classificação do estado de acordo com a nomenclatura: normal (N), levemente modificada (LM), modificada (M) ou intensamente modificada (IM).

4.11.1.3. Parâmetros avaliados

4.11.1.3.1. Características organolépticas

Avaliou-se, com relação aos parâmetros organolépticos, o aspecto, cor e odor das emulsões. Em relação ao aspecto, as amostras foram analisadas macroscopicamente a fim de avaliar sinais de instabilidade. A não ocorrência de separação de fases, precipitação ou turvação indica estabilidade da amostra ensaiada. O aspecto foi descrito como homogêneo ou heterogêneo e monitoradas alterações no decorrer dos ensaios.

A coloração das amostras foi verificada visualmente sob condições de luz branca, natural, a fim de observar modificações durante os testes de estabilidade com relação à cor inicial. Ainda, o odor das amostras ensaiadas foi avaliado diretamente a fim de verificar alterações relativas ao inicial. Para os três parâmetros organolépticos avaliados, as amostras foram classificadas em: normal (N), levemente modificada (LM), modificada (M) ou intensamente modificada (IM).

4.11.1.3.2. pH

A determinação do pH foi realizada em uma dispersão aquosa a 10 % (p/v) da amostra ensaiada em água recém destilada, usando pHmetro digital (Bel Engineering® W38), calibrado previamente com soluções padrão (Gehaka®) de pH conhecido (pH 4,0 e 7,0).

4.11.1.3.3. Espalhabilidade

A espalhabilidade, determinada a $22,0 \pm 2,0$ °C seguiu o método descrito por Borghetti e Knorst (2006), sendo o equipamento constituído por uma placa-molde circular de vidro com orifício central de 1,2 cm de diâmetro colocada sobre uma placa suporte de vidro posicionado sobre papel milimetrado. A amostra foi introduzida no orifício e nivelada com auxílio de espátula, a placa móvel foi retirada e sobre a amostra colocada uma placa de vidro de peso conhecido. Este procedimento foi repetido acrescentando-se novas placas em intervalos de um minuto, registrando-se a cada determinação a superfície abrangida e o peso da placa adicionada até a obtenção de valores constantes (espalhabilidade máxima). Calculou-se desta forma o diâmetro médio, obtendo-se a espalhabilidade a partir da equação 1.

$$E_i = d^2 \pi / 4 \quad (1)$$

Onde: E_i = espalhabilidade da amostra para um determinado peso em milímetro quadrado (mm^2); d = diâmetro médio em milímetro (mm); $\pi = 3,14$.

Esse teste se baseia na resistência ao movimento forçado. Os resultados correspondem à relação entre a área de espalhamento com a força aplicada sobre o produto e o esforço limite, relação que corresponde ao fator de espalhabilidade, expresso em $\text{mm}^2 \text{g}^{-1}$.

4.11.1.3.4. Densidade

Para a determinação da densidade foi utilizada proveta e balança analítica, determinando-se a densidade aparente dos produtos formulados, a qual foi realizada em ambiente climatizado, mantido em temperatura constante de $22,0 \pm 2,0$ °C (ANVISA, 2007). Para o procedimento, pesou-se uma quantidade pré-definida da amostra, que foi introduzida na proveta e o volume anotado. Obteve-se a densidade pela equação 2.

$$d_A = m/v \quad (2)$$

Onde:

d_A = densidade aparente em g mL^{-1} ; m = massa da amostra em gramas; v = volume final em mililitros. O resultado obtido foi expresso em g cm^{-3} .

4.11.2. Testes de Estabilidade acelerada

Confirmada a compatibilidade entre os componentes da formulação através dos ensaios de estabilidade preliminar, deu-se início aos testes de estabilidade acelerada, com a finalidade de prever a estabilidade e consequentemente a vida útil do produto elaborado. Aproximadamente 50,0 g de cada formulação foram acondicionados em frascos plásticos de poliestireno com tampa e submetidos a condições de temperatura variada, sendo: refrigerador ($5,0 \pm 2,0$ °C) e estufa ($40,0 \pm 2,0$ °C). Ainda, um frasco foi submetido à condição de exposição à radiação ultravioleta (UV).

As formulações foram avaliadas logo após o preparo, no tempo zero (T0) e após, em intervalos de tempo pré-determinados: 24 horas, 7, 15, 30 e 60 dias. Os parâmetros foram os mesmos avaliados nos testes de estabilidade preliminar (pH, densidade, espalhabilidade, características organolépticas) seguindo as mesmas metodologias descritas anteriormente e adicionalmente, monitorou-se o índice de peróxidos (IP) e compostos fenólicos totais (CFT) nas emulsões, apresentados como média dos valores obtidos nos testes realizados em triplicata.

4.11.2.1. Determinação do Índice de Peróxidos (IP)

As determinações do índice de peróxidos (IP) foram feitas em triplicatas e baseado no procedimento descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). Pesou-se $5,00 \pm 0,05$ g de amostra em um erlenmeyer, onde foram adicionados 30 mL de solução de ácido acético:clorofórmio na proporção 3:2 para dissolução. Adicionou-se 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio (KI), mantendo-se ao abrigo da luz por 1 minuto e então se adicionou 30 mL de água. Titulou-se com solução $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ padronizada de tiosulfato de sódio até a cor amarela quase desaparecer e então se adicionou 0,5 mL de solução de amido 1,0 %, continuando a titulação até a cor azul

desaparecer. Para o cálculo do IP, expresso em miliequivalentes (mEq) de peróxido em 1 kg da amostra, aplicou-se a equação 3.

$$IP = [(A - B) \times M \times f \times 100] / P \quad (3)$$

Onde:

A = mL da solução de tiosulfato de sódio 0,01 mol L⁻¹ gasto na titulação da amostra; B = mL da solução de tiosulfato de sódio 0,01 mol L⁻¹ gasto na titulação do branco; M = molaridade da solução de tiosulfato de sódio; f = fator da solução de tiosulfato de sódio (0,979); P = quantidade (em g) da amostra.

4.11.2.2. Determinação de Compostos Fenólicos Totais (CFT) nas emulsões

Previamente se realizou um teste preparando uma emulsão contendo 1 % do padrão ácido gálico (Sigma Aldrich®). Esta emulsão foi testada para CFT a fim de se demonstrar que a base da emulsão não oferece interferência nos testes de determinação nas emulsões testes.

Nas emulsões, a determinação de compostos fenólicos totais (CFT) seguiu a mesma técnica descrita anteriormente, em triplicata (SINGLETON; ROSSI, 1965). Preparou-se as amostras de creme na proporção de 200 mg mL⁻¹ e os teores de CFT foram determinados por comparação das absorbâncias das amostras contra a curva de calibração com o padrão ácido gálico e expressa como miligrama de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de amostra de creme.

4.11.2.3. Avaliação microbiológica qualitativa nas emulsões

Após submeter as formulações às três condições de armazenamento (40,0 ± 2,0 °C, 5,0 ± 2,0 °C e exposição à radiação UV) cada uma foi submetida à avaliação microbiológica qualitativa, em triplicata, a fim de verificar a presença de contaminação bacteriana ou fúngica durante o período analisado. Para tal, preparou-se diluições das emulsões em solução salina 0,85 % estéril na proporção 1:10 (p/v), e então semeou-se 10 µL das suspensões em AMH e ASD, incubando-se a 37,0 °C por 24 horas e 25,0 °C por 5 dias, respectivamente.

4.12. Análise estatística

Todas as medidas foram feitas em triplicata e, quando adequado para interpretação, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 95 %, com auxílio do software estatístico Past 2.17c 2013.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Rendimento, compostos bioativos e atividade antioxidante

Inicialmente, no processo de extração de própolis bruta (200,0 g) obteve-se um rendimento médio de 49,24 % de EBE, o que está de acordo com outros estudos, como o realizado por Coelho (2013), em que preparou 17 extratos de própolis de diferentes regiões do Brasil, obtendo rendimento médio de 55,55 %.

Por fracionamento líquido-líquido (partindo-se de 80,0 g do EBE), com base nas diferentes solubilidades dos componentes da amostra, obteve-se rendimento médio de 14,81 % para a F-HEX, 62,84 % para a F-ACT e 0,71 % para F-AQ. Após a obtenção do extrato e frações, determinou-se por ensaios espectrofotométricos os teores de flavonoides (FLA) e compostos fenólicos totais (CFT), bem como atividade antioxidante (AA), como se pode observar na Tabela 2.

Tabela 2 – Teores médios de compostos fenólicos totais (CFT), flavonoides (FLA) e atividade antioxidante (AA) pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP no extrato bruto (EBE) e frações (F-HEX, F-ACT e F-AQ) de própolis verde.

	CFT (mg EAG g ⁻¹)	FLA (mg EQ g ⁻¹)	AA		
			DPPH (μmol ET g ⁻¹)	ABTS (μmol ET g ⁻¹)	FRAP (μmol de Fe(II) g ⁻¹)
EBE	105,43 ± 3,18 ^a	48,01 ± 0,57 ^a	726,94 ± 30,26 ^a	750,20 ± 8,14 ^a	1407,89 ± 26,08 ^a
F-HEX	43,11 ± 1,69 ^d	11,91 ± 0,68 ^d	415,87 ± 35,91 ^d	561,36 ± 22,93 ^d	157,44 ± 19,17 ^d
F-ACT	138,41 ± 2,54 ^c	85,84 ± 1,21 ^c	1160,17 ± 18,9 ^c	1023,30 ± 18,5 ^c	2020,22 ± 13,37 ^c
F-AQ	16,46 ± 0,65 ^d	9,07 ± 0,51 ^d	329,01 ± 24,64 ^d	145,87 ± 18,50 ^d	NR

Os resultados representam a média ± desvio padrão (n=3)

EAG: equivalente de ácido gálico; EQ: equivalente de quercetina; ET: equivalente de Trolox.

NR: amostra insuficiente para realizar o teste.

Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Foi possível observar que, quanto ao teor de CFT médio obtido por curva padrão com ácido gálico ($R^2 = 0,998$), o EBE apresentou teor de 105,43 mg EAG g⁻¹ e a F-ACT de 138,41 mg EAG g⁻¹, resultados significativamente superiores às frações F-HEX e F-AQ (43,11 mg EAG g⁻¹ e 16,46 mg EAG g⁻¹, respectivamente), o que sugere que existem compostos fenólicos de diferentes polaridades no extrato bruto que foram separados pela técnica de fracionamento líquido-líquido. Cabral et al. (2009) em estudo com a própolis vermelha, obtiveram 25,0 mg EAG g⁻¹ no extrato bruto e, de maneira semelhante, também se observou após o fracionamento, um maior teor de CFT no solvente clorofórmio (249,75 mg AG g⁻¹), que possui

polaridade semelhante ao acetato de etila ($P'=4,1$ e $P'=4,4$, respectivamente) e significativamente inferior na fração com hexano ($154,83 \text{ mg AG g}^{-1}$) que é apolar ($P'=0,1$) (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Comparando-se os resultados obtidos aos parâmetros exigidos pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2001), quanto ao teor mínimo de CFT no extrato alcoólico de própolis ($> 0,5 \text{ \% m m}^{-1}$) os valores para o EBE apresentam-se dentro do preconizado, com resultado de $105,43 \text{ mg mL}^{-1}$ ($10,54 \text{ \%}$). Funari e Ferro (2006) encontraram valor de $7,39 \text{ \%}$ em uma amostra coletada no Estado de São Paulo, pelo mesmo método. Silva et al. (2006), analisando amostras de própolis da Paraíba, obtida em diferentes épocas do ano, encontraram teores de CFT inferiores aos do presente estudo ($2,93 \text{ \%}$ e $8,13 \text{ \%}$), e concluíram que os compostos podem sofrer variações de acordo com o período de colheita.

Quanto ao teor mínimo de flavonoides, obtido por curva padrão com quercetina ($R^2 = 0,998$) o EBE apresentou resultado superior ao mínimo preconizado pela legislação ($> 0,25 \text{ \% m m}^{-1}$) com $48,01 \text{ mg mL}^{-1}$ ($4,80 \text{ \%}$), que o caracteriza como tendo teor elevado destes compostos ($> 2 \text{ \%}$) (BRASIL, 2001). Também se observou concentração significativamente maior ($p < 0,05$) na F-ACT quando comparada às demais. Gutierrez-Gonçalves e Marcucci (2009), ao analisar amostras de própolis do estado do Ceará, obtiveram resultados oscilando de acordo com a região de coleta, com valores médios para flavonoides inferiores ($1,17 \text{ \%}$) e superiores ($8,09 \text{ \%}$) ao presente estudo. De forma similar, Castro et al. (2007) relata oscilações de acordo com a estação do ano, com resultados entre $2,41$ e $47,31 \text{ mg EQ g}^{-1}$. Ainda Funari e Ferro (2006) obtiveram quase metade do teor de FLA no EBE, com $2,64 \text{ \%}$, ressaltando os bons resultados obtidos neste estudo.

Avaliando a atividade antioxidante pelos três métodos, observam-se resultados significativamente superiores ($p < 0,05$) para a F-ACT, com valores médios de $1160,17$ e $1023,30 \text{ } \mu\text{mol ET g}^{-1}$ (DPPH e ABTS, respectivamente) e $2020,22 \text{ } \mu\text{mol de Fe (II) g}^{-1}$ por FRAP. Contudo, podem-se observar para as mesmas amostras resultados diferentes de acordo com o método utilizado, o que é justificável, segundo Mello e Hubinger (2012) pelos princípios distintos em que se baseiam, visto que o FRAP baseia-se na redução do ferro, enquanto ABST e DPPH no sequestro dos radicais livres (FLOEGEL et al., 2011). Pelo fato de cada método apresentar vantagens ou desvantagens dependendo do tipo de produto analisado, é

recomendado o uso de ao menos dois para se ter uma estimativa confiável da capacidade antioxidante (RUFINO et al., 2010).

Resultados apresentados por Lacerda (2012), analisando 78 amostras de própolis orgânica coletadas em diferentes locais do país durante o ano todo, demonstram atividade variando de 4,50 a 148,10 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ para DPPH nas diferentes estações, resultados muito inferiores aos do presente estudo. Oliveira e Andolfatto (2014) ao avaliar própolis produzida por abelhas geneticamente modificadas provenientes de Dois Vizinhos – PR obteve resultados de 60,67 $\mu\text{mol de Fe (II) g}^{-1}$ (FRAP) e 52,08 $\mu\text{mol de ET g}^{-1}$ (ABTS), o que mostra que o EBE de própolis analisado no presente estudo possui atividade antioxidante muito superior. Por outro lado Bonvehi e Gutiérrez (2011) obtiveram valores entre 420 a 1430 $\mu\text{mol de ET g}^{-1}$ (ABTS) em amostras de própolis preparadas com solventes distintos, semelhantes por este método em relação aos resultados do presente estudo.

Pondera-se com estes resultados que a fração de própolis (F-ACT) que apresentou concentrações superiores de compostos bioativos também foi a que apresentou os melhores resultados para a atividade antioxidante pelos três métodos avaliados, o que pode ser justificado pelo fato de o acetato de etila ser um solvente de polaridade intermediária ($P'=4,4$) entre o hexano ($P'=0,1$) e etanol ($P'=5,2$), levando a concentração dos compostos obtidos no EBE, bem como redução do teor de interferentes apolares (ceras) que tem afinidade pelo hexano, utilizado na primeira etapa do fracionamento (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; BISPO JUNIOR et al., 2012).

5.2. Atividade antimicrobiana

Os resultados obtidos após a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato e frações de própolis verde, verificada frente às bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* MRSA e Gram-negativas *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi* e *Pseudomonas aeruginosa*, bem como à levedura *Candida albicans*, pela técnica de microdiluição em caldo, estão descritos na Tabela 3. Os resultados demonstram que a F-ACT apresentou maior atividade contra todas as bactérias e a levedura avaliadas neste estudo. Estes resultados

indicam que, de modo geral, o aumento da concentração de CFT e FLA no extrato proporcionou aumento na sua atividade inibitória.

