

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**Efeito do extrato de própolis vermelha como medida fotoprotetora
contra os danos causados pela radiação UV**

ANGELA VALÉRIA FARIAS ALVES

Aracaju
Janeiro – 2015

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**Efeito do extrato de própolis vermelha como medida fotoprotetora
contra os danos causados pela radiação UV**

Dissertação de Mestrado submetida à banca
examinadora para a obtenção do título de
Mestre em Saúde e Ambiente, na área de
concentração Saúde e Ambiente.

ANGELA VALÉRIA FARIAS ALVES

Orientadores:

**Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior
Profa. Dra. Juliana Cordeiro Cardoso**

Aracaju
Janeiro – 2015

A474e

Alves, Angela Valeria Farias

Efeito do extrato de própolis vermelha como medida fotoprotetora contra os danos causados pela radiação UV. / orientação [de] Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque, Prof^a. Dr^a. Juliana Cordeiro Cardoso. – Aracaju: UNIT, 2015.

74 p.; il.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Fotoproteção. 2. Própolis vermelha. 3. Atividade antioxidante.

I. Albuquerque Júnior, Ricardo Luiz Cavalcanti de (orient.). II. Cardoso, Juliana Cordeiro III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

CDU: 615.262.2: 638.135

**EFEITO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS VERMELHA COMO MEDIDA
FOTOPROTETORA CONTRA OS DANOS CAUSADOS PELA RADIAÇÃO UV**

Angela Valéria Farias Alves

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À BANCA EXAMINADORA PARA A
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE, NA ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO SAÚDE E AMBIENTE.

Aprovada por:

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, D.Sc
Orientador

Juliana Cordeiro Cardoso, D.Sc
Orientadora

Mairim Russo Serafini, D.Sc
Universidade Federal de Sergipe

Margarete Zanardo Gomes, D.Sc
Universidade Tiradentes

Patricia Severino, D.Sc
Universidade Tiradentes (Suplente)

Edna Aragão Farias Cândido, D.Sc
Universidade Tiradentes (Suplente)

Aracaju
Janeiro – 2015

DEDICATÓRIA

A Deus, meu bem maior;

À minha amada mãe Maria Alves, exemplo de mulher e admirável ser humano.

A duas vidas que marcaram esses últimos dois anos, uma que chegou: minha pequena sobrinha Ana Luíse (Analu), e uma que se foi: meu amado tio Wanderley Alves (tio Wan) - *in memoriam*.

*"A ciência será sempre uma busca, jamais uma descoberta.
É uma viagem, nunca uma chegada."
(Karl Popper)*

AGRADECIMENTOS

Ser agradecido por momentos que passam em nossas vidas vem da alma, e esta, fala àqueles que nas pequenas atitudes participam desses instantes e colaboram por tornar promissoras, valorosas e gratificantes as conquistas. E para os personagens do capítulo dessa história, eis a minha gratidão...

A **Deus** pelo dom da vida e por me capacitar a cada dia em novas buscas e aquisições. Reconheço que essa dádiva vem de Ti.

Aos **meus pais**, que através da simplicidade e de valores humanos deram exemplos de vida e me instruíram na formação do caráter ao longo dos anos.

À minha **família, irmã, avó, tios, primos...**, os de perto e os de longe, que sempre reconheceram a minha capacidade e mantiveram o apoio irrestrito.

Aos meus orientadores, professores **Dr. Ricardo Albuquerque** e **Dra. Juliana Cardoso**:

Ao **Dr. Ricardo Albuquerque** pelo homem simples e visionário. Quando ao longo desses seis anos acolheu-me com um carinho especial, confiando em uma menina tímida, reservada e de poucas palavras, e lançou mão de orientar-me na pesquisa, imbuindo-me a ideia de acreditar no potencial que eu tivesse, e que talvez nem eu mesma o enxergasse. Não é a toa que surgem os rumores e devotam ao senhor o título de “painho”, e foi assim, na figura de um pai que o enxerguei na pesquisa, tal qual o posicionamento de um pai que ao instruir um filho, ele o confia a liberdade de aprender o caminho por seus próprios méritos, mas que quando surge a necessidade de acolhê-lo e auxiliá-lo, ele também se faz presente. E é assim, dessa maneira peculiar em exercer o seu ofício e na postura do digníssimo humorado homem, que podemos usufruir das habilidades que permeiam a sua conduta nas relações humanas.

À querida **Dra. Juliana Cardoso**, um exemplo de mulher, pela qual pude ter o prazer de ser acolhida como orientanda. Ao conhecê-la, aos poucos pude perceber e desfrutar da graça e gentileza que carrega no trato e na atenção. Se eu já tinha um pai na pesquisa, a senhora chegou para ser a mãe. E essa relação foi notória nos aconselhamentos transmitidos ao longo desse trabalho, se em algum momento eu chegasse conturbada pela

insegurança de algum pormenor, depois de ouvi-la eu poderia sair mais aliviada. Ao passar dos dias sua postura como pessoa, professora, pesquisadora foi ganhando a minha admiração e me deixando marcas que cativarei através do tempo, por enxergar a virtude do ser único que é na delicadeza do comportamento humano.

À Professora **Dra. Margarete Gomes** pela atenção e afabilidade durante esses anos.

À professora **Silvia Egues** pela solicitude, prontidão e gentileza com este trabalho.

À **Cintia Meireles** pela dedicação e cortesia expressa com o presente trabalho.

Aos **professores do programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente** colaborando na formação acadêmica a partir da transmissão do saber.

A **Família LMPE**, em especial àqueles do convívio diário: **Ailma Oliveira, Bernadeth Moda, Camila Dantas, Danielle Rodrigues** (“eterna tutora” rrsrs), **Fani Moraes, Felipe Andrade, Mab Abreu, Marismar Fernandes, Nely Pereira** (Mãe querida de prestimosa afeição), **Rafael Valois, Rafaela Oliveira, Reinaldo Neto, Talita Bastos, Grace Dória**, pelo carinho, atenção e bonita convivência. A harmonia da presença de vocês e as risadas ajudaram a tornar os dias mais leves. “kkkkkkkk pra vocês”.

À **Turma de Mestrado em Saúde e Ambiente 2013** pelo companheirismo, amizade e experiências compartilhadas nesse curso. **Allyne Gomes, Felipe Cerqueira, Fernanda Cunha, Fernanda Gomes, Geovan Fontes, Gisele Dosea, Izailza Lopes, Janaina Farias, Jonatas Souza, Josilda Cruz, Marissol Hermann, Rafaela Oliveira, Silverlane Bento, Soraia Silva, Taissa Alice, Wladimir Correa**.

Àqueles amigos, de longas e novas datas, solícitos e comprometidos com o próximo: o casal **Nair Santana e Umeda, Família Matos de Araújo (Zuleide, Valfredo...)**, o casal **Ancelmo Silva e Gal Silva, Alfeu Nascimento, Mônica Carvalho, Moacir**.

À velha e boa trupe que tem me acompanhado nos últimos anos e revelado o quão necessário é manter amigos ao nosso lado e fazer com que mantenhamos estreitos os laços de convivência que conquistamos. “*Mi cariños*” da “Raça Ruim”: **Afrânio Evangelista, Angela Maria, Diogo Andrade, Grazielle Ribeiro, Julyana Fontes, Marcela de Jesus, Marília Assis, Paloma Félix, Suely Carvalho, Tiago Aquino e Valdereis Fontes**.

Ao Laboratório de Biomateriais – **LBMat**, em especial a **Carol Ferreira, Isabelle Melo, Andriele Barbosa, Klebson Silva**.

Ao **Laboratório de Ensaaios Farmacêuticos e Toxicidade (LeFT)** – UFS, em especial ao **Bruno Lima** e ao professor **Dr. Adriano Antunes** pela receptividade e presteza nas análises cromatográficas.

Ao Instituto de Tecnologia e Pesquisa – **ITP** pela infraestrutura e suporte na pesquisa.

A todos que fazem o **Biotério: Marcus, Gladston, Carlos...** Aos **ratos Wistar!!!**

À **Universidade Tiradentes** pela formação acadêmica.

À Agência de Fomento à pesquisa, **CAPES**, pela bolsa concedida.

No mais, àqueles não citados, mas não menos importantes, registro a minha prova de gratidão.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3.1 Radiação Ultravioleta (RUV) e os danos a pele.....	20
3.2 Fotoproteção	22
3.2.1 Filtro solar	23
3.3.1.1 Filtro Solar Inorgânico	24
3.3.1.2 Filtro solar Orgânico.....	25
3.2.2 Produtos naturais como fotoprotetores	27
3.3 Formulações cosméticas e o Fator de Proteção Solar (FPS)	29
3.4 Própolis	30
MATERIAL E MÉTODOS	34
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Obtenção e caracterização do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV) ...	35
4.1.1 Amostra	35
4.1.2 Obtenção do Extrato Hidroalcoólico da Própolis Vermelha – EHPV.....	35
4.1.3 Caracterização do EHPV	35
4.1.3.1 Flavonóides Totais.....	35
4.1.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do EHPV.....	36
4.1.3.3. Determinação do comprimento de onda máximo e da absorvância máxima do EHPV.....	36
4.1.3.4. Atividade antioxidante	36
4.1.3.4.1 Avaliação da atividade sequestrante de radical DPPH - 1,1-difenil-2-picrilidrazil).....	37

4.1.3.4.2 Avaliação da atividade sequestrante de radical ABTS - 2,2' - azinobis (3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)	37
4.2 Formulações cosméticas	37
4.2.1 Desenvolvimento e caracterização das formulações semissólidas contendo EHPV	37
4.2.1.1 Incorporação do EHPV à base cosmética	38
4.2.1.2 Teste de centrifugação	38
4.2.1.3 Determinação do Fator de proteção solar (FPS) <i>in vitro</i>	38
4.3 Modelo de avaliação da atividade fotoprotetora <i>in vivo</i>	40
4.3.1 Animais	40
4.3.2 Delineamento experimental	41
4.3.3 Modelo de irradiação UVB	41
4.4.4. Quantificação da cor da Pele	42
4.4.5. Estudo histopatológico	42
4.4.6. Estudo histomorfométrico	43
4.4.7. Atividade da Mieloperoxidase (MPO)	43
4. 5 Análise estatística	44
RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1. Caracterização do EHPV	46
5.1.1. Rendimento da extração e teor de flavonóides	46
5.1.2. Análise cromatográfica	46
5.1.3. Determinação do comprimento de onda máximo de absorção no espectro de UV.	47
5.1.4. Atividade Antioxidante	48
5.2. Incorporação do EHPV em formulações cosméticas	48
5.2.1. Seleção da base cosmética	48
5.2.2. Determinação do FPS <i>in vitro</i> das formulações a base de Lanette®	50
5.3. Ensaio biológico	51
5.3.1. Avaliação macroscópica dos efeitos fotoprotetores do EHPV em modelo <i>in vivo</i>	51

5.3.2. Avaliação histológica dos efeitos do EHPV em modelo <i>in vivo</i>	53
5.3.3. Atividade da MPO (Mieloperoxidase)	57
CONCLUSÃO GERAL	60
6 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62
7 REFERÊNCIAS	63
ANEXO	74

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Lista de filtros solares permitidos no Brasil e suas concentrações máximas.....	24
Tabela 1. Classificação dos fototipos de pele proposta por Fitzpatrick.....	30
Tabela 2. Função do produto normalizado utilizado no cálculo do FPS.....	38
Tabela 3. Variáveis morfológicas analisadas para o estudo histopatológico descritivo das características citomorfológicas e arquiteturais dos tecidos epidérmicos e dérmicos das amostras de pele dos animais submetidos à irradiação UVB.....	40
Tabela 4. Análise do EHPV em diferentes formas farmacêuticas.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação dos principais eventos fisiopatológicos da radiação solar.....	20
Figura 2. Mecanismo de ação dos filtros inorgânicos.....	24
Figura 3. Mecanismo de ação dos filtros orgânicos.....	25
Figura 4. Estrutura química de substâncias encontradas em amostras de própolis vermelha.....	31
Figura 5. Representação esquemática da distribuição dos grupos experimentais estudados.....	40
Figura 6. Cromatograma da própolis vermelha alagoana.....	46
Figura 7. Perfil de absorção das moléculas contidas em solução hidroalcolica de extrato hidroalcolico de própolis vermelha a 50,0 mg/L na região do ultravioleta.....	47
Figura 8. Formulação cosmética em creme Lanette® com EHPV 3,5% (m/m) e Formulação cosmética em gel Aristoflex® com EHPV 3,5% (m/m).....	48
Figura 9. Fator de proteção solar em formulação cosmética elaborada com EHPV e oxibenzona.....	49
Figura 10. Medidas colorimétricas em diferentes tempos em função do tratamento.....	51
Figura 11. Apresentação macroscópica dos efeitos da RUV nos diferentes grupos estudados.....	52
Figura 12. Secções histológicas coradas em hematoxilina-eosina mostrando tecidos dermoepidérmicos com características usuais, consistentes com quadro de normalidade em animais não irradiados Sem Proteção e com não irradiados com formulação à base de EHPV a 3,5 %.....	53
Figura 13. Secções histológicas coradas em hematoxilina-eosina mostrando alterações morfológicas dermoepidérmicas observadas induzidas por irradiação UVB.....	54
Figura 14. Secções histológicas coradas em hematoxilina-eosina dos grupos estudados destacando a epiderme.....	55
Figura 15. Medida da área epitelial dos grupos experimentais irradiados com UVB.....	56
Figura 16. Atividade de MPO em grupos experimentais irradiados com UVB.....	57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

ABTS – 2,2' - azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DEM – Dose Eritematosa Mínima

DPPH – 1,1-difenil-2-picrilidrazil

EE – Efeito eritemogênico

EHPV – Extrato Hidroalcoólico de Própolis Vermelha

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

FDA – Food and Drug Administration

FPS – Fator de Proteção Solar

FSI – Filtro Solar Inorgânico

FSO – Filtro Solar Orgânico

HTAB - Brometo de Hexa-1,6-bisdeciltrimetilamônio

ISP – Irradiado Sem Proteção

LPS - Lipopolissacarídeo

MPO – Mieloperoxidase

PABA – Ácido para-aminobenzóico

RUV – Radiação Ultravioleta

TiO₂ – Dióxido de Titânio

UV – Ultravioleta

ZnO – Óxido de Zinco

EFEITO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS VERMELHA COMO MEDIDA FOTOPROTETORA CONTRA OS DANOS CAUSADOS PELA RADIAÇÃO UV

Angela Valéria Farias Alves

Estudos em fotoproteção têm sido realizados com a proposta de diminuir os efeitos biológicos negativos sobre a pele provenientes da exposição à radiação solar. A utilização de produtos naturais agregados às formulações pode oferecer recursos adicionais devido à presença de constituintes antioxidantes em sua composição. A própolis vermelha brasileira é um produto apícola que possui substâncias quimicamente semelhantes a filtros solares comerciais e essas são capazes de modular respostas biológicas. O objetivo desse trabalho foi analisar a ação do extrato hidroalcóolico de própolis vermelha alagoana (EHPV) em formulação tópica contra os danos causados pela radiação ultravioleta em roedores. Foi realizada a caracterização do EHPV através das análises: teor de flavonóides totais, atividade antioxidante, determinação do comprimento de onda máximo e cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE. As formulações contendo EHPV nas concentrações de 1,5%; 2,5%; 3,5% e Oxibenzona a 6% foram elaboradas a base de creme Lanette®. Foi realizado teste de determinação do fator de proteção solar *in vitro* e avaliação histológica e atividade da mieloperoxidase (MPO) após aplicação da radiação UVB em ratos nos grupos experimentais: Controle Irradiado sem Proteção – ISP, Controle com aplicação da formulação base - Lanette®, aplicação das formulações elaboradas com EHPV 1,5%, EHPV 2,5%, EHPV 3,5% e Oxibenzona 6%. O ensaio consistiu na irradiação UVB na parte dorsal do animal, quantificação da cor da pele e avaliação da integridade epitelial. Os dados obtidos foram avaliados através da análise de variância ANOVA, seguido de teste de Tukey, com nível de significância $\alpha=0,05$. O teor de flavonóides totais no extrato foi de $3,8\% \pm 0,4\%$ e o rendimento da extração foi de 46%. Os testes realizados para atividade antioxidante mostraram valores de 3,07 mmol trolox /g amostra para o método DPPH e 2,13 mmol trolox/g amostra para o método ABTS. A CLAE revelou seis picos, três deles identificados para as substâncias daidzeína, formononetina, e biochanina A. A concentração destes compostos foi de 0,0285 mg/mg, 0,0405 mg/mg e 0,0325 mg/mg respectivamente. Foram encontrados valores de FPS de 0,47; 0,68; 0,86 para EHPV 1,5%; 2,5%; 3,5%, respectivamente, e 4,24 para oxibenzona 6%. A quantificação da cor da pele induzida por UVB mostrou aumento da tonalidade da pele a partir do tempo 96h, apresentando diferença significativa ($p<0,05$) para os grupos EHPV 1,5%, EHPV 2,5%, EHPV 3,5% e Oxibenzona 6% quando comparados aos grupos controles ISP e Creme Lanette®. A MPO foi reduzida nos grupos tratados com EHPV e Oxibenzona 6%. O estudo histológico dos animais irradiados e tratados com EHPV mostrou-se compatível com a normalidade, além de algumas áreas de discreta infiltração inflamatória, focos de hiperemia capilar. Já naqueles irradiados sem proteção e Lanette® observou-se marcante espessamento epidérmico, edema intracelular, formação de vesículas intraepiteliais hiperqueratose, formação de crostas, infiltração inflamatória de moderada a intensa e hiperemia. Dessa maneira, por apresentar alta atividade antioxidante, o EHPV associado a uma formulação tópica demonstrou ser capaz de reduzir a resposta inflamatória em ratos irradiados por UVB, além reduzir o desenvolvimento de alterações histopatológicas dermoepidérmicas induzidas por radiação UVB.

PALAVRAS-CHAVE: Fotoproteção; própolis vermelha; atividade antioxidante.

EFFECT OF RED PROPOLIS' EXTRACT AS PHOTOPROTECTION MEASURE AGAINST DAMAGES CAUSED BY UV RADIATION

Angela Valéria Farias Alves

Studies in photoprotection have been conducted with the proposal to reduce the negative biological effects on the skin from exposure to solar radiation. The use of natural products to aggregate formulations can provide additional features due to the presence of antioxidant constituents in the composition. The Brazilian red propolis is an apicultural product that contains chemical substances which, along with its similarity to commercial sunscreens, are capable of modulating biological responses. The objective of this study was to analyze the action of the hydroalcoholic extract of Alagoas' red propolis (EHPV) in topical formulation against damages caused by ultraviolet radiation in rodents. The EHPV's characterization was performed through the analysis of: total flavonoid's content, antioxidant activity, maximum wavelength's determination and liquid high efficiency chromatography - CLAE. Formulations containing EHPV at concentrations of 1.5%; 2.5%; 3.5% and 6% Oxybenzone were prepared using Cream Lanette®. The test was performed to determine the sun protection factor (FPS) *in vitro* and myeloperoxidase (MPO) activity and histological evaluation after application of UVB radiation in mice in the experimental groups: irradiated control without protection - ISP, control with formulation base application - Lanette®, application of the formulations prepared with EHPV 1.5% EHPV 2.5%, 3.5% and EHPV Oxybenzone 6%. The test consisted of UVB irradiation on the dorsal part of the animal, skin color measurement and evaluation of epithelial integrity. Data were evaluated by ANOVA followed by Tukey test, with significance level $\alpha = 0.05$. The content of total flavonoids in the extract was $3.8\% \pm 0.4\%$ and the yield was 46%. The tests for antioxidant activity were 3.07 mmol trolox/g sample to the DPPH method and 2.13 mmol trolox/g sample for the ABTS method. The CLAE revealed six peaks, in which three of these were identified the substances daidzein, formononetin and biochanin A. The concentration of these compounds was 0.0285 mg/mg 0.0405 mg/mg and 0.0325 mg/mg respectively. FPS values found were of 0,47; 0,68; 0,86 to EHPV 1.5%; 2.5%; 3.5%, respectively, and 4.24 to 6% oxybenzone. Quantification of skin color induced by UVB showed increased skin tone from the time 96 hours, with a significant difference ($p < 0.05$) for EHPV groups 1.5%, 2.5%, 3.5% and 6% Oxybenzone, when compared to the ISP's control group and Cream Lanette®'s control group. MPO was decreased in the groups treated with EHPV and 6% Oxybenzone. The histological study of animals irradiated and treated with EHPV was compatible with normality, as well as some areas of discrete inflammatory infiltration, capillary hyperemia outbreaks. As for those which were irradiated without protection and Lanette®, it was observed a significant epidermal thickening, intracellular edema, hyperkeratosis, intraepithelial vesicles formation, crusting formation, inflammatory infiltration from moderate to intense and hyperemia. Thus, due to its highly antioxidant activity, EHPV associated to a topical formulation has shown its efficiency in reducing the inflammatory response in UVB irradiated mice, as well as reducing derm-epidermal development of histological changes induced by UVB radiation.