Porém, Oliveira et al. (2012) não observaram relação entre a atividade antimicrobiana e os teores de flavonoides e fenóis totais para o extrato de própolis analisado. Apesar de todas as amostras se mostrarem adequadas quanto aos teores mínimos dos compostos, não se observou atividade antibacteriana e antifúngica para nenhuma amostra quando avaliadas por disco-difusão em concentração de 30 % (300 mg mL⁻¹) do extrato de própolis.

Assim se justifica o fato de, apesar apresentar compostos em quantidades muito superiores ao exigido pela legislação, foram necessárias concentrações relativamente altas para causar inibição dos microrganismos testados. Isto pode ser explicado ao fato de que o mecanismo desta atividade é considerado complexo e não é atribuído a compostos isolados, e sim ao sinergismo entre flavonoides, hidroxiácidos e sesquiterpenos (FERNANDES JUNIOR et al., 2006).

Tabela 3 – Resultados de concentração inibitória mínima (CIM) do extrato bruto (EBE) e frações (F-HEX, F-ACT, F-AQ) de própolis verde frente a bactérias (*S. aureus*, *S. aureus* MRSA, *E. coli*, *S. Typhi* e *P. aeruginosa*) e à levedura (*C. albicans*).

	CIM (mg mL ⁻¹)					
	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> MRSA	<i>E. coli</i>	<i>S. Typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
EBE	10,0	10,0	20,0	20,0	20,0	5,0
F-HEX	20,0	40,0	40,0	80,0	80,0	20,0
F-ACT	5,0	10,0	20,0	20,0	20,0	2,5
F-AQ	20,0	20,0	20,0	40,0	40,0	NR

Os valores representam a média dos resultados (n=3).

CIM: Concentração inibitória mínima.

NR: amostra insuficiente para realizar o teste.

Neste contexto, Castro et al. (2007) mostram que, apesar de revelar forte atividade antibacteriana, com resultados de CIM variando entre 50 e 200 µg mL⁻¹ de acordo com a época do ano, uma das amostras de própolis apresentou baixo teor de compostos fenólicos, justificando que a atividade antibacteriana varia em função da sazonalidade, devido a alteração da concentração dos compostos ativos oriundos de fontes vegetais destas própolis.

É possível avaliar ainda que a sensibilidade aos extratos foi maior contra as bactérias Gram-positivas, *S. aureus* e *S. aureus* MRSA, em que as CIM obtidas foram de 5,0 e 10,0 mg mL⁻¹, respectivamente, para a F-ACT, onde se observou as

melhores atividades. Para as Gram-negativas, *E. coli*, *S. Typhi* e *P. aeruginosa*, obteve-se CIM de 20 mg mL⁻¹ na F-ACT. Resultados semelhantes foram obtidos por Fernandes Junior et al. (2006), avaliando própolis obtidas em diferentes regiões do Brasil, onde frente à *S. aureus* a CIM foi de 3,0 a 8,0 mg mL⁻¹, e frente à *E. coli* de 70,0 a 82,0 mg mL⁻¹.

Esta melhor atividade inibitória de extratos de própolis contra bactérias Gram-positivas também foi relatada por Siripatrawan, Vitchayakitti e Sanguandeeikul (2013), em que extratos etanólicos de própolis foram eficientes na inibição de *S. aureus* na concentração mínima de 30 % (300 mg mL⁻¹) no método de disco-difusão, mas não tinham atividade contra nenhuma bactéria Gram-negativa avaliada (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. enteritidis*). Outro estudo demonstrou que frente às bactérias *Cronobacter sp.*, *E. coli* O157:H7 e *S. enteritidis* os extratos de própolis testados não demonstraram atividade entre 0,56 e 10000 µg mL⁻¹. Por outro lado, as bactérias Gram-positivas *S. aureus*, *E. faecalis* e *B. cereus* avaliadas no estudo, foram sensíveis com CIM de 156 µg mL⁻¹, 625 µg mL⁻¹ e 39 µg mL⁻¹, respectivamente (FUGIMOTO, 2016).

Além destes, outros estudos demonstram que a atividade antibacteriana da própolis é mais eficiente sobre bactérias Gram-positivas (VARGAS et al., 2004; SILICI; KUTLUCA, 2005; FERNANDES JUNIOR et al., 2006; SILVA, 2009). A justificativa está nas diferenças estruturais da parede celular entre as bactérias, sendo a das Gram-positivas composta por uma espessa camada de peptidoglicanos, enquanto a de bactérias Gram-negativas possui uma fina camada de peptidoglicanos e uma camada adicional de lipopolissacarídeos (LPS), que pode ser impermeável a muitas moléculas, como os compostos fenólicos presentes nos extratos de própolis (FERNANDES JUNIOR et al., 2006; SILVA et al, 2012).

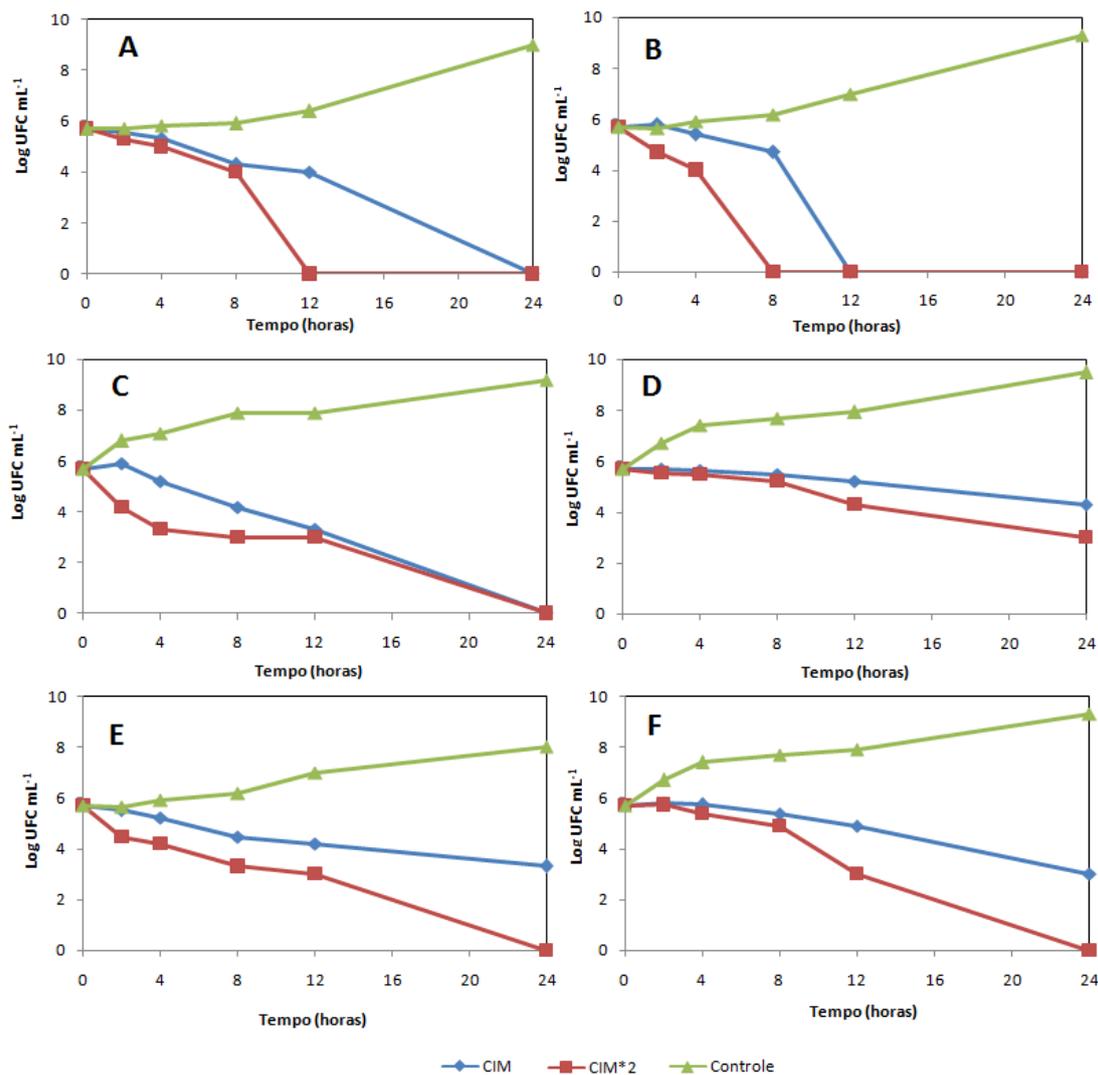
Com relação à levedura *C. albicans*, onde se obteve a menor CIM (2,5 mg mL⁻¹ na F-ACT), observa-se também em outros estudos a eficácia de extratos de própolis frente à este microrganismo, com CIM até inferiores ao presente estudo, como mostra Freires et al. (2016) ao avaliar dois tipos de própolis brasileira, com resultados de CIM para a fração acetato de etila de 4,0 µg mL⁻¹. Em contrapartida, resultados de CIM muito similares aos do presente estudo foram obtidos por Ota et al. (2001) frente à *C. albicans*, variando de 4,0 a 8,0 mg mL⁻¹ em extratos etanólicos de própolis. Ainda Lopez et al. (2015) observaram que são necessárias

concentrações acima de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ para que extratos de própolis sejam efetivos contra *C. albicans*, de acordo também com o presente estudo.

5.3. Cinética de morte microbiana

Para obtenção das curvas de morte microbiana, foi avaliada a influência da F-ACT de própolis na CIM e CIM*2 no crescimento das cepas de microrganismos, juntamente ao controle com meio de cultura e etanol na concentração utilizada para dissolver a fração. Os resultados encontram-se na Figura 5, que demonstra o \log_{10} UFC mL^{-1} em função do tempo.

Figura 5 – Tempo de morte microbiana após exposição das bactérias e levedura à F-ACT de própolis em CIM e CIM*2 durante o período de 24 horas.



A: *C. albicans*; B: *S. aureus*; C: *S. aureus* MRSA; D: *E. coli*; E: *S. Typhi*; F: *P. aeruginosa*

A definição de atividade bactericida/fungicida requer 99,9 % de morte do inóculo com relação ao inicial e é determinada observando diminuição de $> 3 \log_{10}$ UFC mL⁻¹. Do contrário, é considerada bacteriostática/fungistática (PFALLER, SHEEHAN, REX, 2004; BAPTISTA, 2012). Desta forma, ressalta-se que houve comportamento ascendente no controle e diminuição ou inviabilidade de crescimento em meio de cultura na presença da F-ACT em diferentes concentrações, caracterizando ação bioativa antimicrobiana.

Verificou-se que a curva de morte da cepa de *C. albicans* frente à F-ACT de própolis em CIM e CIM*2 (2,5 e 5,0 mg mL⁻¹) mostrou-se descendente a partir do tempo zero, observado em 2 horas do início da incubação. Este comportamento se manteve, com efeito fungicida em 24 horas na CIM e 12 horas na CIM*2.

O resultado da curva de morte da cepa de *S. aureus* frente à CIM e CIM*2 de F-ACT de própolis (5,0 e 10,0 mg mL⁻¹), revelou que a partir de 12 horas na CIM e 8 horas na CIM*2 não se observou nenhum crescimento bacteriano (efeito bactericida), o que ratifica a ótima atividade de extrato e frações de própolis frente às bactérias gram-positivas, já observada em vários estudos (VARGAS et al., 2004; SILICI; KUTLUCA, 2005; FERNANDES JUNIOR et al., 2006; SILVA, 2009; SIRIPATRAWAN; VITCHAYAKITTI; SANGUANDEEKUL, 2013; FUGIMOTO, 2016)

Na cinética do *S. aureus* MRSA verificou-se curva descendente em CIM (10,0 mg mL⁻¹) a partir de 2 horas e em CIM*2 (20,0 mg mL⁻¹) a partir do tempo zero. Efeito bactericida foi observado após 24 horas em ambas as concentrações.

Observou-se que a curva de morte da cepa de *E. coli* frente à F-ACT de própolis na CIM e CIM*2 (20,0 e 40,0 mg mL⁻¹) foi estável até a 8ª hora e após, ligeiramente descendente, com redução de 1,39 log em CIM e 2,69 log em CIM*2 em 24 horas. Este foi o único microrganismo em que não se evidenciou efeito bactericida em nenhuma das concentrações, somente bacteriostático.

Avaliando a curva de *S. Typhi* frente à CIM e CIM*2 de F-ACT de própolis (20,0 e 40,0 mg mL⁻¹), observa-se comportamento descendente para ambas a partir do tempo zero, porém bactericida apenas na CIM*2 em 24 horas, enquanto na CIM o efeito foi considerado bacteriostático (redução $< 3 \log_{10}$ UFC mL⁻¹).

Na determinação da curva da cepa *P. aeruginosa*, testada frente a F-ACT de própolis em CIM e CIM*2 (20,0 e 40,0 mg mL⁻¹, respectivamente) se observou que, a partir da segunda hora de incubação, houve curva descendente na quantificação de

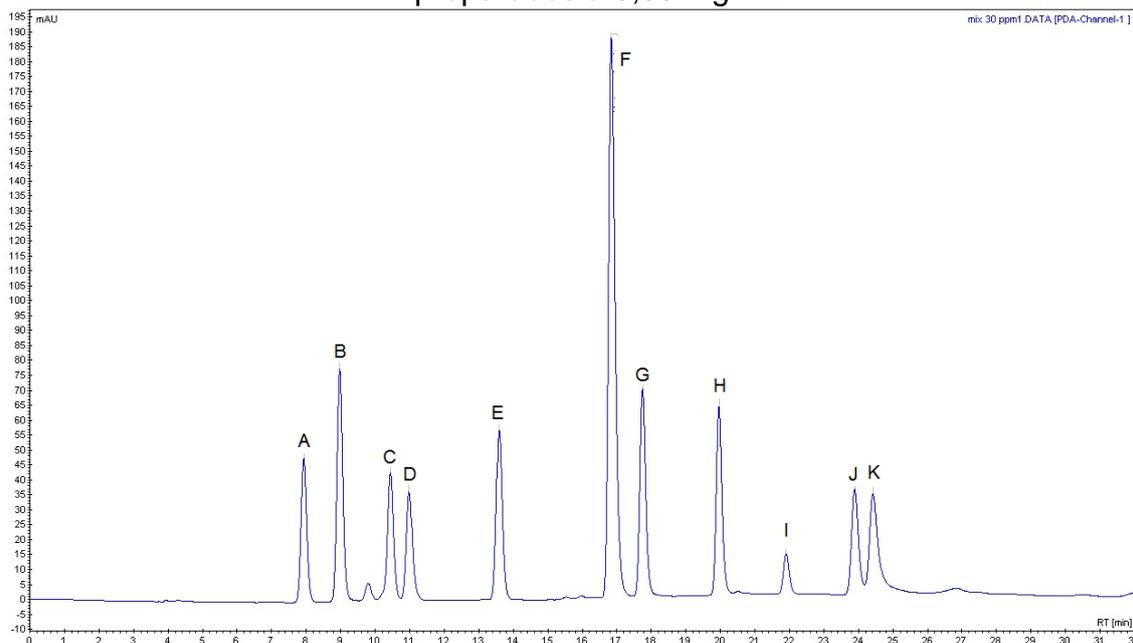
UFC mL⁻¹, com redução de 2,69 log em CIM e 5,69 log (ausência) em CIM*2, em 24 horas relativo ao tempo zero. Observa-se, portanto, efeito bacteriostático em CIM e bactericida em CIM*2.