KEYWORDS: Photoprotection; red propolis; antioxidant activity.

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de fotoprotetores tem a finalidade de atender às necessidades da pele quanto à prevenção dos efeitos nocivos causados por irradiação solar como queimaduras, e efeitos crônicos como fotoenvelhecimento e câncer de pele (CESTARI et al. 2012, BOLFA et al., 2013). Como medidas preventivas, recomenda-se a utilização de protetores solares, roupas protetoras, e ainda evitando a exposição à luz solar nos horários em que a incidência dos raios UV é mais intensa. Nesse sentido, o uso de fotoprotetores se constitui o primeiro passo para diminuir os efeitos nocivos dos raios ultravioleta. A ação dos protetores solares se deve a presença de substâncias, conhecidas como filtros solares ultravioleta, capazes de absorver a radiação e/ou atuar na diminuição do dano celular causado pela radiação (GONZÁLES et al., 2008).

A literatura tem mostrado que a composição de muitas formulações com filtros químicos não propiciam proteção total, principalmente ao se levar em consideração os efeitos crônicos como fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese (DAMIANI et al., 2006). Dessa forma, extratos vegetais ricos em constituintes fenólicos, como flavonóides, têm sido agregados às formulações fotoprotetoras, a fim de resguardar a pele; pois quando exposta à radiação solar pode ocorrer processos biológicos envolvendo geração de radicais livres e consequente dano celular. Os constituintes presentes no extrato podem absorver a radiação solar, bem como agir como substâncias sequestrantes de radicais livres (atividade antioxidante), conferindo uma maior proteção à pele (KIM et al., 2001; AQUINO et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2009).

Dentre os produtos naturais com potencial efeito antioxidante, a própolis vermelha tem apresentado diversas propriedades biológicas promissoras (BARBOSA, 2009). Alguns estudos utilizando amostras de própolis vermelha brasileira têm demonstrado atividades como: ação fungicida, potencial efeito gastroprotetor (PINHEIRO, 2009), ação antimicrobiana (SIQUEIRA et al., 2014, BITTENCOURT et al. 2014), cicatrizante (ALBUQUERQUE-JR et al., 2009; ALMEIDA et al., 2013), antioxidante (MOURÃO, 2013), atividade antitumoral em cânceres oral e de pele (CAVALCANTE, 2011; PINHEIRO, et al., 2014). Assim, ao considerar que os referidos estudos abordam resultados de atividades biológicas envolvendo mecanismos antiinflamatório e antioxidante como consequência da administração oral do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV), o presente trabalho pretendeu avaliar a ação tópica do EHPV, que apresenta constituintes químicos semelhantes aos convencionais filtros orgânicos, incorporado a uma base cosmética e avaliar a potencial ação fotoprotetora e antioxidante em modelo animal.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- ✓ Analisar a ação do EHPV em formulação tópica contra os danos causados pela radiação ultravioleta em roedores.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Caracterizar o EHPV obtido a partir de amostras de própolis vermelha alagoana;
- ✓ Desenvolver formulações semi-sólidas com EHPV;
- ✓ Determinar o fator de proteção solar conferido pelas formulações *in vitro*;
- ✓ Avaliar a atividade *in vivo* das formulações contra os danos causados pela radiação ultravioleta.

REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Radiação Ultravioleta (RUV) e os danos a pele

A RUV faz parte do espectro eletromagnético emitido pelo sol, compreende os comprimentos de ondas na faixa do UV entre 100-400 nm e é subdividida em UVC (100-280 nm), UVB (280-320 nm) e UVA (320-400 nm) (NEVES, 2008). A radiação ultravioleta C (UVC) não chega à superfície da Terra, pois é absorvida pela camada de ozônio. Já a radiação UVB é parcialmente filtrada pela camada de ozônio, correspondendo cerca de 5% do total de radiação UV que chega a Terra. Quanto aos raios UVA, estes são considerados menos ativos na pele quando estabelecida uma relação com o UVB. São ainda subdivididos em UVA-II e UVA-I, sendo que o UVA-II apresenta comprimento de onda que se entende entre a faixa de 320 a 340 nm e possui característica mais eritematosa e fotossensibilizante que o UVA-I, que apresenta comprimento de onda entre 340- 400 nm (WENTZELL, 1996). A porção de RUV que chega a Terra e atinge a pele participa do processo de reflexão e dispersão, sendo parte absorvida pela camada córnea e outra porção é transmitida para as demais camadas da pele, de maneira que a energia incidente seja completamente dissipada (YAAR; GILCHREST, 2007).

A pele é um extenso órgão do corpo humano composta basicamente por três camadas de tecido: epiderme, derme e hipoderme, e que possui diversas funções, entre essas a proteção contra agressões físicas, químicas e biológicas, além dos danos decorrentes da radiação solar (MAIO, 2011).

As radiações UVB e UVA são responsáveis por modificações na função dos tecidos e células da epiderme e derme, ocasionando alterações agudas como o eritema e crônicas como o câncer e o fotoenvelhecimento. Particularmente os raios UVB são capazes de alterar células epiteliais a partir da formação de substâncias vasodilatadoras, as prostaglandinas, que iniciam um processo inflamatório agudo e consequente estágio de rubor caracterizando o eritema. Já os raios UVA atuam nos vasos da derme, determinam vasodilatação e eritema, todavia não ativam mediadores inflamatórios (RIJKEN; BRUIJNZEEL, 2009).

De maneira natural como resposta protetora à ação dos efeitos da radiação solar, a produção de melanina é ativada nos melanócitos localizados na camada basal da epiderme e cumpre o estágio de pigmentação da pele. Em segundo momento, diante de uma exposição inadequada pode surgir um quadro de queimadura solar, caracterizada por, além de eritema, sensação de calor, edema e descamação. Quando a exposição torna-se crônica, a ação dos raios ultravioleta (UVA e UVB) pode levar ao fotoenvelhecimento da pele ou atuar como mutagênico direto sobre o DNA, uma vez que este absorveria a radiação

que a ele atinge, e sofreria alterações na conformação original da estrutura molecular. Caso estas alterações não sejam passíveis de reparo, existe o iminente risco do desenvolvimento de uma célula mutante (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2002; RIGEL, 2008; JANSEN et al., 2013). À medida que a radiação UV incide nas estruturas teciduais da pele, em longo prazo surge uma quantidade considerável de dímeros de pirimidina, de modo que as enzimas (fotoliase, endonucleases, helicases) responsáveis pelo processo de identificação e reparo podem não ser suficientes para solucionar as modificações resultantes desse processo e promover o silenciamento de genes supressores tumorais (gene p53,) e gerar tumores de pele (YAROSH, 2002; SETLOW, 2014).

Esses processos químicos iniciados a partir da absorção da RUV levam a formação de espécies reativas de oxigênio – EROs, e são estas espécies responsáveis pelo evento de alteração no DNA e consequente mutação celular (ZAID et al., 2007). Trabalhos tem mostrado que o aumento na incidência do número de casos de câncer de pele está atrelado à exposição aos raios UVB, e que o papel lesivo desempenhado por esses raios encontra relação com a longa duração e intensidade, ou ambos, de irradiação solar sobre a pele (HATFIELD et al., 2009; CHANG et al., 2010). A figura 1 apresenta os principais eventos fisiopatológicos envolvidos na exposição da pele à RUV.

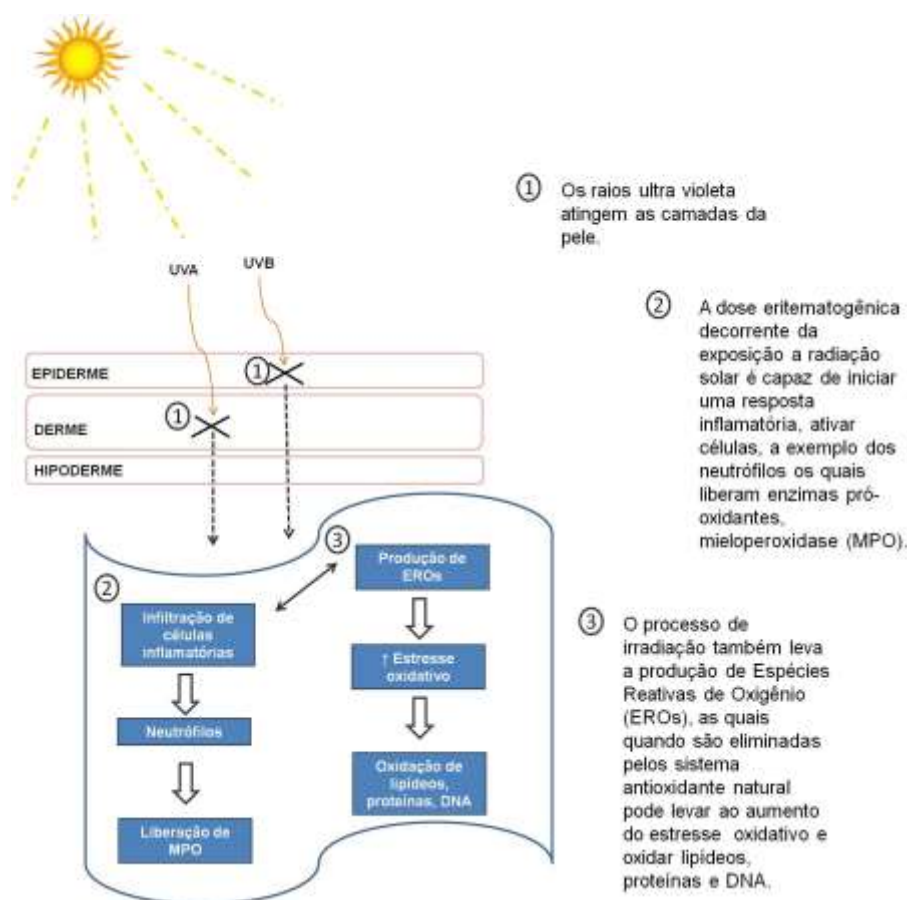


Figura 1. Representação dos principais eventos fisiopatológicos da radiação solar.
Fonte própria.