Considerando tempo *versus* concentração, resultados mais efetivos foram obtidos frente a *C. albicans* e *S. aureus* e menos efetivos para *E. coli*, resultados que relacionam-se com os obtidos na CIM, onde os mesmos microorganismos foram sensíveis nas menores concentrações da fração. Foi possível verificar que o aumento do efeito antimicrobiano é dependente da concentração de F-ACT utilizada, comportamento semelhante ao observado por Pinheiro (2014).

5.4. Análise por CLAE-DAD

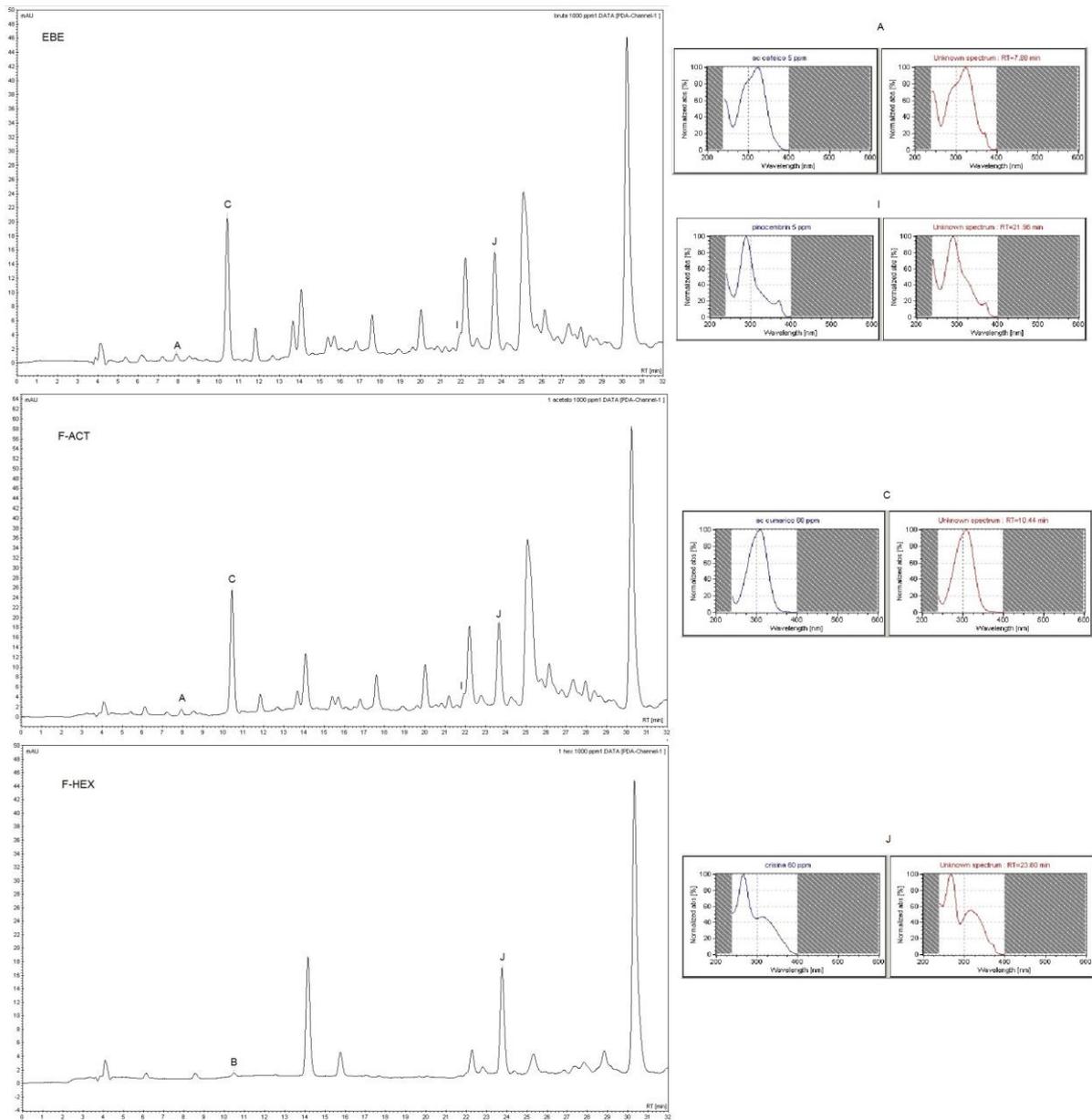
A identificação dos ácidos fenólicos e flavonoides presentes no EBE e frações de própolis verde foi baseada na comparação dos tempos de retenção (TR) e espectros de absorção no ultravioleta (UV) com padrões autênticos (mix de 0,03 mg mL⁻¹). Os dados obtidos com relação a estes parâmetros, referentes aos padrões e amostras, bem como as concentrações dos compostos detectados, podem ser observados nas Figuras 6 e 7 e Tabela 4.

Figura 6 – Cromatograma do mix de padrões (ácidos fenólicos e flavonoides) preparados a 0,03 mg mL⁻¹



A – Ácido cafeico; B – Mangiferina; C – Ácido *p*-cumárico; D – Ácido ferúlico; E – Rutina; F – Ácido trans cinâmico; G – Quercetina; H – Canferol; I – Pinocebrina; J – Crisina; K – Galangina.

Figura 7 - Cromatogramas do extrato bruto etanólico (EBE), fração acetato de etila (F-ACT) e fração hexânica (F-HEX) e comparações entre os picos dos padrões de referência (linha azul) com os compostos identificados nas amostras (linha vermelha)



A – Ácido cafeico; C – Ácido *p*-cumárico; I – Pinocembrina; J – Crisina.

O EBE e F-ACT apresentaram composição qualitativa idêntica por CLAE-DAD e quatro compostos foram identificados, sendo estes ácidos fenólicos, flavonas e flavanonas. A análise permitiu identificar e quantificar no EBE e F-ACT os ácidos fenólicos cafeico e *p*-cumárico, que estão em maior quantidade na F-ACT, demonstrando um aumento na concentração dos compostos presentes no EBE. Foi possível ainda identificar a presença da pinocembrina (5,7-dihidroxi-flavanona) e

crisina (5,7-dihidroxi-flavona) nestas mesmas amostras, porém não foi possível quantificá-las devido à quantidade ser muito pequena. Na F-HEX somente identificou-se ácido *p*-cumárico e crisina.

Esta composição qualitativa está de acordo com o que relata Lacerda et al. (2011), em que afirma que a própolis verde, encontrada no Brasil na região de Minas Gerais, que é o mesmo local de origem da própolis avaliada neste estudo, é rica em terpenóides e derivados prenilados do ácido cumárico. Como se pode observar na Tabela 4, o ácido *p*-cumárico foi o composto predominante nos resultados obtidos neste estudo, apresentando teores de 13,995 mg mL⁻¹ no EBE e 16,073 mg mL⁻¹ na F-ACT.

Tabela 4 – Tempo de retenção (TR) (minutos), dados de calibração externa dos padrões (equação da reta e R²) e concentração (mg g⁻¹) dos compostos identificados no extrato bruto etanólico (EBE), fração acetato de etila (F-ACT) e fração hexânica (F-HEX) de própolis verde.

Composto	TR (min)	Equação da reta	R ²	Concentração (mg g ⁻¹)		
				EBE	F-ACT	F-HEX
Ácido cafeico	7,93	y = 0,2955 x – 0,1008	0,9895	0,117	0,331	—
Mangiferina	8,97	y = 0,4030 x – 0,1228	0,9878	—	—	—
Ácido cumárico	10,44	y = 0,2780 x – 0,1548	0,9879	13,995	16,073	Traços
Ácido ferúlico	10,99	y = 0,2277 x – 0,1089	0,9912	—	—	—
Rutina	13,59	y = 0,3089 x – 0,1313	0,9868	—	—	—
Ácido transcinâmico	16,84	y = 1,3844 x – 0,9735	0,9935	—	—	—
Quercetina	17,75	y = 0,5401 x – 0,4032	0,9901	—	—	—
Canferol	19,96	y = 0,5167 x – 0,4285	0,9930	—	—	—
Pinocembrina	21,91	y = 0,0873 x – 0,1025	0,9906	Traços	Traços	—
Crisina	23,89	y = 0,2431 x – 0,0849	0,9911	Traços	Traços	13,468
Galangina	24,41	y = 0,3458 x – 0,8594	0,9860	—	—	—

— : não detectado;

Os ácidos *p*-cumárico, clorogênico e cafeico, assim como o artepelin C são citados na literatura como principais constituintes de própolis verde (SALGUEIRO; CASTRO, 2016). O ácido clorogênico e artepelin C não estavam entre os padrões utilizados, porém o cafeico e *p*-cumárico foram identificados, e este último em quantidades superiores aos demais, tanto no EBE como na F-ACT. Salgueiro e Castro (2016) analisando 24 amostras de tintura de própolis comercial e extrato de própolis verde *in natura* detectaram pelo mesmo método, a presença do ácido cafeico em teores variando de 0,2 a 15,1 mg g⁻¹ frente a um teor de até 0,331 mg g⁻¹ neste estudo e de *p*-cumárico com concentrações semelhantes, entre 0,8 a 29,3 mg g⁻¹, contra 16,073 mg g⁻¹ no extrato bruto neste estudo.

Marcucci (2006) também relata a presença de ácido cafeico e *p*-cumárico, além do artepelin C em praticamente todas as 200 amostras de própolis analisadas por CLAE, em diferentes regiões do Brasil, e afirma baseado em seus resultados e de outros estudos, que estes compostos podem servir como marcadores da própolis brasileira. Da mesma forma Sousa et al. (2007a) analisando própolis em quatro localidades de São Paulo e Minas Gerais, sendo este último o mesmo local de coleta da amostra do presente estudo, detectou teores de ácido cafeico e *p*-cumárico variando entre 0,5 e 1,5 % para as quatro localidades estudadas. Os teores de ácido cafeico no presente estudo foram inferiores (0,01 % no EBE e 0,03 % na F-ACT) e os de ácido *p*-cumárico semelhantes (1,4 % no EBE e 1,6 % na F-ACT).

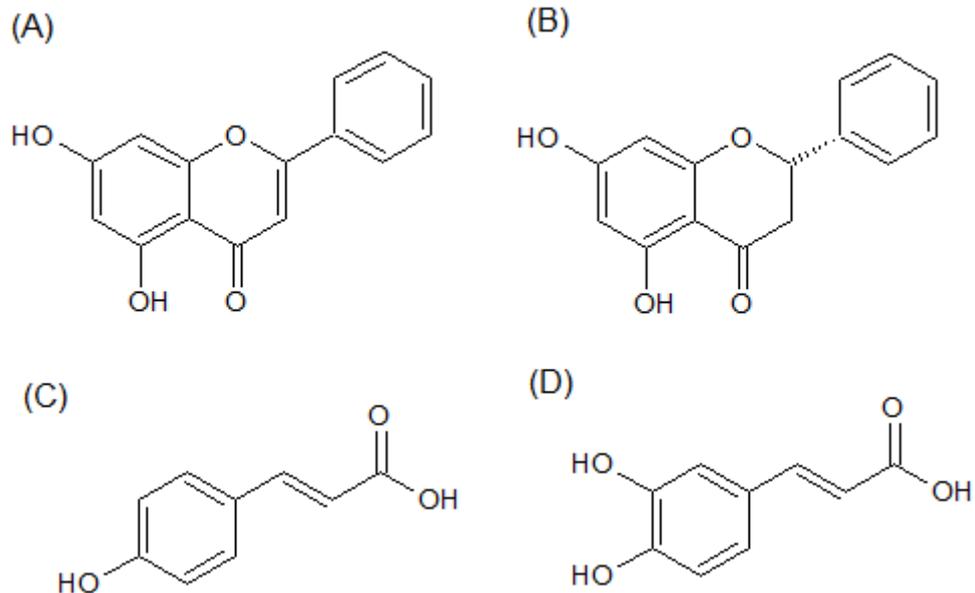
Del Prado et al. (2013) analisaram 6 amostras de própolis de diversas regiões do estado do Paraná e foram identificados 9 compostos por CLAE, sendo ácido cafeico, *p*-cumárico, pinocembrina, crisina, apigenina, éster fenetil do ácido cafeico, galangina, acacetina e artepelin C. Desta forma caracterizou suas amostras como sendo de própolis verde, com resultados muito similares ao presente estudo.

A composição química da própolis depende da localização, flora e região da coleta, bem como do solvente usado (SALGUEIRO; CASTRO, 2016). A solubilidade dos compostos extraídos varia de acordo com a polaridade do solvente, grau de polimerização dos fenólicos e suas interações com outros constituintes presentes no material (ANGELO; JORGE, 2007). Neste sentido, observa-se que os extratos mais polares de própolis, EBE ($P'=5,2$) e F-ACT ($P'=4,4$), apresentaram mais compostos quando comparados a F-HEX, apolar ($P'=0,1$), onde foram identificados 4 nos primeiros e 2 no segundo. Isso se explica devido à afinidade dos compostos fenólicos polares presentes na própolis, relacionada à estrutura química, representada na Figura 8, onde se observa que os compostos encontrados na F-HEX (A e B) têm estrutura menos polar que os demais (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCHM 1997).

Diante dos resultados para a identificação e quantificação dos compostos por CLAE, pode-se comparar com os resultados de Simoes et al. (2004), onde afirma que a atividade antioxidante está correlacionada com a composição química do extrato e frações, especialmente à presença de flavonoides e derivados do ácido *p*-cumárico. Desta forma, e seguindo o mesmo perfil obtido na determinação total de CFT e FLA por métodos espectrofotométricos, é provável que as melhores

atividades antioxidante e antimicrobiana na F-ACT devam-se à maior concentração de compostos nesta fração.

Figura 8 - Estrutura química dos flavonoides crisina(A), pinocembrina(B) e ácidos fenólicos p-cumárico(C) e cafeico(D) identificados nas amostras analisadas por CLAE-DAD



Fonte: (Adaptado de BANKOVA; POPOV; MAREKOV, 1982 e BURATTI; BENEDETTI; COSIO, 2007)

5.5. Testes de estabilidade preliminar

Analisando os resultados das atividades biológicas (antioxidante e antibacteriana), bem como a quantificação de compostos bioativos (CFT e FLA por espectrofotometria e CLAE-DAD), foi possível avaliar que se obteve teor de compostos e atividade antioxidante superiores, bem como maior número compostos identificados e quantificados na fração acetato de própolis (F-ACT). Portanto, optou-se por aplicar esta fração ao produto proposto (emulsão O/A não iônica) a fim de verificar sua influência na estabilidade das formulações.

Após 24 h da aplicação em emulsões O/A não iônicas a base de Polawax[®], deu-se início aos ensaios de estabilidade, registrando-se os resultados para características organolépticas (aspecto, cor e odor), pH, densidade e espalhabilidade, como tempo zero (T0), conforme verifica-se na Tabela 5.

Observou-se que as emulsões acrescidas de extrato de própolis 0,2 e 2,0 % apresentaram mudanças na cor e odor, proporcionais à concentração de extrato

incorporado. Esta alteração nos parâmetros organolépticos das emulsões acrescidas de própolis verde também foi relatada por Souza (2016), porém sem interferir na estabilidade do produto.

Tabela 5 - Parâmetros avaliados nas formulações controle com conservantes sintéticos e sem conservantes (F1 e F2, respectivamente) e testes como antioxidante antimicrobiano e antioxidante + antimicrobiano (F3, F4 e F5, respectivamente) após 24 horas do preparo, considerado tempo zero (T0)

Amostras	Características organolépticas			pH	Densidade (g cm ⁻³)	Espalhabilidade (mm ² g ⁻¹)
	Aspecto	Cor	Odor			
F1	H	B	P	6,91 ± 0,01 ^a	0,93 ± 0,04 ^a	5,86 ± 0,08 ^a
F2	H	B	P	6,92 ± 0,02 ^a	0,98 ± 0,03 ^a	5,33 ± 0,09 ^a
F3	H	LA	CP	6,50 ± 0,02 ^b	0,95 ± 0,05 ^a	5,87 ± 0,08 ^a
F4	H	A	CP	6,44 ± 0,01 ^c	0,95 ± 0,04 ^a	5,33 ± 0,09 ^a
F5	H	A	CP	6,30 ± 0,03 ^d	0,97 ± 0,04 ^a	5,33 ± 0,07 ^a

H: Homogêneo; B: Branca; LA: Levemente amarela; A: Amarela; P: Padrão; CP = característico de própolis.

Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Com relação ao pH, pode-se constatar que as emulsões acrescidas de extrato de própolis (F3, F4 e F5) apresentaram um pH significativamente ($p < 0,05$) mais ácido frente às emulsões controle (F1 e F2), o que pode ser justificado pelo valor de pH da fração de própolis (F-ACT), que foi de 6,34 caracterizando-o como ligeiramente ácido. Tratando-se de densidade e espalhabilidade, não houve diferença significativa entre as formulações ($p > 0,05$). Zanin et al. (2001) obteve resultados semelhantes avaliando a estabilidade de emulsões a base de Polawax[®] sem adição de ativos, com valor de espalhabilidade após todas as avaliações entre 4,96 e 4,97 mm² g⁻¹. Stocco e Faria (2014) avaliando a estabilidade de emulsões aniônicas a base de Lanette[®] como cera auto-emulsionante, sem princípios ativos, obteve valores de densidade para as formulações variando entre 0,9 e 1,0 g mL⁻¹, resultados que também corroboram com os obtidos neste estudo.

Antes de iniciar as avaliações de estabilidade preliminar, os produtos foram submetidos ao teste de centrifugação e estresse em banho térmico, sendo então avaliados novamente os mesmos parâmetros relatados em T0, com resultados nas Tabelas 6 e 7. As 5 formulações permaneceram sem alteração significativa dos parâmetros avaliados, indicando não haver incompatibilidade entre os componentes e estando aptas para iniciar os demais testes (BRASIL, 2004).

O teste de centrifugação fornece informações rápidas sobre a estabilidade das emulsões, pois quando submetidas a esta condição, podem ocorrer os

fenômenos de cremação ou coalescência. Caso não ocorram esses processos, pode-se supor que a emulsão será estável em condições gravitacionais normais, visto que a aceleração da gravidade aumenta o número de colisões entre os glóbulos, acelerando assim a ocorrência desses fenômenos (SOUZA, 2016).

Tabela 6 - Comparação dos parâmetros avaliados nas formulações controle com conservantes sintéticos e sem conservantes (F1 e F2, respectivamente) e testes (F3, F4 e F5) antes e após centrifugação.

ORG	Após	pH		Densidade (g cm ⁻³)		Espalhabilidade (mm ² g ⁻¹)	
		Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
F1	N	6,91 ± 0,01 ^{Aa}	6,92 ± 0,01 ^{Aa}	0,93 ± 0,04 ^{Aa}	0,95 ± 0,05 ^{Aa}	5,86 ± 0,08 ^{Aa}	6,14 ± 0,07 ^{Aa}
F2	N	6,92 ± 0,02 ^{Aa}	6,92 ± 0,01 ^{Aa}	0,98 ± 0,03 ^{Aa}	0,98 ± 0,03 ^{Aa}	5,33 ± 0,09 ^{Aa}	5,35 ± 0,06 ^{Aa}
F3	N	6,50 ± 0,02 ^{Ab}	6,54 ± 0,02 ^{Ab}	0,95 ± 0,05 ^{Aa}	0,95 ± 0,04 ^{Aa}	5,87 ± 0,08 ^{Aa}	6,14 ± 0,07 ^{Aa}
F4	N	6,44 ± 0,01 ^{Ac}	6,45 ± 0,01 ^{Ac}	0,95 ± 0,04 ^{Aa}	0,96 ± 0,04 ^{Aa}	5,33 ± 0,09 ^{Aa}	5,61 ± 0,08 ^{Aa}
F5	N	6,30 ± 0,03 ^{Ad}	6,30 ± 0,02 ^{Ad}	0,97 ± 0,04 ^{Aa}	0,96 ± 0,03 ^{Aa}	5,33 ± 0,07 ^{Aa}	5,35 ± 0,09 ^{Aa}

N: Normal; LM: Levemente modificada; M: modificada; IM: Intensamente modificada.

ORG: características organolépticas.

Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (p < 0,05)

Letras maiúsculas diferentes nas linhas, para cada parâmetro, indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Tabela 7 - Comparação dos parâmetros avaliados nas formulações controle com conservantes sintéticos e sem conservantes (F1 e F2, respectivamente) e testes como antioxidante, antimicrobiano e antioxidante + antimicrobiano (F3, F4 e F5, respectivamente) antes e após estresse térmico.

ORG	Após	pH		Densidade (g cm ⁻³)		Espalhabilidade (mm ² g ⁻¹)	
		Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
F1	N	6,91 ± 0,01 ^{Aa}	6,90 ± 0,01 ^{Aa}	0,93 ± 0,04 ^{Aa}	0,95 ± 0,05 ^{Aa}	5,86 ± 0,08 ^{Aa}	6,14 ± 0,07 ^{Aa}
F2	N	6,92 ± 0,02 ^{Aa}	6,92 ± 0,01 ^{Aa}	0,98 ± 0,03 ^{Aa}	0,98 ± 0,03 ^{Aa}	5,33 ± 0,09 ^{Aa}	5,35 ± 0,06 ^{Aa}
F3	N	6,50 ± 0,02 ^{Ab}	6,48 ± 0,03 ^{Ab}	0,95 ± 0,05 ^{Aa}	0,95 ± 0,04 ^{Aa}	5,87 ± 0,08 ^{Aa}	6,14 ± 0,09 ^{Aa}
F4	N	6,44 ± 0,01 ^{Ac}	6,41 ± 0,03 ^{Ac}	0,95 ± 0,04 ^{Aa}	0,96 ± 0,04 ^{Aa}	5,33 ± 0,09 ^{Aa}	5,61 ± 0,08 ^{Aa}
F5	N	6,30 ± 0,03 ^{Ad}	6,32 ± 0,03 ^{Ad}	0,97 ± 0,04 ^{Aa}	0,96 ± 0,03 ^{Aa}	5,33 ± 0,07 ^{Aa}	5,35 ± 0,07 ^{Aa}

N: Normal; LM: Levemente modificada; M: modificada; IM: Intensamente modificada.

ORG: características organolépticas.

Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Letras maiúsculas diferentes nas linhas, para cada parâmetro, indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Oliveira (2007) também verificou estabilidade de formulação a base de Polawax[®] nesta condição, contendo extrato de própolis 2,5 %, sendo que das 7 formulações testadas, apenas 2 não sofreram separação de fases no teste de centrifugação, uma a base de Hostacerin[®] SAF (gel-creme) e outra de Polawax[®] (creme). Ainda Fonseca (2007) avaliando 3 formulações diferentes desenvolvidas (F01-Hostacerin SAF[®], F02-Polawax[®], F03-Natrosol 250 HHR[®]) contendo própolis a 2,5 %, observou após o teste de centrifugação que F01 e F02 não apresentaram

separação de fases, salientando a estabilidade de emulsões a base de Polawax® e compatibilidade com os extratos de própolis.

O estresse térmico também visa acelerar interações físico-químicas entre as matérias-primas, com formação ou destruição de compostos através do aumento de temperatura num reduzido espaço de tempo (PROENÇA et al., 2006). Visto que nenhuma das amostras submetidas ao estresse térmico sofreu alterações nos parâmetros físico-químicos avaliados, procederam-se os demais ensaios.

Nos testes de estabilidade preliminar avaliou-se, juntamente com T0 já registrado, a ocorrência ou não de variações nas características organolépticas, pH, densidade e espalhabilidade durante os 15 dias do estudo. Com relação às características organolépticas, observaram-se pequenas alterações no decorrer do tempo, referentes à formulação controle (F2) e em duas emulsões teste (F3 e F5), como é verificado nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 - Avaliação das características organolépticas durante os 15 dias ensaios de estabilidade preliminar à temperatura de $50,0 \pm 2,0$ °C em estufa

	Tempo (dias)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
F1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
F2	N	N	N	N	N	N	LM	M	M						
F3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM	LM
F4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
F5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM	LM

N=Normal; LM=Levemente modificada; M=modificada; IM=Intensamente modificada.

Tabela 9 - Avaliação das características organolépticas durante os 15 dias de ensaios de estabilidade preliminar à temperatura de $-10,0 \pm 2,0$ °C em freezer.

	Tempo (dias)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
F1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
F2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
F3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
F4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
F5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N=Normal; LM=Levemente modificada; M=modificada; IM=Intensamente modificada.

Percebe-se que houve leve modificação no aspecto da emulsão controle (F2) na temperatura de $50,0$ °C em estufa a partir do 7º dia e nas formulações teste (F3 e F5) a partir do 13º dia, caracterizadas por modificação da consistência, que se tornou levemente mais opaca nestas três emulsões, o que pode ter ocorrido, possivelmente pela perda de água pela formulação devido à alta temperatura (ISAAC et al., 2008).

Segundo o Guia de Estabilidade de produtos cosméticos da ANVISA (BRASIL, 2004), o produto cosmético deve manter-se íntegro durante todo o período compreendido pelo teste, mantendo seu aspecto inicial em todas as condições, exceto em temperaturas elevadas, freezer ou ciclos, em que pequenas alterações são aceitáveis. Desta forma, as pequenas modificações observadas em F3 e F5 são toleradas e não caracterizam instabilidade.

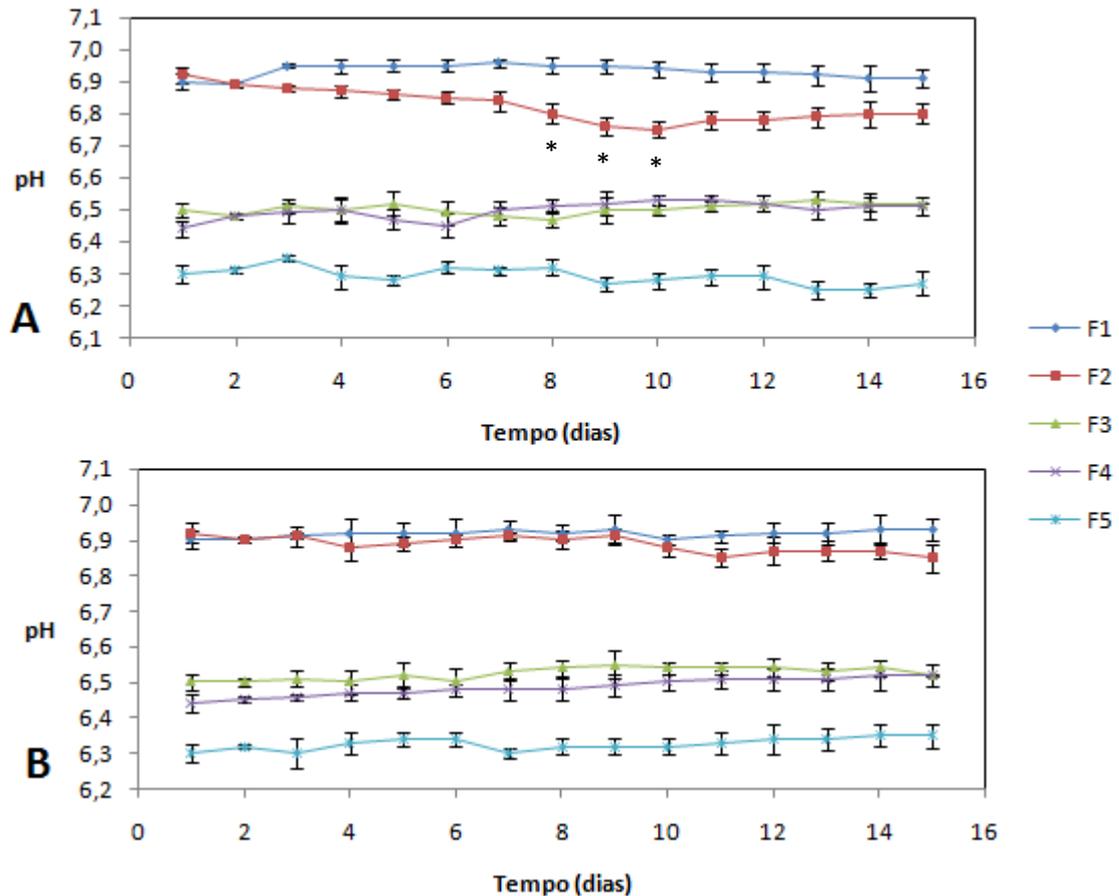
Em contrapartida, Souza (2016) avaliando a estabilidade de duas formulações acrescidas de extratos de própolis a 2,5 % e 5,0 % ($p\ p^{-1}$) em base de Silicone DC 5225[®] e Silicone DC 9011[®] constatou instabilidade em todas as condições avaliadas, exceto refrigeração, caracterizadas por separação de fases, quebra da emulsão e redução da viscosidade, indicando que a base utilizada não foi compatível com o extrato incorporado nas concentrações utilizadas.

De maneira semelhante ao presente estudo, Oliveira (2007) incorporou extrato de própolis a creme, gel e gel-creme em uma concentração de 2,5 % (m/v), sendo que no seu estudo houve escurecimento perceptível nestas três formulações, mais intenso em altas temperaturas (40,0 °C) logo após a primeira semana de preparação, o que não foi observado no presente estudo.

Com relação ao pH, os resultados obtidos no decorrer dos 15 dias de estudo de estabilidade preliminar podem ser observados na Figura 9. A avaliação de variação no pH serve como parâmetro para monitorar alterações na estrutura da formulação que nem sempre são perceptíveis visualmente, podendo indicar instabilidade entre os ingredientes da formulação, reações de hidrólise e oxidação, contaminação bacteriana, fatores que podem comprometer a eficácia e segurança do produto final. Também é importante a compatibilidade da formulação com o pH fisiológico da pele, evitando irritação, alergia ou sensação desagradável decorrentes da aplicação, o que se consegue com agentes acidificantes ou alcalinizantes, a fim de manter o pH em torno de 4,0 e 7,0 (OLIVEIRA, 2007; ZANON, 2010; SOUZA; CAMPOS; PACKER, 2013).

Observa-se que não houve alteração significativa no pH das formulações ($p > 0,05$) com o passar do tempo, somente F2 (sem conservantes) na temperatura de 50,0 °C apresentou variação significativa ($p < 0,05$) observada a partir do 8^o até o 10^o dia, que provavelmente está relacionada à alteração no aspecto que foi relatada anteriormente a partir do 7^o dia.

Figura 9 - Valores de pH das amostras armazenadas em temperatura de $50,0 \pm 2,0$ °C (A) e $-10,0 \pm 2,0$ °C (B) durante os 15 dias dos ensaios de estabilidade preliminar.