As EROs ou os conhecidos radicais livres (radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), alcoxila ($RO^{\cdot}$), hidroxila ($HO^{\cdot}$), óxido nítrico ($NO^{\cdot}$), peroxila ($ROO^{\cdot}$)) são gerados em detrimento do processo de oxidação que ocorre em função da atividade endógena a partir do metabolismo celular aeróbio (redução do O_2 a H_2O). No processo exógeno, o dano celular causado pela RUV é caracterizado pela geração de reações em cadeia dessas espécies com outras moléculas promovendo efeitos prejudiciais para o organismo, tais como: processo inflamatório (ativação de fagócitos – neutrófilos, macrófagos, monócitos e eosinófilos) envelhecimento precoce, enfermidades crônicas como artrite e doenças terminais como o câncer (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

A fim de combater as EROs, a ação de agentes antioxidantes se faz necessária. Os antioxidantes são compostos destinados a inibir reações de oxidação. Este processo de oxidação ocorre a partir da doação de elétrons às moléculas de radicais livres tornando-os estáveis. Como defesa biológica, o organismo possui mecanismos químicos e enzimáticos com a finalidade de diminuir a ação destrutiva das EROs, como as enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Além disso, podem ser citados os componentes antioxidantes adquiridos através da alimentação como o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, selênio e ácido ascórbico (vitamina C) (YU, 1994).

A pele dispõe desses mecanismos de defesa antioxidante. Enzimas como a glutathione peroxidase e glutathione reductase são capazes de neutralizar a ação de peróxidos de hidrogênio e a superóxido dismutase protege contra o radical superóxido. A partir de métodos *in vitro* é possível de mensurar uma resposta antioxidante desses agentes presentes na pele e assim, avaliar o consumo dessas moléculas por fatores oxidantes como a radiação ultravioleta (PODDA; GRUNDMANN-KOLLMANN, 2001).

3.2 Fotoproteção

A proteção da pele dos efeitos bioquímicos ocasionados pela radiação solar é realizada por cuidados básicos que vão desde a proteção física por meio do uso de roupas, bonés, óculos de sol, chapéus até o uso de formulações cosméticas contendo filtro solar; ou orais, por compostos antioxidantes (MALBASA; BARON, 2010; GHAZI et al., 2011). Estudos com abordagem para diferentes formas de fotoproteção têm mostrado que essa estratégia primária assegura a prevenção contras os conhecidos riscos induzidos por radiação UV sobre a pele (BALOGH et al., 2011; CESTARI et al., 2012).

3.2.1 Filtro solar

O filtro solar surgiu no mercado norte-americano na década de 1920 quando se percebeu a necessidade de proteger a pele da radiação solar. Anos mais tarde, dentro do cenário da segunda guerra mundial, o farmacêutico Benjamin Greene ao observar que os soldados americanos voltavam dos campos de batalha apresentando queimaduras na pele, optou por desenvolver uma formulação contendo fragrância de Jasmim e petrolato vermelho como agente fotoprotetor. Essa formulação foi chamada de Coppertone, a qual até os dias atuais traz o nome comercial de uma linha de protetores solares (GIACOMONI, 2005; ROELANDTS, 2007).

Passados anos dessa inovação, cresceram-se os avanços em pesquisas com filtro solar, de modo que em 1951 a Food and Drug Administration (FDA), órgão governamental dos Estados Unidos da América responsável pela proteção e promoção da saúde pública no país, elaborou e aprovou uma lista de moléculas para utilização como filtro solar nas respectivas concentrações de uso propostas pela lei (FDA, 1999).

A década de 1970 foi o período em que os fotoprotetores difundiram-se a partir da utilização de diversos filtros UVB em cremes e loções, e conseqüente, os filtros UVA. Anos mais tarde, ocorreu a introdução das partículas de óxido de zinco (ZnO) e dióxido de titânio (TiO₂) nas formulações cosméticas com o objetivo de promover proteção à pele na ampla faixa UVA-UVB (URBACH et al., 1976).

Os filtros solares são substâncias que quando adicionados a formulações próprias são capazes de reduzir os efeitos da radiação sobre a pele por mecanismos específicos tais como: absorção, reflexão ou espalhamento da luz incidente (SAMBANDAN; RATNER, 2011). Estão classificados em físicos ou inorgânicos e químicos ou orgânicos, e tem relação com o mecanismo de ação envolvido no processo de fotoproteção.

O quadro 1 mostra a lista de alguns dos filtros solares permitidos pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) de acordo com a Resolução - RDC de Nº 47, de 16 de março de 2006.

Quadro 1. Lista de filtros solares permitidos no Brasil e suas concentrações máximas.

Substância		Concentração (%)	Faixa de cobertura
INORGÂNICO	Dióxido de titânio	25,0	UVB, UVA2
	Óxido de Zinco	25,0	UVB, UVA1, UVA2
ORGÂNICO	Ácido para-aminobenzóico (PABA)	15,0	UVB
	Avobenzona (butyl methoxy dibenzoyl methane)	5,0	UVA1
	Cinoxate	3,0	UVB
	Oxibenzona	10,0	UVB, UVA2
	Homosalate	15,0	UVB
	Meradimate (menthyl anthranilate)	5,0	UVA2
	Octylocrylene	10,0	UVB
	Octinoxate (octylmethoxycinnamates)	10,0	UVB
	Octisalate (octyl salicylate)	5,0	UVB
	Salicilato de trietanolamina	12,0	UVB

3.3.1.1 Filtro Solar Inorgânico

Os filtros solares inorgânicos (FSI) são encontrados na forma de pós opacos, insolúveis em água e materiais graxos. Os mais conhecidos e utilizados comercialmente, por serem mais representativos na segurança e eficácia de proteção da pele, são o óxido de zinco e o dióxido de titânio (TUCHINDA et al., 2006).

Estes dois filtros, assim como outros da mesma classe, a exemplo do talco, cério e zircônio, atuam formando uma barreira sobre a pele, de maneira que esse mecanismo colabora por refletir, dispersar e absorver a luz UV (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005) – Figura 2.

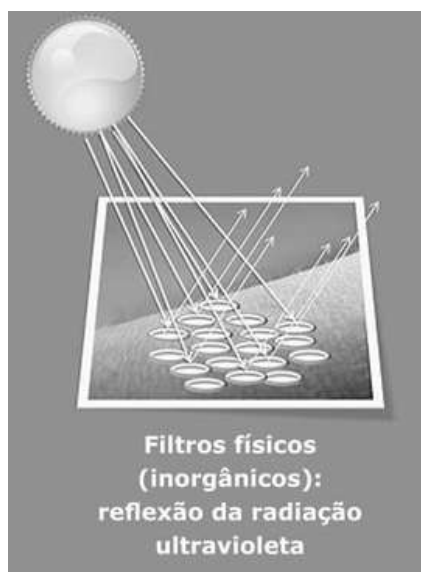


Figura 2. Mecanismo de ação dos filtros inorgânicos
Extraído e adaptado de: CRIADO et al., 2012.

Esse mecanismo de ação é explicado pelo tamanho da partícula do filtro, que influenciará no processo de absorção e reflexão da luz solar. Assim, filtros com partículas maiores que 200 nm conferirão uma medida fotoprotetora na ampla faixa UVB-UVA, inferior a aqueles com tamanho de partículas no intervalo de 70 a 200 nm (WANG; TOOLEY, 2011).

Além do critério de o menor tamanho da partícula influenciar na interação com a radiação UV, visto que favorece uma melhor cobertura, atenua com maior eficiência a luz UV, conferindo melhor efeito fotoprotetor. Além de oferecer melhor aparência cosmética do produto sobre a pele, uma vez que o tamanho da partícula reduzido repercute na diminuição da interação com a luz visível e consequentemente efeito de brancura sobre a pele (WANG; TOOLEY, 2011).

Com base nesse conhecimento, o tamanho das partículas é reduzido pelo processo conhecido como micronização, e os FSI óxido de zinco e dióxido de titânio são encontrados como: microfino, nanopartícula (10-100nm) (FILIPE et al., 2009).

3.3.1.2 Filtro solar Orgânico

Os filtros solares orgânicos (FSO) são classificados de acordo com a estrutura química. Encontram-se os derivados do ácido paraminobenzóico (PABA), derivados de salicilatos, derivados de cinamatos, derivados de benzofenona, derivados de dibenzoilmetano, derivados de antranilato, derivados de cânfora, derivados benzotriazol, derivados da triazina.

O papel de proteção dos FSO contra os raios UV é baseado no mecanismo de absorção, de forma que a radiação de alta energia é convertida em radiação de baixa

energia não representativa de riscos para a pele do ser humano. A fotoproteção é devido à configuração das estruturas moleculares presentes na formulação. Essas estruturas ao absorverem a luz de alta energia advinda da radiação solar através dos elétrons presentes nas moléculas são excitados e, ao retornarem ao estado inicial, a energia absorvida é liberada em forma de calor – Figura 3 (FORESTIER, 2008).