* Pontos em que houve diferença significativa ($p < 0,05$)

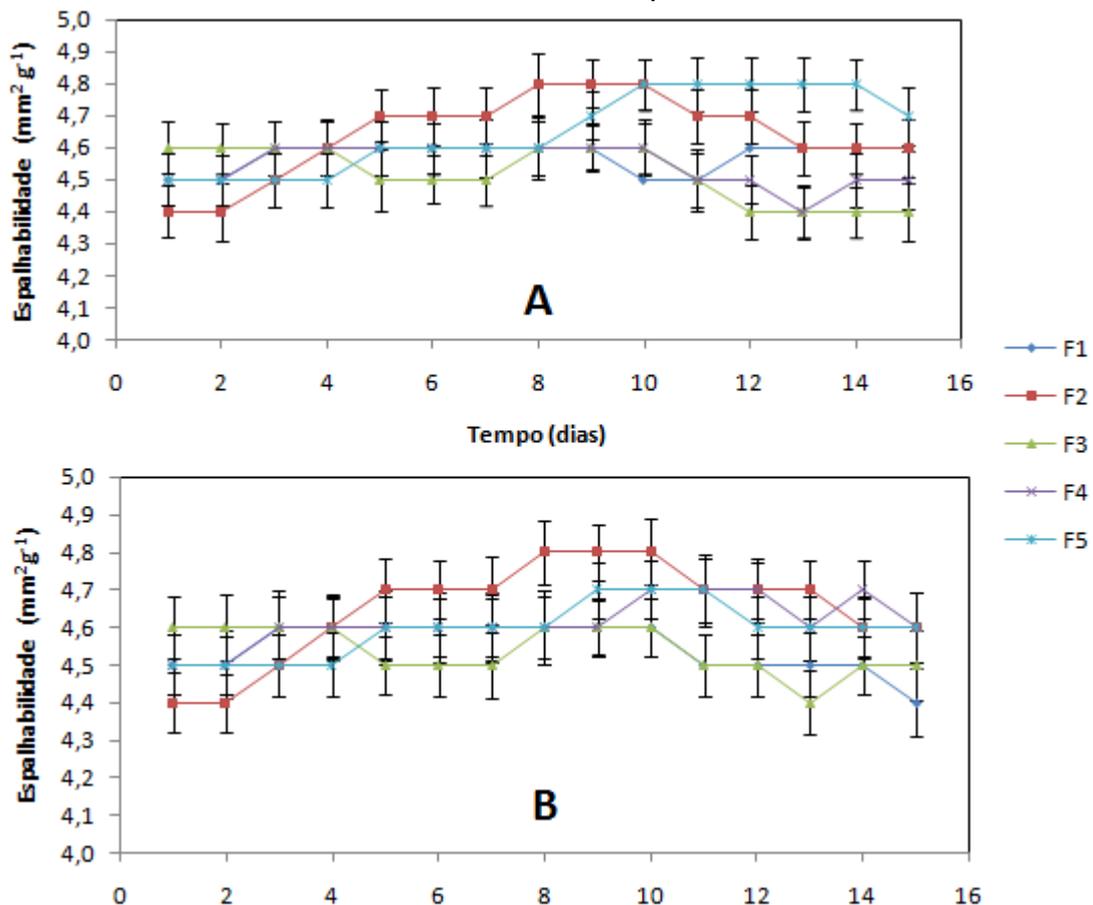
Oliveira (2007) também observou redução do pH ao incorporar extratos de própolis a quatro diferentes formulações e ao monitorar este parâmetro no decorrer dos dias, verificou também alterações significativas, caracterizadas por quedas bruscas em diferentes condições e períodos avaliados. De acordo com Friedrich et al. (2007) a diminuição nos valores de pH pode ser consequência de processo de degradação dos compostos graxos, pelas condições de aquecimento em função do tempo de exposição, na ausência de conservantes na formulação.

Outro parâmetro a ser analisado é a espalhabilidade, constituindo um bom indicador de estabilidade, uma vez que mudanças na consistência da emulsão podem ser detectadas. Os valores de espalhabilidade obtidos para as formulações em estudo em função do tempo (dias) nas diferentes condições de armazenamento foram plotados em gráficos e encontram-se representados na Figura 10.

No desenvolvimento de formulações semi-sólidas a determinação deste parâmetro é uma análise importante e tem por objetivo avaliar a expansão de uma

formulação sobre uma superfície após determinado período de tempo, o que pode interferir na sua aplicação (BUGNOTTO et al., 2006; SAVIAN et al., 2011). Com relação às variações deste parâmetro durante o período de ensaios, constatou-se que não houveram variações significativas ($p > 0,05$) para as cinco formulações avaliadas

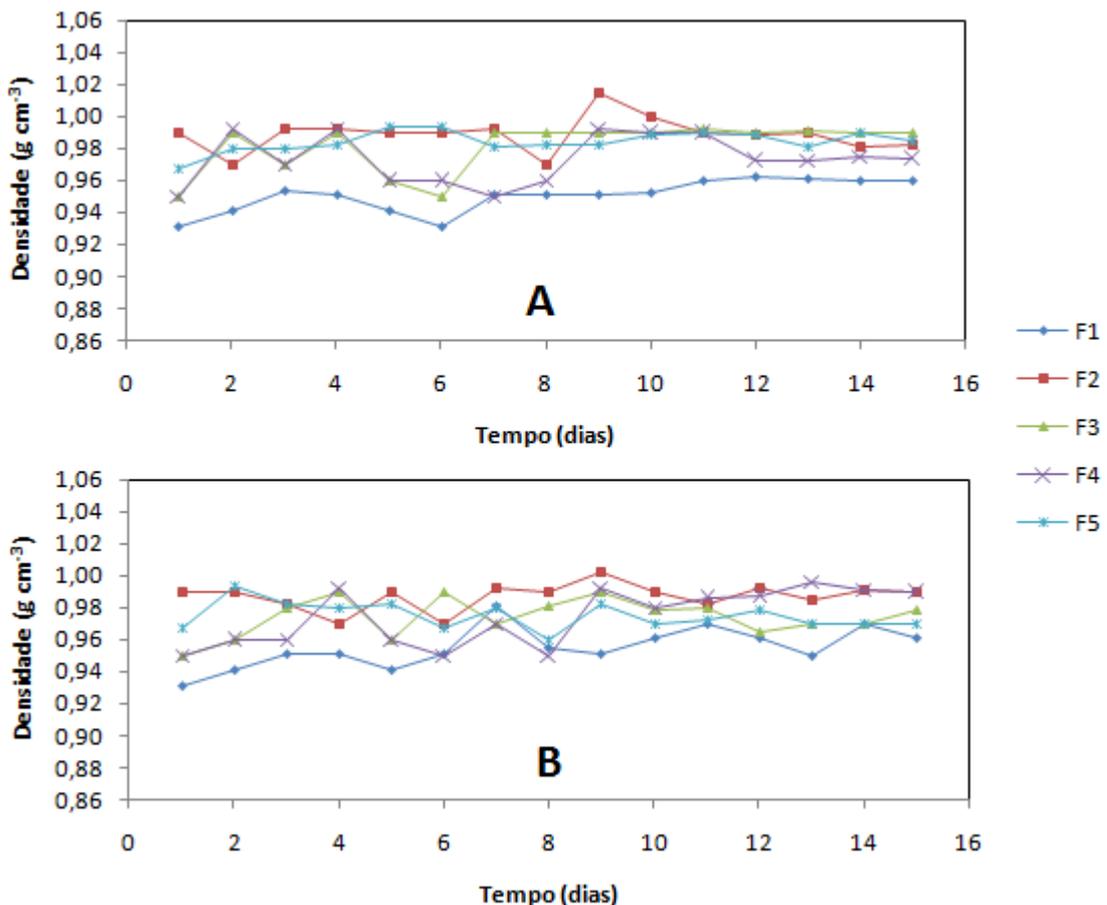
Figura 10 - Valores de espalhabilidade ($\text{mm}^2 \text{g}^{-1}$) das amostras armazenadas em temperatura de $50,0 \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$, (A) e $-10,0 \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$ (B) durante os 15 dias dos ensaios de estabilidade preliminar.



Savian e colaboradores (2011) desenvolveram e avaliaram a estabilidade de emulsões não-iônicas também a base de Polawax[®], contendo um ativo natural, o óleo de café verde. Com relação ao fator espalhabilidade, similarmente ao presente estudo, não se observaram alterações significativas no perfil da formulação durante o período de armazenamento, para as diferentes temperaturas empregadas, o que demonstra compatibilidade deste tipo de formulação não só com extratos de própolis, bem como com outros ativos naturais.

O último parâmetro analisado foi a densidade, sendo também um bom indicador de instabilidades na formulação (BRASIL, 2004). Com relação à variação deste parâmetro durante os 15 dias, os gráficos ilustrados na Figura 11 mostram os resultados, nos respectivos locais de exposição para as 5 formulações avaliadas. Verificaram-se pequenas oscilações no decorrer dos dias, porém não significativas ($p > 0,05$), sendo que de maneira geral todas as emulsões se mantiveram entre $0,93$ e $1,01 \text{ g cm}^{-3}$.

Figura 11 - Valores de densidade (g cm^{-3}) das amostras armazenadas em temperatura de $50,0 \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$ (A) e $-10,0 \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$ (B) durante os 15 dias dos ensaios de estabilidade preliminar.



Isaac et al. (2008) avaliou a estabilidade de fitocosméticos durante 15 dias, obtendo variações significativas na densidade pela exposição a altas temperaturas ($50,0 \text{ }^\circ\text{C}$) ocorrendo aumento deste parâmetro, não observado na outra condição de estresse ($-10,0 \text{ }^\circ\text{C}$). Isto é justificado a uma maior perda de água nas condições de temperaturas mais elevadas, que fez com que a densidade aumentasse.

Analisando os resultados obtidos nos testes de estabilidade preliminar, pode-se constatar que nenhuma das emulsões teste apresentou instabilidade, o que indica compatibilidade da fração de própolis com a base à qual foi incorporado, bem como estabilidade nas condições de avaliação extremas dos ensaios preliminares, permitindo, portanto dar início aos testes de estabilidade acelerada para avaliar a estabilidade em condições mais brandas e por um período mais longo, e desta forma prever o tempo de vida útil das formulações (BRASIL, 2004).

5.6. Testes de Estabilidade Acelerada

Nesta segunda etapa foram preparadas novas emulsões O/A não iônicas, a base de Polawax[®] adicionadas ou não de F-ACT de própolis. Logo após o preparo registrou-se os resultados para características organolépticas (aspecto, cor e odor), pH, densidade, espalhabilidade, índice de peróxidos e compostos fenólicos, tidos como tempo zero (T0), conforme verifica-se na Tabela 10. Da mesma forma que as emulsões preparadas no teste de estabilidade preliminar, aquelas acrescidas de extrato de própolis 0,2 e 2,0 % apresentaram mudanças na cor e odor proporcionais ao teor de extrato incorporado, características intrínsecas deste.

Tabela 10 - Parâmetros avaliados nas formulações controle com conservante e sem conservante (F1 e F2, respectivamente) e testes (F3, F4 e F5) logo após o preparo, considerado tempo zero (T0)

	Características organolépticas			pH	Densidade (g cm ⁻³)	CFT (mg EAG g ⁻¹)	IP (mEq kg ⁻¹)	Espalhab. (mm ² g ⁻¹)
	A	C	O					
F1	H	B	P	7,54 ± 0,01 ^a	0,90 ± 0,05 ^a	---	3,10 ± 0,30 ^a	3,67 ± 0,22 ^a
F2	H	B	P	7,48 ± 0,02 ^a	0,88 ± 0,03 ^a	---	3,40 ± 0,26 ^a	3,89 ± 0,26 ^a
F3	H	LA	CP	7,36 ± 0,02 ^b	0,89 ± 0,03 ^a	0,27 ± 0,06 ^a	3,60 ± 0,20 ^a	3,91 ± 0,25 ^a
F4	H	A	CP	7,26 ± 0,03 ^c	0,89 ± 0,04 ^a	1,34 ± 0,08 ^b	3,01 ± 0,27 ^a	3,67 ± 0,25 ^a
F5	H	A	CP	7,28 ± 0,02 ^c	0,90 ± 0,03 ^a	1,32 ± 0,09 ^b	3,51 ± 0,29 ^a	4,13 ± 0,24 ^a

CFT: Compostos fenólicos totais; IP: Índice de peróxidos.

A: Aspecto; C: cor; O: odor; ---: não detectado no método avaliado; H: Homogêneo; B: Branca; LA: Levemente amarela; A: Amarela; P: Padrão; CP: característico de própolis.

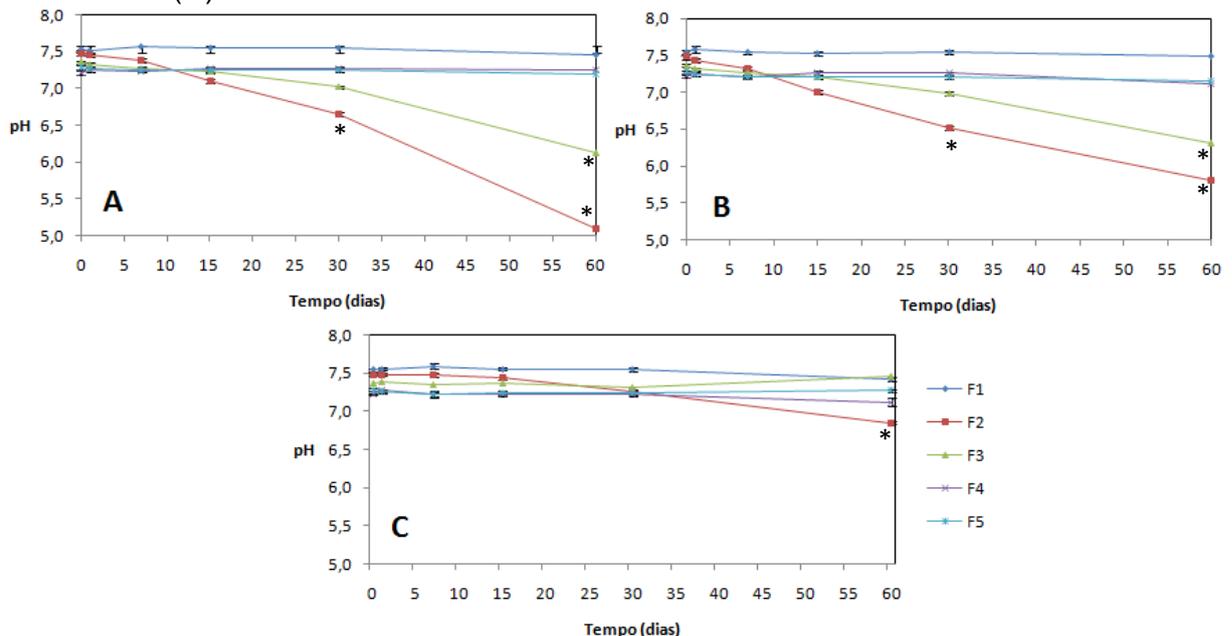
Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Com relação à densidade, espalhabilidade e índice de peróxidos (IP), não se constatou diferenças significativas entre as emulsões no tempo zero. Porém com relação aos compostos fenólicos totais (CFT), nas emulsões controle (F1 e F2) não ocorreu leitura para o teste, o que era esperado visto que não se adicionou F-ACT nestas formulações. Por outro lado, o pH de F3, F4 e F5 apresentou-se

significativamente menor ($p < 0,05$) que nos controles (F1 e F2), justificado pela adição de F-ACT de própolis que tem pH de 6,4, sendo esta redução mais acentuada nas emulsões acrescidas de 2,0 % da fração (F4 e F5) estatisticamente iguais entre si. Em contrapartida Bittencourt et al. (2014), ao incorporar 0,5 % de extrato de própolis vermelha em base Polawax[®], não deparou-se com alteração no pH e este foi de 6,1, inferior ao obtido neste estudo.

Obtidos os resultados para T0, que serviu de parâmetro para monitorar a ocorrência ou não de instabilidade durante o período compreendido pelo estudo, iniciou-se a avaliação das formulações nas três diferentes condições de exposição, sendo que os resultados do pH durante os 60 dias encontram-se representados na Figura 12.

Figura 12 - Variação no pH das formulações (F1, F2, F3, F4 e F5) armazenadas nas condições de $40,0 \pm 2,0$ °C (A), exposição à radiação ultravioleta (B) e $5,0 \pm 2,0$ °C (C) durante os 60 dias dos ensaios de estabilidade acelerada.



* Pontos em que houve diferença significativa ($p < 0,05$)

Verificou-se redução significativas de pH ($p < 0,05$) com o passar dos dias em todas as condições de exposição para F2 (controle sem conservantes), porém nas condições A e B (estufa a $40,0 \pm 2,0$ °C e exposição à radiação ultravioleta) estas alterações foram mais rápidas e mais bruscas com relação à condição C ($5,0 \pm 2,0$ °C). Contudo F3, incorporada com F-ACT a 0,2 % também apresentou variação

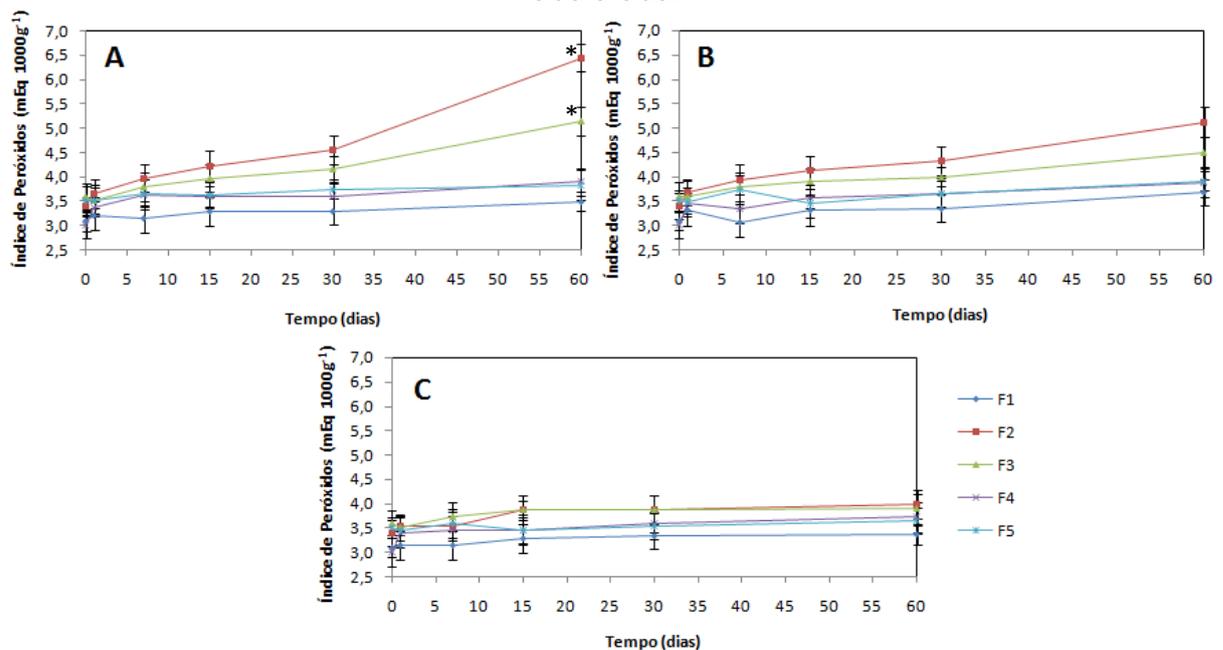
significativa no pH nas condições A e B, as quais não foram observadas em F4 e F5, contendo F-ACT a 2,0 %.

Bezerra e Gonçalves (2009) aplicando extratos de própolis de 0,25 a 0,75 % (p/p) em emulsão a base de Cetareth[®], também constatou redução do pH das formulações ao longo do tempo, mais pronunciada naquelas com maiores concentrações de extrato. Pode-se observar que em nenhuma das emulsões havia o teor de extrato contido em F4 e F5 (2,0 %) que se mantiveram estáveis, levando a presumir que concentrações muito baixas do extrato ou frações não são capazes de manter a estabilidade do produto.

Friederich et al. (2007) atribui estas variações no pH possivelmente ao processo de degradação hidrolítica dos compostos graxos, em consequência das condições de aquecimento em função do tempo de exposição e sugere que a utilização de um tampão possa ser necessária para a para evitar o processo de degradação da base proposta.

A variação dos resultados do Índice de Peróxidos (IP) no decorrer dos 60 dias pode ser observada na Figura 13.

Figura 13 - Variação no índice de peróxidos (mEq Kg^{-1}) das formulações (F1, F2, F3, F4 e F5) armazenadas nas condições de $40,0 \pm 2,0$ °C (A), exposição à radiação ultravioleta (B) e $5,0 \pm 2,0$ °C (C) durante os 60 dias dos ensaios de estabilidade acelerada.



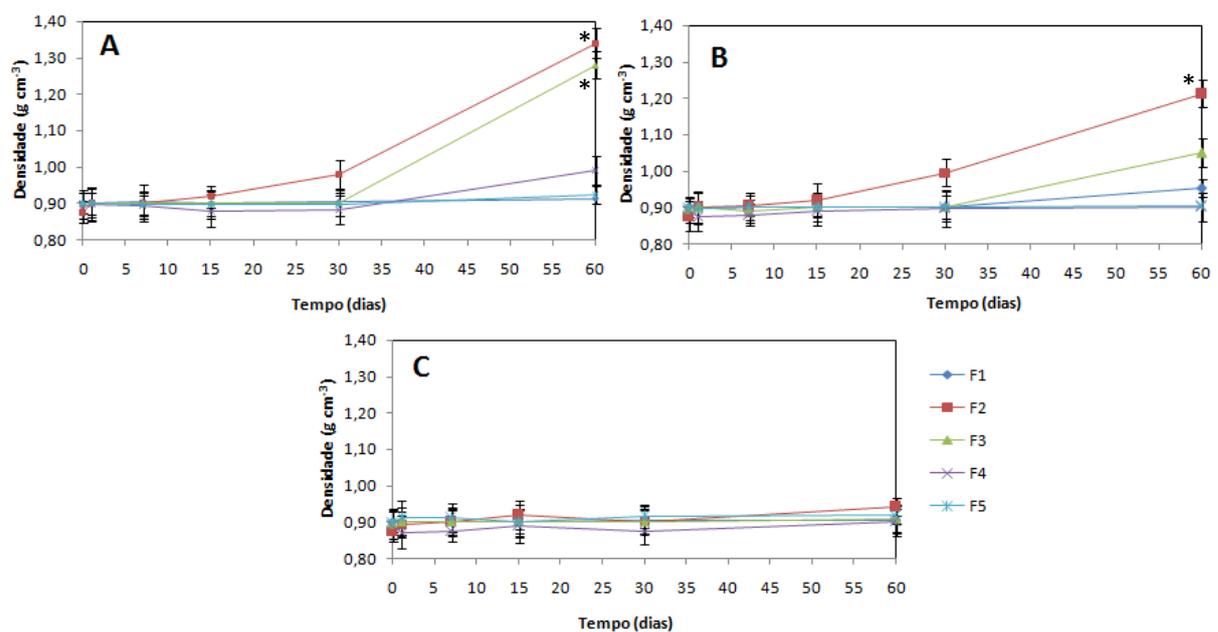
* Pontos em que houve diferença significativa ($p < 0,05$)

O IP é um método clássico e sensível na determinação de hidroperóxidos, produtos primários da oxidação. A presença destes compostos é um indício da deterioração das amostras que contém gorduras e trata-se de um indicador do estágio inicial de alterações oxidativas (MONTEIRO, 2014).

É possível verificar que houve diferença significativa ($p < 0,05$) somente em F2 (controle sem conservante) e em F3 (0,2 % de F-ACT) na condição A, evidenciada por aumento no IP ocorrido com maior intensidade a partir do 30º dia de exposição. Ainda, pode-se presumir que a F2 na condição B também estaria iniciando o processo de oxidação perceptível pelo testes, que poderia ter se intensificado após o 60º dia, caso os ensaios tivessem continuidade após este período. De acordo com Oliveira (2007) esta alteração observada em F2 e F3, juntamente com a diminuição do pH indicam possível oxidação dos componentes da formulação.

A densidade é outro importante parâmetro que deve ser monitorado durante os testes de estabilidade de emulsões (BRASIL, 2004). Os resultados de densidade dos sistemas emulsionados nas diferentes condições de armazenamento encontram-se na Figura 14.

Figura 14 - Variação nos valores de densidade (g cm^{-3}) das formulações (F1, F2, F3, F4 e F5) armazenadas nas condições de $40,0 \pm 2,0$ °C (A), exposição à radiação ultravioleta (B) e $5,0 \pm 2,0$ °C (C) durante os 60 dias dos ensaios de estabilidade acelerada.



* Pontos em que houve diferença significativa ($p < 0,05$)

Os processos de cremeação e sedimentação são resultados da diferença de densidade entre as fases, sendo a cremeação mais comum devido ao fato de que o óleo geralmente é menos denso que a fase aquosa. Após coalescer, a separação gravitacional das gotas maiores formadas advém do aumento da diferença de densidade entre as fases contínua e dispersa (ALMEIDA, 2014).

Detectaram-se variações significativas ($p < 0,05$) para a densidade de F2 (controle sem conservante) nas condições A e B e F3 (F-ACT 0,2 %) na condição A, o que foi também relacionado com alterações nos parâmetros organolépticos destas formulações. Balogh (2007) avaliou emulsões O/A com diferentes extratos naturais, e aquela contendo 10,0 % de extrato de própolis apresentou densidade absoluta constante durante todo o estudo de estabilidade e em todas as condições de exposição, corroborando com o presente estudo.

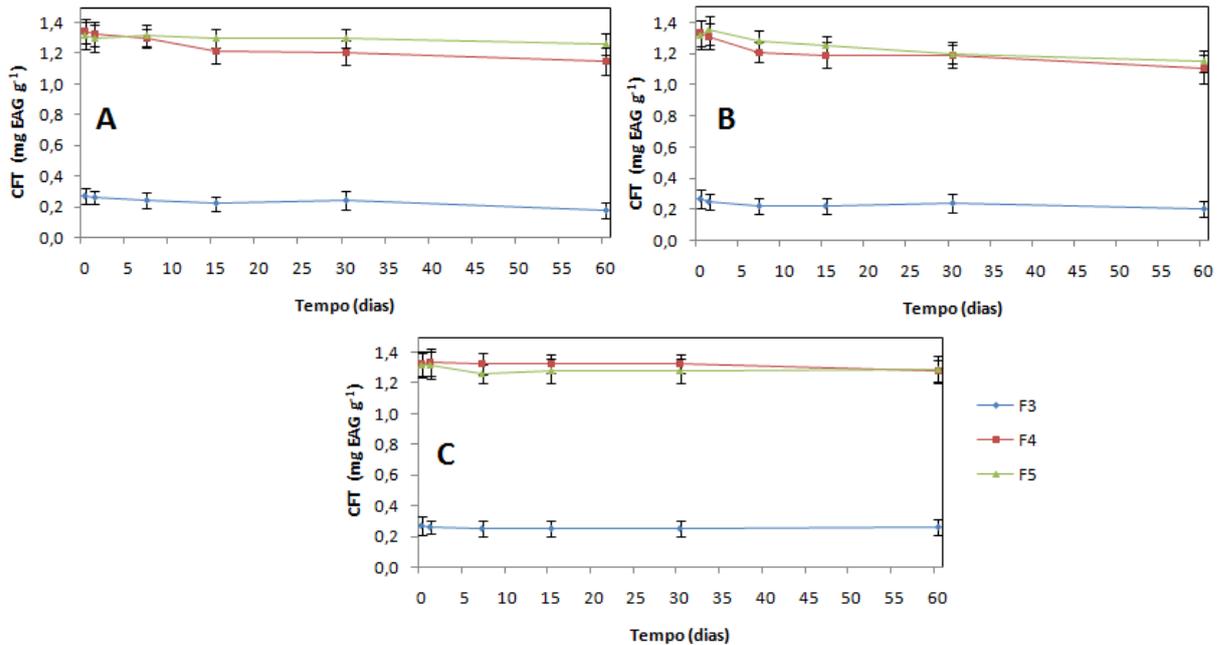
O Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA (BRASIL, 2004), recomenda que, quando se julgar necessário, diferentes técnicas analíticas podem ser utilizadas na determinação quantitativa dos componentes da formulação. Optou-se neste caso por monitorar os CFT a fim de verificar a ocorrência ou não de degradação destes compostos durante o período de exposição, visto que a eles são atribuídas às atividades que estão sendo avaliadas no presente estudo (antioxidante e antimicrobiana) (FUNARI; FERRO, 2006; MELLO, 2013). Estes resultados podem ser visualizados na Figura 15.

Lange, Heberlé e Milão (2009), após 15 dias de avaliação da estabilidade acelerada de formulações preparadas com 2,0 % de outro ativo natural, o resveratrol (polifenol), observou nítida separação de fases, indicando instabilidade deste composto quando submetido ao calor. Porém no presente estudo não houve variações significativas ($p > 0,05$) nos CFT durante os 60 dias de estabilidade acelerada, portanto se atribui as alterações observadas em F3 a uma concentração inicial baixa de F-ACT e não a degradação dos compostos presentes nesta na emulsão.

Oliveira (2007) demonstra em seu estudo de estabilidade acelerada em formulações contendo extrato glicólico e alcoólico de própolis 2,5 %, que nas formulações a base de Polawax[®] armazenadas a $40,0 \pm 2,0$ °C e UR $70,0 \% \pm 2,0$ % a atividade antioxidante foi mantida em torno de 70,0 % após 360 dias. Correlacionando-se ao presente estudo, as emulsões F4 e F5 possuem teor

semelhante de extrato e se mantiveram estáveis com relação aos compostos fenólicos durante os 60 dias de análise.

Figura 15 - Variação nos compostos fenólicos totais (CFT) (mg EAG g^{-1}) das formulações (F1, F2, F3, F4 e F5) armazenadas nas condições de $40,0 \pm 2,0$ °C (A), exposição à radiação ultravioleta (B) e $5,0 \pm 2,0$ °C (C) durante os 60 dias dos ensaios de estabilidade acelerada.



Os parâmetros organolépticos monitorados nas formulações durante os 60 dias de estabilidade acelerada demonstraram que houveram modificações em F2 e F3, em diferentes tempos, na condição de exposição em temperatura de 40 °C $\pm 2,0$ °C na estufa e/ou em exposição à radiação UV, conforme pode ser verificado na Tabela 11.

Tabela 11 - Avaliação das características organolépticas durante os 60 dias dos testes de estabilidade acelerada à temperatura de $40,0 \pm 2,0$ °C em estufa (condição A), exposição à radiação ultravioleta (condição B) e temperatura de $5,0 \pm 2,0$ °C em refrigerador (condição C).

	Tempo decorrido entre as análises																	
	T0		24 horas			7 dias			15 dias			30 dias			60 dias			
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
F1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
F2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM	N	M	M	LM	IM	M	LM
F3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	N	N	M	N	N
F4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
F5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N: Normal; LM: Levemente modificada; M: Modificada; IM: Intensamente modificada.

A: Estufa a $40,0 \pm 2,0$ °C; B: Radiação UV; C: Refrigerador a $5,0 \pm 2,0$ °C.

Verificou-se a partir do 15^o dia alterações no aspecto de F2 nas condições A e B, que se intensificou no 30^o e ainda mais no 60^o dia. Esta instabilidade era esperada visto que não foi adicionado nenhum tipo de conservante ou F-ACT de própolis nesta emulsão. Contudo, F3 também apresentou modificações leves no aspecto a partir do 30^o dia, em alta temperatura, que também se intensificou em 60 dias. Esta alteração, juntamente com a diminuição do pH e elevação no IP indicam possível oxidação que pode ser tanto dos componentes da formulação quanto da própria fração de extrato (OLIVEIRA, 2007). Observou-se ainda que a concentração de F-ACT incorporada na formulação influenciou na estabilidade, uma vez que F3 (com antioxidante e 0,2 % de F-ACT) mostrou aspecto alterado quando comparado com F5 que possui apenas na F-ACT concentração de 2,0 %.