Em virtude de os FSO apresentarem limitação quanto à proteção para uma faixa UV, conferindo fotoproteção insuficiente; e ainda apresentarem tendência a fotoinstabilidade, a associação entre filtros orgânicos é um critério utilizados pelas indústrias na elaboração de um protetor solar. Dessa maneira tem-se um produto que oferece largo espectro de proteção UVB-UVA (LADEMANN et al., 2005). O Mexoryl XL (2-(2H-benzotriazol-2-il)-4-metil-6-{2-metil-3-(1,3,3,3-tetrametil-1-((trimetilsilil)oxi)-disiloxanil) propil} fenol), o Mexoryl SX (ácido dicanforsulfônico tereftalideno), Helioplex (avobenzona, oxibenzona e 2-6-dietilhexil naflato), o Tinosorb S (Bis-Etilhexiloxifenol Metoxifenil Triazina) e o Tinosorb M (etileno Bis-Benzotriazolil Tetrametilfenol) são exemplos de algumas associações de FSO disponíveis no mercado (CHATELAIN; GABARD, 2001; GASPAR; MAIA-CAMPOS, 2006; BISSONNETTE, 2008).



Figura 3. Mecanismo de ação dos filtros orgânicos.
Extraído e adaptado de: CRIADO et al., 2012.

A utilização de formulações com filtro solar, algumas vezes pode induzir reações alérgicas do tipo dermatite de contato e fotodermatite. Existem relatos associado ao uso de algumas classes de filtros responsáveis por esse efeito dérmico, como os da classe das benzofenonas e do PABA (DARVAY et al., 2001). Sendo assim, o uso de filtros orgânicos naturais tem se tornado uma opção menos agressiva quando analisada a composição do ingrediente protetor. Muitos são à base de compostos naturais e extratos vegetais como: *Aloe vera*, camomila, chá verde, semente de uva. Gilabert e González (2010) ao mostrar

alguns dos avanços na área de fotoproteção, fazem uma abordagem do crescente uso de antioxidantes em composições cosméticas (quercetina, resveratrol) e extratos de plantas como agentes fotoprotetores.

O emprego de extratos de plantas contra os efeitos da luz ultravioleta sobre a pele pode ser demonstrado através do trabalho de Petrova et al. (2011) quando estes avaliaram a ação do extrato de *Cyclopia* spp. (Honeybush) em camundongos expostos a luz UVB e observaram a proteção da pele quanto à penetração destes raios UV e contra danos oxidativos ao DNA. Desta forma, trabalhos analisando a atividade de produtos naturais como medida fotoprotetora têm sido realizados e demonstrando resultados sugestivos de ação eficaz contra o efeito prejudicial da RUV (PETROVA et al., 2011; MENAA; MENAA, 2014)

3.2.2 Produtos naturais como fotoprotetores

O Brasil é um país que apresenta rica biodiversidade e essa característica mobiliza o setor econômico da nação. Pelo fato desse país dispor de inúmeras plantas medicinais, a Organização Mundial de Saúde incentiva o estudo com tais plantas a fim de promover práticas em saúde, como a proposta da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde, colaborando com benefícios à população, tendo em vista o tratamento dos sintomas de doenças no uso de algumas dessas plantas (PNPIC-SUS, 2006; OLIVEIRA et al., 2012).

O uso de produtos naturais apresenta grande avanço no meio científico à medida que se trabalha pela busca de novas fontes naturais que apresentem constituintes que venham oferecer propostas de prevenção de doenças e ou terapêuticas (NAIK; KOKIL, 2013; FU et al., 2014). A diversidade de substâncias naturais apresenta rica composição química capaz de desempenhar diversas atividades biológicas. Relatos divulgados pela literatura científica mostram algumas dessas atividades, a exemplo da camomila (*Matricaria recutita*) com ação anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, analgésica (SRIVASTAVA; GUPTA, 2009), uva (*Vitis vinifera*), alho (*Allium sativum*) com atividade antioxidante (GARRIDO et al., 2011; TAYEL; EL-TRAS, 2012).

Os antioxidantes naturais encontrados em frutas, vegetais, plantas são substâncias bioativas importantes para proteger o sistema biológico dos danos provocados pelos radicais livres. Estes são capazes de promover reações de oxidação com moléculas biológicas, como DNA, proteínas e lipídeos, e gerar danos mutagênicos (SCHREINER; HUYSKENS-KEIL, 2006).

A adição de compostos antioxidantes em produtos torna-se comum quando se preza pela conservação, a exemplo dos alimentos industrializados; e ou fornecer benefícios extra, como a prevenção de envelhecimento precoce, com o incremento de ativos com ação antioxidante em cremes (JURKIEWICZ; BISSETT; BUETTNER, 1995; EBERLEIN-KONIG; RING, 2005).

Adjuntamente a essa de suplementação de antioxidantes tópicos, uma medida que tem sido recomendada é a suplementação de antioxidantes sistêmicos na finalidade de combater a os radicais livres gerados pela excessiva exposição à luz solar. Essa ação constitui uma medida fotoprotetora. Por meio da administração oral de substâncias formuladas com extratos de plantas ou alimentos ricos em compostos responsáveis pela ação fotoprotetora, os conhecidos fotoprotetores orais podem ser utilizados como complemento para protetores solares tópicos (CHEN et al., 2014). A ação oferecida pelo fotoprotetor oral se deve à presença de substâncias responsáveis por promover um efeito preventivo contra os riscos induzidos pelos raios ultravioleta, neutralizando os radicais livres relacionados à agressão da pele pela luz (AHMED et al., 2006). Espécies como o *Polypodium leucotomus* (samambaia), *Pinus pinaster* (Pycnogenol), e compostos como carotenóides, flavonoides (ginesteína) são alguns dos responsáveis por demonstrar atividade sistêmica quanto ao estudo de fotoproteção oral (GILABERTE; GONZÁLEZ, 2010).

Pesquisas com *Polypodium leucotomus* demonstraram que a administração oral do extrato de *P. leucotomus* mostrou significativa atividade antioxidante (GONZÁLEZ; PATHA, 1996), redução no processo de inflamação induzido por radiação ultravioleta (MIDDELKAMP-HUP et al., 2004).

Campos e Pitassi (2014), em estudo voltado a avaliar a eficácia clínica da administração oral de Pycnogenol combinado com aplicação de filtro solar diária em pacientes com melasma, verificaram melhora na pigmentação da pele após dois meses de tratamento. Outro trabalho nessa linha, quanto ao uso de carotenóides, mostrou que humanos submetidos a uma dieta rica nesses compostos apresentavam efeitos fotoprotetores relacionados à tendência mínima do surgimento de eritema por luz UV (STAHL et al., 2006). Desta forma, pesquisas voltadas a tentativa de fornecer proteção contra o amplo espectro solar, através de filtros solares, e prevenir os efeitos deletérios são crescentes, e asseguram que melhorias devem ser desenvolvidas com a finalidade de proporcionar uma melhor proteção contra os raios UV e radiação infravermelha (SCHROEDER; CALLES; KRUTMANN, 2009; CESTARI; OLIVEIRA; BOZA, 2012).

Nessa visão, devido às propriedades antioxidantes apresentadas pelos compostos presentes em produtos naturais, a incorporação destes em formulações cosméticas com finalidade fotoprotetora, tem sido demonstrada através de estudos científicos. Maske et al. (2013) investigando o efeito fotoprotetor *in vitro* do extrato de *Rosa kordesii* em formulação

gel, demonstrou que a formulação elaborada foi útil quanto a finalidade fotoprotetora, atestando ser uma alternativa mais barata e eficiente quando comparada a filtros solares químicos. Chiari et al. (2014) avaliaram as propriedades do óleo de café verde com o propósito de aplicá-lo a protetores solares, e observaram que o óleo de café verde quando associado a um filtro solar orgânico promoveu um aumento de 20% no FPS, sugerindo uma melhoria na fotoproteção. Marquele et al. (2007) avaliaram formulações desenvolvidas com própolis verde e a permeação de compostos antioxidantes presentes no extrato para as camadas da pele e evidenciaram eventual efeito fotoprotetor a partir da penetração do extrato com ação antioxidante nas camadas inferiores da pele.

3.3 Formulações cosméticas e o Fator de Proteção Solar (FPS)

As formulações cosméticas elaboradas com a finalidade fotoprotetora estão disponibilizadas nas formas farmacêutica de emulsão (creme ou loção), *stick*, e gel. A partir dessas formas são incorporados os princípios ativos (filtros solares) a fim de que se obtenha o número de FPS estimado para cada produto fotoprotetor (BORGHETTI; KNORST, 2006).

A partir da elaboração do produto destinado a funcionar como protetor solar, a determinação do grau de proteção oferecido pela formulação faz-se necessária quando existe a necessidade de se rotular o número de FPS. De acordo com as normas estabelecidas pela resolução Nº 30 de 1º de junho de 2012, que atualmente é exigido um valor mínimo de FPS de 6 (BRASIL, 2012).

Neste sentido, metodologias *in vitro* e *in vivo* são propostas para a aferição do FPS em formulações fotoprotetoras. Métodos *in vitro* são comumente utilizados para o controle de qualidade de rotina, lote a lote dos produtos desenvolvidos pela indústria, e estão baseados nas propriedades absorptivas ou refletoras dos filtros (STOKES, 2000).

O referido método é determinado espectrofotometricamente e apresenta boa correlação com resultados de testes *in vivo*. Destacam-se o método espectrofotométrico proposto por Mansur e colaboradores (1986) e o desenvolvido por Diffey (1997), o qual utiliza espectrofotômetro de reflectância e apresenta a vantagem de determinar o FPS de formulações que contenham filtros solares inorgânicos.

No que se refere à metodologia *in vivo*, o FPS é medido em voluntários humanos, e mostra o quanto a pele de um indivíduo estará protegida da radiação UV pelo produto fotoprotetor, sendo capaz de demonstrar quanto tempo uma pessoa poderá ficar exposta ao sol usando uma formulação com filtro solar sem desenvolver eritema (FDA, 1978). A equivalência do grau de proteção na pele demonstrado por um fotoprotetor é calculada pela relação matemática representada pela razão entre a Dose Eritematosa Mínima (DEM) da pele protegida pelo fotoprotetor e a DEM da pele não protegida. A resposta apresentada é

dependente de cada fototipo de pele (Tabela 1), que apresenta relação com as características físicas e respostas da pele à radiação solar, como proposto por Fitzpatrick (1998).

Tabela 1. Classificação dos fototipos de pele proposta por Fitzpatrick.

Fototipo	Grupo	Eritema	Pigmentação	Sensibilidade
I	Branca	Sempre se queima	Nunca se bronzeia	Muito sensível
II	Branca	Sempre se queima	Às vezes se bronzeia	Sensível
III	Morena clara	Queima (moderado)	Bronzeia (moderado)	Normal
IV	Morena moderada	Queima (pouco)	Sempre se bronzeia	Normal
V	Morena escura	Queima (raramente)	Sempre se bronzeia	Pouco sensível
VI	Negra	Nunca se queima	Totalmente pigmentada	Insensível

Com base nesta classificação é categorizada a faixa de proteção solar rotulada nos produtos cosméticos com FPS.

Em se tratando de valores de FPS para proteção solar, alguns autores concordam que um FPS de 15 seja suficiente para evitar o problema do câncer de pele. Outros acordam que valores maiores que 15 seja ideal para conferir o grau de proteção solar (WENTZELL, 1996; OU-YANG et al., 2012).

A realidade é que trabalhos mostram que em termos de percentual de radiação absorvida, não se observa grandes vantagens para FPS acima de 15, pois o bloqueio de radiação UVB no mesmo intervalo de tempo fornecida por um FPS de 15 seria em cerca de 92%, 96% para um FPS 30, 98% para um FPS de 70, mostrando a não necessidade adicional de filtros solares maior que 30 (DIFFEY, 2002; KIM et al., 2010).

3.4 Própolis

A própolis consiste em um material resinoso e balsâmico, de estrutura complexa, formado pela adição de secreções mandibulares das abelhas, juntamente com a porção de resinas e bálsamos de diferentes partes de plantas coletado por esses insetos (BONHEVI, et al., 1994). Há muito que este produto natural é utilizado pela humanidade e relatos

históricos evidenciam este feito. Por conhecerem suas propriedades anti-putrefativas, os egípcios utilizavam-no com a finalidade de embalsamar cadáveres; médicos gregos e romanos como Aristóteles, Dioscorides, Plínio e Galeno reconheceram as propriedades medicinais, e a partir de então extratos da própolis passaram a ser utilizados na medicina popular (CAPASSO; CASTALDO, 2002; DA SILVA et al., 2006). Dentro dessa visão, na proposta medicinal, as propriedades cicatrizantes foram úteis no tratamento dos combatentes da guerra na África do Sul, e na Segunda Guerra Mundial em diversas clínicas da ex-União Soviética (PEREIRA et al, 2002).

No que se refere ao padrão de cor, a coloração da própolis depende da origem, variando em tons que vão do marrom escuro, passando por uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado, e é dependente da flora de origem e idade (MARCUCCI, 1996; BURDOCK, 1998). Por meio da coloração e através da análise das características físico-químicas e propriedades biológicas de amostras coletadas em diferentes regiões brasileiras foram definidos doze tipos da própolis brasileira, além de ser notificado um novo tipo de própolis com a coloração vermelha reunindo características físico-químicas e biológicas diferentes daquelas anteriormente mencionadas na literatura. Esse décimo terceiro tipo de própolis foi encontrado em colmeias dispostas na extensão do litoral e dos rios do Nordeste do Brasil (DAUGSCH et al, 2007).

A partir de então, a literatura científica tem retratado estudos evidenciando atividades biológicas deste produto apícola com amostras de própolis verde brasileira. Esta variedade de própolis tem sido estudada como agente fotoprotetor contra danos causados por radiação UV. Marquele-Oliveira et al. (2007) se propuseram a desenvolver formulações tópicas acrescidas de extrato de própolis e observaram que compostos antioxidantes presentes no extrato de própolis podem atingir as camadas inferiores da pele, além de sugerir que seja eficaz na proteção contra o fotoenvelhecimento da pele promovido pelos raios UVB. Gregoris et al. (2011) analisaram a atividade antioxidante de amostras de própolis de uma região da Itália e investigaram o grau de fotoproteção no espectro UVB-UVA e constataram que parte dos componentes presentes na amostra de própolis poderiam ser efetivos quando utilizados em formulações protetoras solares.

Diversos componentes químicos têm sido identificados em amostras de própolis verde como: quercetina, ácido ferúlico, naringenina (MOHAMMADZADEH et al., 2007; SULAIMAN et al., 2011). Todavia, diversos trabalhos recentemente publicados demonstram a potencialidade biológica de uma nova variedade de própolis encontrada no Nordeste brasileiro (ALMEIDA et al., 2013; SOUZA et al., 2013; FROZZA et al., 2013; PINHEIRO et al., 2014). Esta variedade, conhecida como própolis vermelha, tem predominância de isoflanovas e outros compostos inexistentes em outras variedades, tais como a daidzeína, formononetina e biochanina A – Figura 4 (LIO et al., 2010; FROZZA et al., 2013).

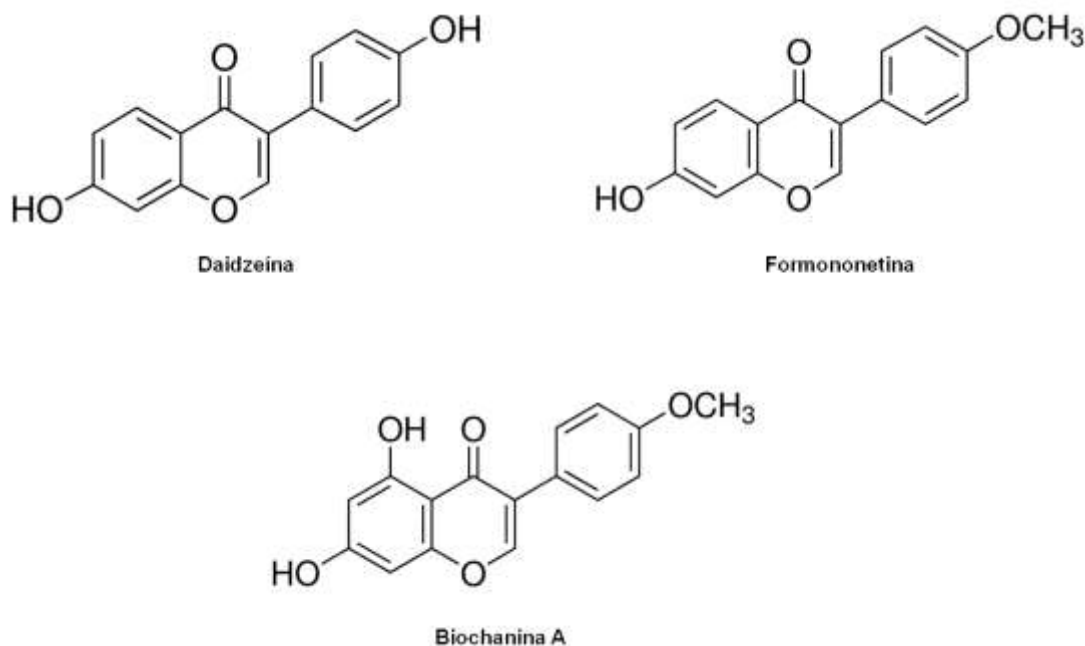


Figura 4. Estrutura química de substâncias encontradas em amostras de própolis vermelha.

Em se tratando da própolis vermelha brasileira, o interesse científico em estudos com diferentes aplicações medicinais se deve a sua rica composição química. A modulação de determinada atividade biológica se deve aos componentes químicos presentes, especificamente flavonóides e ácidos fenólicos (BARBOSA, 2009).

Estudos têm mostrado a predominância do isoflavonóide formononetina em amostras de própolis da variedade vermelha dos estados de Sergipe, Alagoas, Bahia e Paraíba. Esse isoflavonóide também está presente na soja através do seu metabólito, daidzeína, utilizado no tratamento de câncer de mama e próstata (MENDONÇA, 2011; MORAES, 2009).

López et al. (2014) em trabalho sobre caracterização de amostras de própolis vermelha, analisaram amostras de diferentes regiões, quatro brasileiras e uma cubana, e observaram como principais compostos: daidzeína, formononetina, biochanina A, pinocembrina. Quando as substâncias foram analisadas em alta resolução, apresentaram íons marcadores do grupo das benzofenonas (classe de filtro orgânico) em amostras de própolis vermelha de Alagoas.

Alguns dos constituintes químicos da própolis vermelha representados pelos flavonoides, isoflavonas são responsáveis pelo mecanismo antioxidante em uma unidade biológica. Esse fato estaria relacionado à capacidade desses constituintes protegerem o organismo vivo contra o estresse oxidativo que é capaz de iniciar danos celulares e desencadear o envelhecimento cutâneo, além de estar relacionado ao desenvolvimento de doenças crônicas como o câncer. Assim, à medida que tais agentes antioxidantes seriam capazes de neutralizar, eliminar, ou impedir a formação de espécies reativas de oxigênio, a

atividade desses compostos é marcada pela capacidade de prevenir alguns desequilíbrios biológicos (FROZZA et al., 2013).

A descrição de estudos mencionados nesse capítulo mostra a importância da própolis vermelha como modulador de algumas atividades biológicas, além de abordar a problemática dos efeitos da radiação solar, e assim, marca o interesse na investigação dos efeitos do EHPV como medida fotoprotetora.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento do estudo contou com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade Tiradentes – Aracaju/SE, com número do protocolo: 080514.

4.1 Obtenção e caracterização do extrato hidroalcolólico de própolis vermelha (EHPV)

4.1.1 Amostra

A própolis vermelha foi adquirida do apiário da Ilha do Porto (Ilha da Lagoa Manguaba), no Município de Marechal Deodoro, Estado de Alagoas (S 9°44'36, 84288" e O 35°52'3,632813"), a qual foi coletada no período de junho de 2011. A amostra foi então encaminhada ao Laboratório de Biomateriais – ITP (SE) e acondicionadas sob refrigeração.