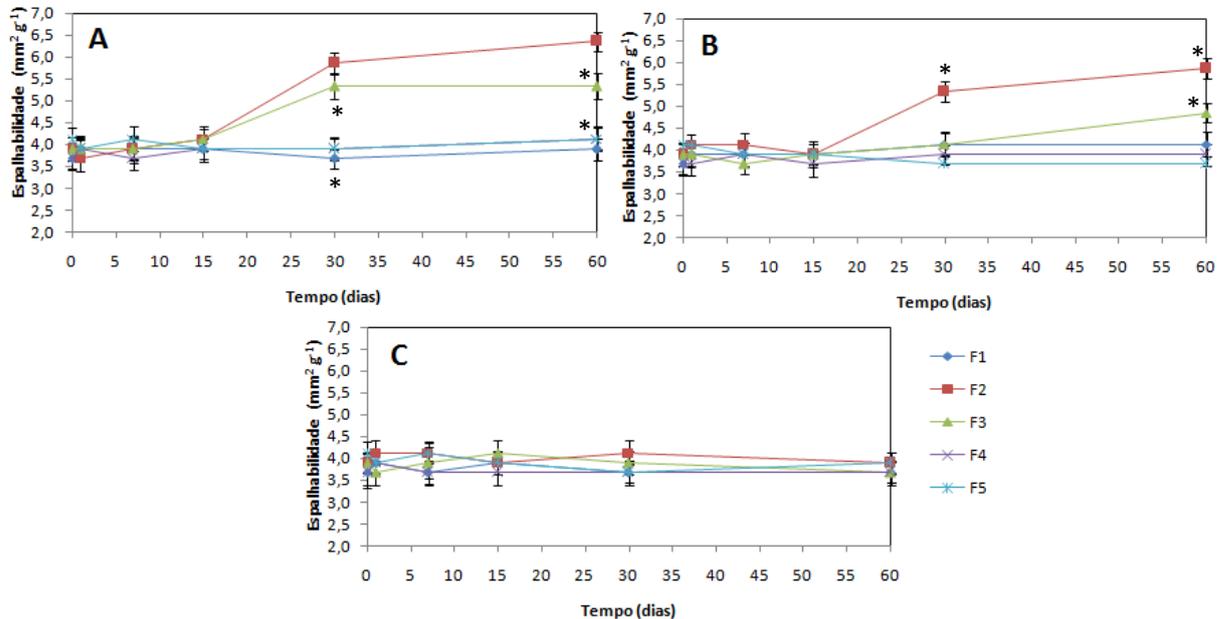
Bezerra e Gonçalves (2009) aplicando extratos de própolis a 0,25, 0,50 e 0,75% (p/p) em emulsão a base de Cetareth[®], observou escurecimento gradual nas formulações armazenadas em altas temperaturas em três semanas de estudo. Da mesma forma que Fonseca (2007), em formulações contendo 2,5 % de extrato de própolis verde em base Hostacerin SAF[®] também verificou a mesma alteração. Porém no presente estudo somente observou-se mudanças no aspecto, sem qualquer alteração na coloração ou odor das formulações.

A espalhabilidade também é utilizada para avaliar estabilidade, uma vez que mudanças na consistência da emulsão podem ser detectadas. Os valores obtidos para as 5 formulações em função do tempo (dias) nas diferentes condições de armazenamento encontram-se representados na Figura 16.

É possível avaliar que houve diferença significativa ($p < 0,05$) somente em F2 (controle sem conservante) e F3 (0,2 % de F-ACT) nas condições A e B, evidenciada por aumento ocorrido com maior intensidade a partir do 15^o dia de exposição, condizente com as modificações no aspecto também observadas nestas emulsões.

Milan et al. (2007) ao avaliar a estabilidade de duas emulsões cosméticas não-iônicas durante o período de 6 meses, além de obter valores semelhantes aos do presente estudo, variando entre 3,97 e 4,99 mm² g⁻¹, também verificou diferenças significativas ($p < 0,05$) após o período de exposição em temperatura ambiente. Ainda ressalta que a aceitação do produto pelo consumidor é dada, além de fatores como aparência e oleosidade residual após a aplicação, pela espalhabilidade adequada.

Figura 16 - Variação na espalhabilidade ($\text{mm}^2 \text{g}^{-1}$) das formulações (F1, F2, F3, F4 e F5) armazenadas nas condições de $40,0 \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$ (A), exposição à radiação ultravioleta (B) e $5,0 \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$ (C) durante os 60 dias dos ensaios de estabilidade acelerada.



* Pontos em que houve diferença significativa ($p < 0,05$)

Com relação à avaliação microbiológica qualitativa realizada após 60 dias de exposição, pode-se verificar que somente houve crescimento, tanto de fungos como bactérias, em F2 (controle), o que se verifica na Tabela 12.

Tabela 12 - Avaliação microbiológica qualitativa das formulações (F1, F2, F3, F4 e F5) após 60 dias de exposição à temperatura de $40,0 \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$ em estufa (condição 1), exposição à radiação ultravioleta (condição 2) e temperatura de $5,0 \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$ em refrigerador (condição 3).

	F1			F2			F3			F4			F5		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Bactérias	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Fungos	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

P: Presença de crescimento; A: Ausência de crescimento.

Diante destes resultados, pode-se prever que as alterações físico-químicas observadas na formulação F2 em condição de armazenamento na estufa a $40,0 \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$ possivelmente tenham sido desencadeadas por contaminação microbiana, enquanto na condição de exposição à luz ultravioleta por outros processos de degradação. Porém F3 não apresentou crescimento microbiano, o que indica que a instabilidade decorreu em consequência de outros processos, possivelmente oxidativos.

Pode-se observar que a formulação sem conservantes e sem a incorporação da F-ACT possibilitou o crescimento microbiano. O fato de não terem sido observadas contagens microbianas nas demais formulações ao final do período está relacionada à presença de conservantes antimicrobianos e pela presença de F-ACT. Os compostos fenólicos presentes nas emulsões, em concentrações mantidas desde o tempo inicial sem alterações significativas, provavelmente foram efetivos em evitar a proliferação destes contaminantes. Ainda podem-se relacionar estes resultados àqueles obtidos na curva de morte microbiana, onde para todos os microrganismos testados foram observados efeitos microbicidas ou microbiostáticos pela exposição dos microrganismos ao longo do tempo à F-ACT de própolis na CIM. Esta CIM foi utilizada como referência para a determinação da concentração da fração a ser utilizada como agente antimicrobiano na formulação.

De maneira geral, pode-se presumir que o aumento da concentração de F-ACT como agente antioxidante poderia ser uma alternativa para melhorar a estabilidade da formulação e proteger os componentes da oxidação, visto que nas emulsões acrescidas de 2,0 % de F-ACT, independente da presença ou ausência de outros conservantes, não houveram alterações nos parâmetros durante o período de testes.

Outros estudos em que se utilizou Polawax[®] como base-autoemulsionante para o preparo de formulações tópicas contendo quercetina (flavonoide) (CASAGRANDE et al., 2006) e extrato de própolis verde (FONSECA, 2007) também demonstraram estabilidade, em temperaturas até mais altas que as aplicadas neste estudo ($45,0 \pm 2,0$ °C), sugerindo, somado aos resultados aqui obtidos, que esta base auto-emulsionante é muito promissora para veiculação de ativos naturais, e que estes podem efetivamente manter sua estabilidade nas concentrações adequadas.

6. CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos para compostos bioativos (CFT e FLA) e atividade antioxidante, observou-se que a F-ACT apresentou resultados superiores com relação às demais frações e ao EBE, verificando-se ainda que com o aumento do teor de compostos também ocorreu incremento na atividade antioxidante, o que significa que estão correlacionados.

Nos testes de atividade antimicrobiana concluiu-se que a F-ACT apresentou CIM menores em comparação às demais frações e ao EBE, porém pouco expressivos quando confrontados com outros estudos com própolis no meio científico. Pela avaliação da curva de morte microbiana, observou-se que a exposição de todos os microrganismos à F-ACT por até 24 horas foi capaz de inibir o crescimento microbiano, com efeito microbicida ou microbiostático, verificando-se que o aumento do efeito antimicrobiano é dependente da concentração de fração utilizada.

Ao analisar o EBE e frações por CLAE-DAD foi possível a identificação de quatro compostos no EBE e F-ACT, sendo estes os ácidos fenólicos *p*-cumárico e cafeico e os flavonoides pinocembrina e crisina. Na F-HEX identificou-se apenas o ácido *p*-cumárico e a crisina. Ainda se observou aumento da concentração dos compostos identificados no EBE após o fracionamento com acetato de etila. Confirmou-se, portanto, os resultados iniciais obtidos por métodos espectrofotométricos, com maior teor de compostos identificados na F-ACT.

Após aplicação da F-ACT em emulsões cosméticas, os ensaios de estabilidade preliminar mostraram que a fração incorporada às bases emulsionadas não alterou a estabilidade, pois não houveram mudanças significativas no pH, densidade ou espalhabilidade no decorrer dos 15 dias, modificando apenas os parâmetros organolépticos desde o T0, o que se deve às características de cor e odor intrínsecas do extrato.

Nos ensaios de estabilidade acelerada, pode-se concluir que a formulação acrescida de 0,2 % de F-ACT (F3) não apresentou boa estabilidade em altas temperaturas, porém na concentração de 2,0 % não se observaram alterações, tanto físico-químicas como microbiológicas, mantendo-se estáveis, sem variações significativas, todos os parâmetros avaliados durante o período de testes.

Diante destes resultados, ressalta-se que o presente estudo mostra-se promissor, pois os dados gerados contribuíram para criar novas perspectivas e direcionar futuros estudos no intuito de se obter uma formulação otimizada no seu poder conservante, bem como prever com exatidão a vida útil destes produtos.

7. REFERÊNCIAS

- ADELMANN, J. **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante**. 2005. 167 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8 ed., São Paulo: Artmed, 2007. 775 p.
- ALMEIDA, M.L. **Estabilidade de emulsões de água-em-óleo na presença de campo elétrico externo**. 2014. 90 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.
- ANDRADE JUNIOR, D.; R. de; SOUZA, R. B. de; SANTOS, S. A.; ANDRADE, D. R. de. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, n. 1, p. 60-68, 2005.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ANTONIO, M.E.C.O. **Permeação cutânea *in vitro* como ferramenta auxiliar para o estudo de formulações semi-sólidas de Cetoconazol para aplicações tópicas**. 2007. 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- ASSIMOS, A.A. **Avaliação da Concentração e dos Tipos de Flavonoides na Própolis Utilizando Métodos Quimiométricos de Classificação e Calibração**. 2014. 100 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.
- BALOGH, T.S. **Uso cosmético de extratos glicólicos: avaliação da atividade antioxidante, estudo da estabilidade e potencial fotoprotetor**. 2011. 244 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011..
- BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p.3-15, 2000.
- BAPTISTA, L.B.M. **Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos fitoterápicos produzidos na pastoral de saúde de Venda Nova do Imigrante – ES**. 2012. 95 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2012.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; PAULA, S.O.; MININ, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARREIROS, A.L.B.S; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARROS, M.P.; SOUSA, J.P.B.; BASTOS, J.K.; ANDRADE, S.F. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.567–571, 2007.

BEZERRA, A.C.A.; GONÇALVES, G.M.S.; Desenvolvimento e estudos de estabilidade de formulações cosméticas contendo própolis destinadas à prevenção da acne. In: XIV Encontro de Iniciação Científica da PUC - Campinas. **Anais**. Campinas: PUC, 2009.

BISPO JR, W.; MIRANDA, E.O.; ALVINO, V.; ARAUJO, B. SILVA, D.W.; PORFIRIO, Z. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina**, v. 33, n. 1, p. 03-10, 2012

BITTENCOURT, F.O.; PADILHA, F.F.; SIQUEIRA, A.L.; DANTAS, C.G.; MENDONÇA, L.S.; ARAUJO, Y.L.F.; ARAUJO, E.D. CARDOSO, J.C. Avaliação da atividade antifúngica de formulações semisólidas contendo extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Scientia Plena**, v. 10, n. 10, p. 1-11, 2014.

BONHEVI, J.S.; GUTIERREZ, A.L. Antioxidant Activity and Total Phenolics of Propolis from the Basque Country (Northeastern Spain). **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, p. 11387–1395, 2011.

BORGHETTI, G.S.; KNORST, M.T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 4, p. 531-537, 2006.

BOROSKI, M.; **Proteção lipídica de matrizes alimentícias expostas a condições de estresses oxidativo na presença de antioxidantes naturais**. 2011. 127f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.

BOROSKI, M.; VISENTAINER, J.V.; COTTICA, S.M.; MORAIS, D.R. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**. 1 ed. Curitiba: Appris, 2015. 141 p.

BOSIO, K.; AVANZINI, C.; D'AVOLIO, A.; OZINO, O.; SAVOIA, D. *In vitro* activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, p. 174-177, 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Gerência Geral de cosméticos. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. Brasília: ANVISA, 2007. 130 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos/Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 1.ed., Brasília: ANVISA, 2004.52 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 3 – ANEXO VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 2001.

BUGNOTTO, C.; SOARES, G.; LAPORTA, L.V.; ALVES, M.P.; SCHMIDT, C.A.; LIMBERGER, J.B. Estudo de estabilidade de formulação tópica contendo própolis. **Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da Saúde**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2006.

BÚFALO, M.C.; FIGUEIREDO, A.S.; SOUSA, J.P.B.; CANDEIAS, J.M.G.; BASTOS, J.K.; SFORCIN, J.M.; Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology** v.107, p.1669–1680, 2009.

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.

CONTE, F.L. **Ação imunomoduladora da própolis na apresentação antigênica**. 2017. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu, 2017.

BURATTI, S.; BENEDETTI, S.; COSIO, M.S. Evaluation of the antioxidant power of honey, própolis and royal jelly by amperometric flow injection analysis. **Talanta**, v. 71, p. 1387-1392, 2007.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.; VERRI, W.A.; JABOR, J.R.; SANTOS, A.C.; FONSECA, M.J.V. Evaluation of Functional Stability of Quercetin as a Raw Material and in Different Topical Formulations by its Antilipoperoxidative Activity. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 1, p. E1-E8, 2006

CASTRO, M.L.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, M.; KOO, Y. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512-1516, 2007

CHORILLI, M.; LEONARDI, G.R.; SALGADO, H.R.N. Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 3, p. 113-118, 2007.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bactéria That Grow Aerobically; Approved Standard- Eighth Edition. **Wayne: CLSI document M07-A8**, 2009.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Second Edition. **Wayne: CLSI document M27-A2**, 2002.

COELHO, J.P.M. **Identificação e quantificação de compostos fenólicos em própolis da região sul do Brasil. Avaliação da atividade antioxidante por**

técnicas espectroscópicas e eletroquímicas. 2013. 57 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia e Química de Produtos Naturais) – Instituto Politécnico de Bragança e Universidade de Salamanca, Bragança, 2013.

COTTICA, S. M. **Caracterização química de extratos de própolis e sua ação em leite e bebida láctea: avaliação antioxidante, oxidação lipídica e quantificação em ácidos graxos.** 2013. 122 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2013.

COTTICA, S.M.; SAWAYA, A.C.H.F.; EBERLIN, M.N.; FRANCO, S.L.; ZEOULAE, L.M.; VISENTAINER, J.V. Antioxidant activity and composition of Propolis obtained by different methods of extraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 5, p. 929-935, 2011.

DAL'BELO, S.E. **Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de chá verde e *Ginkgobiloba*.** 2008. 176f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2008.

DELMONDES, P.H.; FREIRE, J.M.; SHAEFER, A.S.; AMARAL, G.A.; SILVA, M.A. Substâncias antioxidantes presentes nos vegetais. **Interdisciplinar: Revista Eletrônica da Univar**, v. 1, n. 9, p. 1-5, 2013.