4.1.2 Obtenção do Extrato Hidroalcolólico da Própolis Vermelha – EHPV

Dois gramas da amostra de própolis foi colocado em tubo de ensaio estéril com 25 mL de etanol a 70% e submetido ao aparelho de ultrassom durante 1 hora. Os extratos obtidos foram centrifugados a 1.800 x g por 15 minutos e os sobrenadantes deixados em capela de exaustão para completa evaporação do solvente e obtenção do extrato seco. O extrato seco foi pulverizado, armazenado em tubo de ensaio estéril com rosca e mantido sob refrigeração (MAIA-ARAÚJO et al., 2011)

4.1.3 Caracterização do EHPV

4.1.3.1 Flavonóides Totais

Foram adicionados volumes de 500 µL dos extratos (concentração de 20 mg/mL) a uma solução de 0,1 mL de nitrato de alumínio 10% e 0,1 mL de acetato de potássio 1 mol/litro, 2,8 mL de água destilada. O volume final foi completado para 5 mL com etanol a 95%. As amostras foram homogeneizadas e após 40 minutos, em temperatura ambiente, foi determinada a absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda igual a 415 nm. A análise foi realizada em triplicata. A quantificação de flavonoides foi determinada através de curva analítica de quercetina, com concentrações de 20 a 100 µg/mL dissolvida em

etanol, e os valores foram expressos em equivalentes de quercetina (mg de quercetina em 100 mg de amostra) (ADELMANN - 2005).

4.1.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do EHPV

A caracterização dos compostos presentes no EHPV foi realizada de acordo com método proposto por Sousa et al. (2007) com algumas adaptações. Para tanto foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu®, equipado com um desgaseificador DGU-20A3, um autosampler SIL-20A, duas bombas (A e B) LC-20AD, detector de arranjo de diodos SPD-M20Avp (DAD) com uma interface CBM-20A. Utilizou-se uma coluna analítica Phenomenex C18 de fase reversa de 250 x 4,6 mm (5 µm de tamanho de partícula). A taxa de fluxo foi de 1 mL/min, tempo de corrida de 45 minutos e o volume de injeção foi de 20 µL. O sistema gradiente de eluição foi realizado com uma fase móvel constituída de Metanol - grau HPLC, Merck, Darmstadt, Germany - (B) / água mili-q - Milli-Q system, Millipore, Bedford, MA, USA - (A) (v/v), iniciando com 40% de B e progredindo para 65% (após 24 minutos), 70% de B (35 minutos), 80% de B até os 45 minutos. As amostras de própolis foram solubilizadas em metanol na concentração de 0,2 mg/mL e filtradas em membrana PTFE 0.45 µm (Millipore-HVHP, MA, USA). A fim de determinar o percentual dos constituintes químicos, foram utilizados os dados de regressão linear obtidos por meio de curvas analíticas, as quais foram elaboradas a partir de padrões cromatográficos (formononetina, daidzeína, biochanina A) adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO).

4.1.3.3. Determinação do comprimento de onda máximo e da absorvância máxima do EHPV

Para determinação do comprimento de onda máximo ($\lambda_{max.}$) e da absorvância máxima ($\lambda_{max.}$), o extrato foi diluído em álcool etílico absoluto (50,0 mg/L; m/v) e realizada varredura entre os comprimentos de onda de 210 a 400 nm, para verificar a absorção nas regiões ultravioleta A, B e C (UVA, UVB e UVC). Foram realizados ensaios em triplicata, com utilização de álcool etílico absoluto como branco (MUNHOZ et al., 2012).

4.1.3.4. Atividade antioxidante

Para análise da atividade antioxidante do EHPV foram utilizados dois métodos indiretos, o método do radical DPPH e o do radical ABTS, estes têm como característica a reação de oxi-redução baseada na transferência de elétrons. De modo que a atividade do agente antioxidante é proporcional à mudança de cor da reação e consequente

concentração do antioxidante no meio reativo. Ambos os métodos são rápidos e práticos para testes de atividade antioxidante de produtos naturais, sendo que o método DPPH é voltado para análises de amostras que apresentam compostos antioxidantes solúveis em solventes orgânicos. Já o método ABTS é utilizado tanto para amostras lipossolúveis quanto hidrossolúveis.

4.1.3.4.1 Avaliação da atividade sequestrante de radical DPPH - 1,1-difenil-2-picrilidrazil)

A atividade antioxidante foi determinada utilizando a metodologia proposta por Brand-Willians; Cuvelier; Berset (1995) com algumas adaptações. Para tanto, a partir do preparo da solução estoque de DPPH 60M (2,4 mg de DPPH dissolvidos em 100 mL de metanol) foi preparada a solução de trabalho contendo a mistura de 30 µL das diluições do EHPV e 3 mL da solução de DPPH. A mistura foi incubada por 10 minutos no escuro para posterior leitura das absorbâncias a 520 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em mmol Trolox/g de massa fresca da amostra, e os ensaios foram realizados em triplicata.

4.1.3.4.2 Avaliação da atividade sequestrante de radical ABTS - 2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

A atividade antioxidante foi determinada a partir da proposta metodológica de Re et al. (1999) com algumas adaptações. A medida espectrofotométrica foi realizada a partir do resultado de captura do radical 2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) – ABTS pelo agente antioxidante. O radical $ABTS^+$ foi formado pela reação de ABTS (7 mM) com persulfato de potássio (concentração final 2,45 mM) e incubados à temperatura ambiente no escuro durante 12 horas. Uma vez formado o radical $ABTS^+$, este foi diluído em etanol para se obter um valor de absorvância de $0,7 \pm 0,01$ em 734 nm. 30 µL do EHPV foi adicionado a 3 mL da solução de $ABTS^+$ e a absorvância foi medida a 734 nm após 1 minuto. Foi usado Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico 97%, Aldrich Chemical Co., Gillingham, Dorset, UK) como antioxidante de referência. Os resultados foram expressos em valores de mmol Trolox/g de massa fresca da amostra.

4.2 Formulações cosméticas

4.2.1 Desenvolvimento e caracterização das formulações semissólidas contendo EHPV

Testes iniciais foram realizados de acordo com os itens 4.2.1.1, 4.2.1.2, 4.2.1.3, a fim de que fosse selecionada a forma farmacêutica (base em creme ou base em gel) para o presente estudo. Para tanto, elaborou-se ensaios com creme Polawax® e creme Lanette® e gel Aristoflex® AVC para testar a facilidade de incorporação do EHPV às essas bases, estabilidade (teste de centrifugação) da formulação e valor de FPS.

4.2.1.1 Incorporação do EHPV à base cosmética

Foram testadas concentrações iniciais de EHPV a 3,5% e 5,0%. Os extratos foram previamente solubilizados em propilenoglicol a fim de facilitar a incorporação às bases cosméticas.

4.2.1.2 Teste de centrifugação

Para o teste de estabilidade à centrifugação foram utilizadas alíquotas de 5 g de amostra, as quais dispostas em tubo de centrífuga graduado e submetidas à centrifugação na velocidade de 1.800 x g. O procedimento foi realizado em triplicata com três ciclos de 30 minutos para cada amostra (BRASIL, 2004). A seguir, avaliou-se visualmente qualquer sinal de instabilidade física da amostra (separação de fases, precipitação).

4.2.1.3 Determinação do Fator de proteção solar (FPS) *in vitro*

O FPS das formulações foi determinado de acordo com a metodologia *in vitro* proposta por Mansur et al.(1986), em que se utiliza um espectrofotômetro UV/VIS. As formulações cosméticas foram diluídas com etanol absoluto para uma concentração final de 0,2 mg/mL. As absorbâncias das soluções foram determinadas na faixa de 290 a 320 nm, com intervalos de 5 nm, sendo feitas três determinações para cada comprimento de onda. Como líquido de referência foi adotado o etanol absoluto. O cálculo do FPS é feito através da equação que se segue:

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

Onde: **FPS**: fator de proteção solar;

FC: fator de correção (=10), determinado de acordo com dois filtros solares de FPS conhecidos de tal forma que um creme contendo 8% de homossalato resultasse no FPS 4;

EE(λ): efeito eritemogênico da radiação de comprimento de onda (λ);

I(λ): intensidade da luz solar no comprimento de onda (λ);

Abs (λ): absorvância da solução da formulação contendo filtro solar no comprimento de onda (λ).

Para utilização de valores da relação do efeito eritemogênico (EE) *versus* intensidade da radiação (I), utilizam-se aqueles anteriormente calculados por Sayre et al. (1979) conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2. Função do produto normalizado utilizado no cálculo do FPS (SAYRE et al., 1979)

λ (nm)	EE (λ) x I (λ)
290	0,015
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,018
Σ	1,0002

A partir dos testes iniciais desenvolvidos com as diferentes bases, foram elaboradas formulações em creme Lanette® nas concentrações de a 1,5%, 2,5% e 3,5% de EHPV (tabela 3) e determinado os valores de FPS dessas formulações de acordo com o item 4.3.1.3.

Tabela 3. Composição qualitativa e quantitativa das formulações cosméticas contendo EHPV.

Componentes	Emulsão (1,5%)	Emulsão (2,5%)	Emulsão (3,5%)
Lanette N	8	8	8
Oleato de decila	5	5	5
Butil-hidroxitolueno	0,05	0,05	0,05
Propilenoglicol	10	10	10
Ácido sórbico	0,1	0,1	0,1
EHPV	1,5	2,5	3,5
EDTA	0,1	0,1	0,1
Água destilada (qsp)	100	100	100

4.3 Modelo de avaliação da atividade fotoprotetora *in vivo*

4.3.1 Animais

Os experimentos foram realizados com ratos Wistar machos adultos (com peso de 250-300g) provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes/SE. Os animais foram alojados em ambiente de temperatura controlada (22 ± 2 °C), 35% de umidade, com um ciclo claro/escuro de 12 h de luz. Eles receberam água e dieta padrão Labina® (Purina, São Paulo, Brasil) *ad libitum*. Os animais foram habituados à sala experimental durante pelo menos 30 minutos antes dos experimentos, os quais foram realizados de acordo com diretrizes éticas. Foram utilizados 18 animais, subdivididos aleatoriamente em 6 grupos (n=6) de tratamento individuais, de modo em cada grupo de seis animais foram testados dois grupos experimentais em áreas dorsais diferentes (Figura 5). Os grupos experimentais foram: Irradiado sem Proteção, Creme Lanette®, Creme Padrão comercial – Oxibenzona 6% Formulação com EHPV a 1,5%, 2,5% e 3,5% - EHPV 1,5% EHPV 2,5%, EHPV 3,5%, respectivamente). Um estudo piloto utilizando 3 animais (sem proteção e tratado com EHPV3,5%) foi conduzido para avaliar possíveis reações alérgicas ou manchas na pele produzidas pela formulação. O protocolo foi seguido da mesma forma descrita anteriormente, porém os animais não receberam irradiação.