DEL PRADO, C.C.N.; STEFANUTTO, J.C.; STEVANATO, J.O.; GONÇALVES, J.E.; YAMAGUCHI, M.U.; FRANCO, S.L. Análise química da própolis de diferentes regiões do Paraná e formulações de própolis para ser usados com enxaguantes bucais. In: VIII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar. **Anais Eletrônico.** Maringá: UNICESUMAR, 2013.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH'. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

FALCÃO, S.I.; VALE, N.; COS, P.; GOMES, P.; FREIRE, C.; MAES, L.; VILAS-BOAS, M. In Vitro Evaluation of Portuguese Propolis and Floral Sources for Antiprotozoal, Antibacterial and Antifungal Activity. **Phytotherapy research**, v.28, p.437-443, 2014.

FERNANDES JUNIOR, 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.

FLOEGEL, A.; KIM, D.O.; CHUNG, S.J.; KOO, S.I.; CHUN, O.K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 1043–1048, 2011.

FONSECA, Y.M.; **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato de própolis verde: estudos de estabilidade, liberação, permeação e retenção**

cutânea. 2007. 169f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2007.

FRANGE, R.C.C; GARCIA, M.T.J. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 263-271, 2009.

FREIRE, I.C.M.; GOUVEIA, C.L.; FIGUEIREDO, R.D. A.; LEITE, M.L.A.S.; CAVALCANTI, Y.W.; ALMEIDA, L.F.D.; PADILHA, W.W.N. Atividade Antifúngica do Óleo Essencial de *Rosmarinus officinalis* Sobre a Cinética do Crescimento de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 16, n. 3, p. 343-346, 2012.

FREIRES, I.A.; QUEIROZ, V.C.P.P.; FURLETTI, V.F.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; DUARTE, M.C.T.; ROSALEN, P.L. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 26, p. 122-132, 2016.

FREITAS, S.F.; SHINOHARA, L.; SFORCIN, J.M.; GUIMARAES, S. In vitro effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. **Phytomedicine**, v. 13, n. 3, p. 170-175, 2006.

FRIEDRICH, M.; PRIMO, F.T.; FUNCK, J.A.; LAPORTA, L.V.; ALVES, M.P.; BITTENCOURT, C.F.; ESCARRONE, A.L. Avaliação da Estabilidade Físico-Química de Creme Não Iônico Inscrito no Formulário Nacional. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 4, p. 558-562, 2007.

FROZZA, C.O.S. **Avaliação dos efeitos antitumorais da própolis vermelha em células humanas *in vitro*.** 2016. 125f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2016.

FUJIMOTO, G. **Própolis verde: caracterização, potencial de atividade antimicrobiana e efeitos sobre biofilmes de *Enterococcus*spp.** 2016. 121 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

FUNARI, C.S; FERRO, V.O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 171-178, 2006.

GUTIERREZ-GONÇALVES, M. E. J.; MARCUCCI, M. C. Atividades Antimicrobiana e Antioxidante da Própolis do Estado do Ceará. **Revista Fitos**, v. 4, n. 1, p. 81-86, 2009.

HAYACIBARA, M.F.; ROSALEN, P.L.; DUARTE, S.; FRANCO, E.M.; BOWENB, W.H.; IKEGAKI, M.; CURY, J.A. In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101 p. 110–115, 2005.

HERRERA, Y.F. **Atividade citotóxica de amostras de própolis brasileira e cubana contra células tumorais humanas**. 2016. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina, Botucatu, 2016.

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

IHA, S.; MIGLIATO, F.; VELLOSA, J.C.R.; SACRAMENTO, L.V.S.; PIETRO, R.C.L.R.; ISAAC, V.L.B.; BRUNETTI, I.L.; CORREA, M.A. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocósmética. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

ISAAC, V.L.B.; CEFALI, L.C.; CHIARI, B.G.; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO, H.R.N.; CORRÊA, M.A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocósméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada** v. 29, n. 1, p. 81-96, 2008,

JUIZ, P.J.L.; ALVES, R.J.C.; BARROS, T.F. Uso de produtos naturais como coadjuvante no tratamento da doença periodontal. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 134-139, 2010.

LACERDA, R.C.C. **Avaliação da composição química e atividade antioxidante da própolis orgânica de *Apis mellifera* visando à preservação ambiental do ecossistema envolvido**. 2012. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. 2 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. 1517 p.

LANGE, M.K.; HEBERLE, G.; MILAO, D. Avaliação da estabilidade e atividade antioxidante de uma emulsão base não-iônica contendo resveratrol. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, p. 145-151, 2009.

LEITE, A. M. **Avaliação da atividade biológica de óleos essenciais sobre espécies bacterianas potencialmente causadoras de endocardite infecciosa**. 2007. 113f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

LOPEZ, B.G.C.; DE LOURENÇO, C.C.; ALVES, D.A.; MACHADO, D.; LANCELOTTI, M.; SAWAYA, A.C.H.F. Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: an alert for its safe use. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, p. 677-687, 2015.

LUSTOSA, S.; 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.

MARCUCCI, M.C. Própolis Tipificada: Um Novo Caminho para a Elaboração de Medicamentos de Origem Natural, Contendo este Produto Apícola. **Revista Fitos**, v. 1, n. 3, p. 36-46, 2006

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

MARIOTTI, D.; FRASSON, A.P.Z. Avaliação da estabilidade e atividade antioxidante de formulações cosméticas contendo extrato etanólico dos frutos de *Fragaria vesca* L. (morango). **Infarma**, v. 23, n. 3/4, 2011.

MELLO, B.C.B.S. **Extração de própolis em meio aquoso e concentração dos extratos por nanofiltração**. 2013. 183 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2013.

MELLO, B.C.B.S.; HUBINGER, M.D Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian Green própolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different pH values. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 2510–2518, 2012.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 405-411, 2005.

MIGUEL, M.G.; NUNES, S.; DANDLEN, S.A.; CAVACO, A.M.; ANTUNES, M.D. Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of Própolis (*Apis mellifera* L.) from Algarve, South Portugal. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 1, p. 16-23, 2014.

MILAN, A.L.K.; MILAO, D.; SOUTO, A.A. CORTE, T.W.F. Estudo da hidratação da pele por emulsões cosméticas para xerose e sua estabilidade por reologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 649-657, 2007.

MIORIN, P.L.; LEVY JUNIOR, N.C.; CUSTODIO, A.R.; BRETZ, W.A. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 913–920, 2003.

MONTEIRO, J.C.B. **Avaliação das propriedades reológicas das emulsões (margarinas e cremes vegetais) para caracterização do seu risco**. 2014. 65 f. Dissertação (Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar) – Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco, Castelo Branco, 2014.

MORAIS, G.G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidos de xantina para tratamento da hidrolipodistrofiaginóide (celulite)**. 2006. 158 f Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

NEUENFELDT, P.D. **Planejamento, síntese e avaliação biológica de derivados pirazolínicos e bis-chalconas simétricas: estudos de correlação estrutura/atividade.** 2015. 345 f. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemática, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

NIE, P.; XIA, Z.; SUN, D.; HE, Y. Application of Visible and Near Infrared Spectroscopy for Rapid Analysis of Chrysin and Galangin in Chinese Propolis. **Sensors**, v. 13, p.10540-10549, 2013.

NUNES, L.C.C.; GALINDO, A.B.; DEUS, A.S.O.; RUFINO, D.A.; RANDAU, K.P.; XAVIER, H.S.; CITÓ, A.M.G.L.; ROLIM NETO, P.J. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artermia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 524-529, 2009.

OLIVEIRA, S.C.; ANDOLFATTO, S. **Otimização do processo de extração de compostos bioativos da própolis produzida por abelhas geneticamente modificadas.** 2014. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2014.

OLIVEIRA, K. A. M.; OLIVEIRA, G. V.; BATALINI, C.; ROSALEM, J. A.; RIBEIRO, L. S. Atividade antimicrobiana e quantificação de flavonoides e fenóis totais em diferentes extratos de própolis. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina**, v. 33, n. 2, p. 211-222, 2012.

OLIVEIRA, F.M. **Desenvolvimento de formulações tópicas fotoquimioprotetoras contendo extrato de própolis: estudos de estabilidade, permeação e retenção cutânea *in vitro* e de eficácia *in vivo*.** 2007. 155 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ORSATTI, C.L.; MISSIMA, F.; PAGLIARONE, A.C.; BACHIEGA, T. F.; BÚFALO, M. C.; ARAÚJO JR, J. P.; SFORCIN, J. M. Propolis Immunomodulatory action in vivo on Toll-Like Receptors 2 and 4 Expression and on Pro-Inflammatory Cytokines production in mice. **Phytotherapy research**, v.24, p.1141-1146, 2010.

ORSOLIC, N.; SVET, L.; TERZIC, S.; BASIC, I. Peroral application of water-soluble derivative of propolis (WSDP) and its related polyphenolic compounds and their influence on immunological and antitumor activity. **Veterinary Research Communications**, v.29, p.575–593, 2005.

OTA, C.; UNTERKIRCHER, C.; FANTINATO, V.; SHIMIZU, M.T. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. **Mycoses**, v. 44, p. 375-378, 2001.

PACKER, J.F.; DA LUZ, M.M.F. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 102-107, 2007.

PAULA, V.M.B.; **Caraterização química e biológica do própolis da “Serra de Bornes” por TLC.** 2012. 102 f. Dissertação (Mestrado em Segurança e Qualidade Alimentar) – Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, São Paulo, 2012.

PFALLER, M.A.; SHEEHAN, D.J.; REX, J.H. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. **Clinical Microbiology Review**, v. 17, n. 2, p. 268-280, 2004.

PEDROSA, Z.V. **Atividade de *Coriandrum sativum* L. sobre cepas de *Escherichia coli* produtoras de beta-lactamases de espectro estendido.** 2014. 101 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

PEREIRA, A.A.; PICCOLI, R.H.; BATISTA, N.N.; CAMARGOS, N.G.; OLIVEIRA, M.M.M.; Inativação termoquímica de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella entérica* Enteritidis por óleos essenciais. **Ciência Rural**, v. 44, n. 11, p. 2022-2028, 2014.

PEREIRA, D.A. **Extração aquosa de própolis e secagem em leite de espuma para uso em alimentos.** 2008. 87f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2008.

PEREIRA, A.S.; SEIXAS, F.R.M.S.; AQUINO NETO, R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

PINHEIRO, L.S. **Atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de *Laurus nobilis* L. (louro) sobre cepas de *Cryptococcus neoformans*.** 2014. 78 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

PINTO, M.A.S. **Técnicas de separação e identificação aplicadas a produtos naturais.** 2005. 45 f. Monografia (Graduação em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

PINTO, M.S.; FARIA, J.E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S.T.A.; PEREIRA, C.S.; GIOSSO, M.M. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 6, p. 278-283, 2001.

PINTO, M.S. **Efeito antimicrobiano de própolis verde do estado de Minas Gerais sobre bactérias isoladas do leite de vacas com mastite.** 2000. 92 f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2000.

PROENÇA, K.S.; ROMA, R.M.; OLIVEIRA, R.V.M.; GONÇALVES, M.M.; VILA, M.M.D.C. Avaliação da estabilidade de cremes empregando diferentes agentes de consistência. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 87, n. 3, p. 74-77, 2006.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

RAMOS, A.F.N.; MIRANDA, J.L. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 13, n. 4, p. 697-710, 2007.

REIS, C.M.F.; CARVALHO, J.C.T.; CAPUTO, L.R.G.; PATRICIO, K.C.M.; BARBOSA, M.V.J.; CHIEFF, A.L.; BASTOS, J.K. Atividade anti-inflamatória, anti-úlceras gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.9/10, p.43-52, 2000.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

RUFINO, M.S.; ALVES, R.; BRITO, E.S.; PÉREZ-JIMENEZ, C.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996–1002, 2010.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{•+}. **Comunicado Técnico 128 – Embrapa**, 2007.

SALGUEIRO, F.B.; CASTRO, R.N. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química Nova**, v. 39, n. 10, p. 1192-1199, 2016.

SAVIAN, A.L.; VARELLA, F.T.; ATHAYDE, M.L.; SILVA, C.B. Desenvolvimento e avaliação preliminar da estabilidade de emulsão não-iônica O/A contendo óleo de café verde como potencializador de fator de proteção solar. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 91, n. 2, p. 82-88, 2011.

SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253-260, 2011.

SILVA, T.F.G. **Variação da composição química e atividade antioxidante de própolis em função da época de colheita**. 2014. 102 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2014.

SILVA, J.C.; RODRIGUES, S.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L.M. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. **Food and Chemical Toxicology**, n. 50, p.1790-1795, 2012.

SILVA, A.F. **Própolis: caracterização físico-química, atividade antimicrobiana e antioxidante**. 2009. 126 f. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

SILVA, R.A.; RODRIGUES, A.E.; RIBEIRO, M.C.M.; CUSTÓDIO, A.R.; ANDRADE, N.E.D.; PEREIRA, W.E. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1842-1848, 2006.

SILICI, S.; KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of ethnopharmacology**, v. 99, n. 1, p. 243-249, 2005.

SIMOES, C. M. O; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS. 2007. 1102 p.

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

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic – phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-146, 1965.

SIRIPATRAWAN, U; VITCHAYAKITTI, W; SANGUANDEEKUL, R. Antioxidant and antimicrobial properties of Thai propolis extracted using ethanol aqueous solution. **International Journal of Food Science and Technology**, n. 48, p. 22-27, 2013.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOUSA, J.P.B.; FURTADO, N.A.J.C.; JORGE, R.; SOARES, A.E.E.; BASTOS, J.K.; Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 85-93, 2007a.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA JUNIOR, G.M.; AYRES, M.C.; COSTA, C.L.S.; ARAUJO, D.S.; CAVALVANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.; ARAUJO, P.B.M.; BRANDAO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007b.

SOUZA, P.A. **Determinação do fator de proteção solar *in vitro* e avaliação da estabilidade preliminar de emulsão de água em silicone contendo extratos de *Ginkgobiloba* L. (Ginkgoaceae) e própolis verde**. 2016. 66 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2016.

SOUZA, F.P.; CAMPOS, G.R.; PACKER, J.F. Determinação da atividade fotoprotetora e antioxidante em emulsões contendo extrato de *Malpigia glabra* L. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 69-77, 2013.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC method development**. 2. ed. New York: Wiley. 1997, 800 p.

STOCCO, L.; FARIA, L.G. Estudo da estabilidade físico-química de creme aniônico em embalagens primárias diferentes. In: III Simpósio de Ciências Farmacêuticas, Centro Universitário São Camilo. **Anais**. São Paulo, 2014.

TIVERON, A.P.; ROSALEN, P.L.; FRANCHIN, M.; LACERDA, R.C.C.; BUENO-SILVA, B.; BENSO, B.; DENNY, C.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M. Chemical Characterization and Antioxidant, Antimicrobial, and Anti-Inflammatory Activities of South Brazilian Organic Propolis. **Public Library of Science One**, v.11, p.1-18, 2016.

VARGAS, A.C.; LOGUERCIO, A.P.; WITT, N.M.; COSTA, M.M.; SILVA, M.S.; VIANA, L.R. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” de extrato alcóolico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 159-163, 2004.

WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysys of própolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, p. 99-105, 1998.

ZAMAMI, Y.; TAKATORI, S.; KOYAMA, T.; GODA, M.; IWATANI, Y.; DOI, S.; KAWASAKI, H. Effect of propolis on insulin resistance in fructose-drinking rats. **Yakugaku Zasshi**, v.127, p.2065–2073, 2007.

ZANIN, S.M.W.; MIGUEL, M.D.; CHIMELLI, M.; DALMAZ, A.C. Parâmetros físicos no estudo da estabilidade das emulsões. **Revista Visão Acadêmica, Curitiba**, v. 2, n. 2, p. 47-58, 2001.

ZANON, A. B. **Aspectos teóricos e práticos sobre a avaliação da estabilidade de emulsões manipuladas em farmácia**. 2010. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.