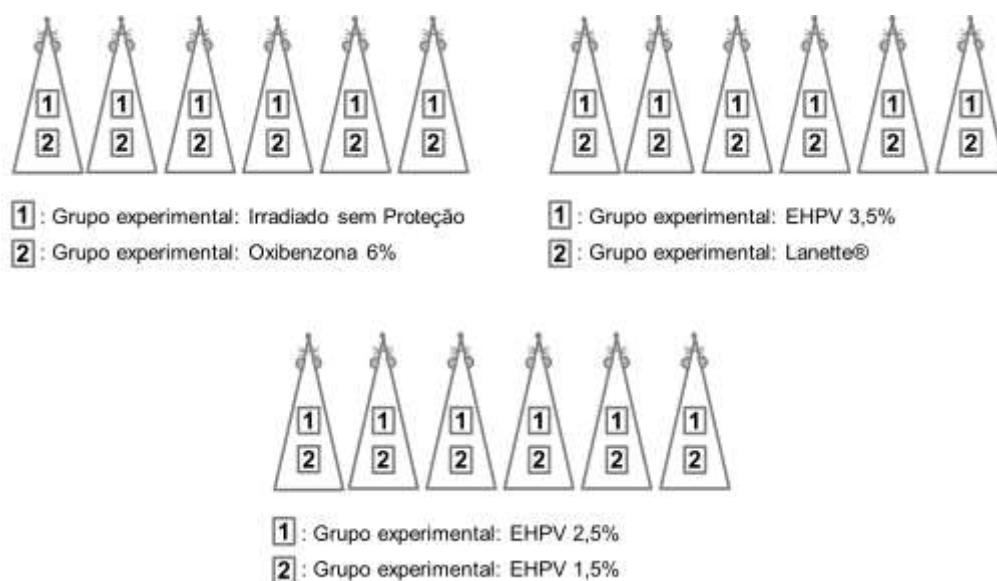


Figura 5. Representação esquemática da distribuição dos grupos experimentais estudados.

4.3.2 Delineamento experimental

Os animais foram submetidos à irradiação UVB uma vez por dia, 1h/dia, durante seis dias de tratamento. A área dorsal dos animais foi previamente tricotomizada e delimitada uma área de 2 cm² para a administração de 0,1g de formulação 30 minutos antes do procedimento de irradiação UVB. A dose do extrato na formulação utilizada foi norteadada a partir de um trabalho anterior o qual pretendeu desenvolver formulações tópicas acrescidas de extrato de própolis (MARQUELE-OLIVEIRA, et al., 2007). Como controle negativo, foi utilizado creme base Lanette® e como positivo, a oxibenzona 6% em grupo de animais. Após os seis dias de experimento, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ (Insight, Ribeirão Preto, SP – fluxo contínuo de 100% de CO₂ por 50 min), e removida a área dorsal em estudo a fim de que seja submetida à análise.

4.3.3 Modelo de irradiação UVB

O modelo de irradiação UVB foi realizado como descrito anteriormente por Bishop et al. (2007). A fonte de radiação UVB é proveniente de uma lâmpada Philips TL40W/12 RS montada a 20 cm acima da área a ser irradiada nos ratos. A fonte emite um espectro de luz contínua entre 270 e 400 nm com um pico de emissão em 313 nm. A saída total de UVB foi monitorada antes de cada exposição com um radiômetro. A taxa de irradiação UVB foi de 0,45 mW/cm². A dose de irradiação foi de 1,6 J/cm², estabelecida em: Dose (mJ/cm²) = tempo de exposição (s) x intensidade (mW/cm²). Antes dos experimentos, os ratos foram

anestesiados com quetamina/xilazina em dose única de injeção por via intraperitoneal e, em seguida, a área dorsal foi exposta a irradiação UVB.

4.4.4. Quantificação da cor da Pele

A cor da pele foi quantificada através do uso de um colorímetro portátil (Chroma Meter CR-400, Minolta Camera Co. Ltda., Osaka, Japão) durante os sete dias de experimento, antes da realização do ensaio de irradiação. A intensidade de eritema foi expressa como o aumento da variável Δa^* , a qual quantifica o intervalo de cor do tom vermelho, além da variável ΔE^* que estabelece a diferença total da cor na amostra. A medição ocorreu pelo sistema colorimétrico adotado pelo CIE (Commision Internationale de l'Eclairage, 1931) que definiu como a função de correspondência de cor e que apresenta vantagem da percepção de cor não vista pelo olho humano.

4.4.5. Estudo histopatológico

Os espécimes teciduais foram fixados em formol tamponado (10%, pH 7,4) por 24 h, desidratados em soluções crescentes de álcool etílico e diafanizados em xilol, para posterior impregnação e inclusão em parafina. Em seguida, foram obtidas cinco secções histológicas seriadas de 5 μ m de espessura de cada amostra, que foram submetidas à coloração de rotina pela Hematoxilina/Eosina.

Para o estudo histopatológico, foi realizado um estudo descritivo das características citomorfológicas e arquiteturais do tecido epitelial pavimentoso estratificado de revestimento cutâneo (epiderme) e do tecido conjuntivo que compõe a derme superficial (derme papilar) e profunda (derme reticular). As variáveis analisadas na epiderme e derme estão descritas na tabela 4.

Tabela 4: Variáveis morfológicas analisadas para o estudo histopatológico descritivo das características citomorfológicas e arquiteturas dos tecidos epidérmicos e dérmicos das amostras de pele dos animais submetidos a irradiação UVB.

Epiderme	Derme
Espessamentos epiteliais (acantose e hiperplasia)	Edema intersticial
Hiperqueratose	Hiperemia
Formação de crostas	Hemorragia
Formação de vesículas intraepiteliais	Infiltração inflamatória
Formação de corpos apoptóticos (células “sunburn”)	Degeneração basofílica das fibras colágenas
Infiltração inflamatória intraepitelial	
Edema intracelular (degeneração vacuolar hidrópica)	
Edema intercelular (espongiose)	

4.4.6. Estudo histomorfométrico

As secções histológicas coradas em Hematoxilina e Eosina foram submetidas à análise morfométrica a partir da captura aleatória de cinco campos (aumento de 10X), de toda extensão da epiderme a qual foi registrada com uma câmera fotográfica acoplada a um microscópio de luz Óptico Olympus CX3. A seguir, foram realizadas medidas da espessura da epiderme utilizando o software EARP, após prévia calibração do programa por meio de uma escala de padronização de 50 μm^2 . Os valores da área epitelial obtidos para cada grupo foram expressos em μm^2 .

4.4.7. Atividade da Mieloperoxidase (MPO)

A migração de leucócitos para a pele induzida por UVB foi avaliada através de ensaio colorimétrico cinético-MPO como descrito anteriormente por Casagrande et al. (2006) e Bradley et al. (1982). As amostras de pele foram coletadas em 1mL de tampão K_2HPO_4 50 mM (pH 6,0) contendo 0,5% de HTAB (Brometo de Hexa-1,6-bisdeciltrimetilamônio – Sigma Aldrich) e homogeneizadas usando Tissue-Tearor (Biospect). Após esse preparo os homogeneizados foram centrifugados a 16.100g durante 2 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido para ensaio. Assim, 30 μL de amostra foi misturada a 200 μL de tampão K_2HPO_4 0,05M (pH 6,0), contendo 0,0167% de o-dianisidina dicloridrato e 0,05% de peróxido de hidrogênio. Foi realizada leitura da absorbância após 5 minutos a 450 nm. A atividade da MPO nas amostras foi comparada com uma curva padrão de neutrófilos. Os

resultados foram apresentados como atividade de MPO (número de neutrófilos totais/mg de tecido).

4. 5 Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados através de teste paramétrico, análise de variância ANOVA em duas vias seguido de teste de Tukey, de modo que os resultados foram considerados significativos quando a probabilidade for inferior a 5% ($p < 0,05$). A avaliação estatística dos resultados fez uso do programa Prism 5.0

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização do EHPV

5.1.1. Rendimento da extração e teor de flavonóides

Os resultados da análise da amostra de própolis vermelha brasileira revelaram um rendimento de 46% e um teor de flavonóides de $3,8 \pm 0,4\%$. Esses percentuais foram considerados altos em relação aos valores mínimos de 11% para rendimento e 0,25% para teor de flavonóides preconizados pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2001). No entanto, deve ser destacado que tais dados foram definidos para variedades de própolis em geral, não sendo específicos para a própolis vermelha.

Alguns trabalhos com a própolis verde brasileira têm demonstrado valores médios de teor de flavonóides inferior aos apresentados pela própolis vermelha brasileira. Sousa et al. (2007) encontraram valores que variaram entre 1 e 2 %, Cavalcante et al. (2011), 0,95%, e Batista et al. (2012) observaram valores de 4,5% para verde e 5,92% para a vermelha. A variação da composição química entre as amostras de própolis verde e vermelha e consequentemente o teor de flavonóides pode estar relacionada a vários fatores, como vegetação, região, condições utilizadas no processamento da amostra, sazonalidade (NASCIMENTO et al., 2008).

5.1.2. Análise cromatográfica

Diversos trabalhos com o objetivo de elucidar a composição química da própolis vermelha tem demonstrado um perfil químico diferente das variedades de própolis estudadas até a última década (ALENCAR et al., 2007; RIGHI et al., 2011; Lopez et al., 2014).

A análise cromatográfica do EHPV revelou seis picos (P) majoritários com boa separação e resolução cromatográfica (Figura 6). Os compostos representados pelos picos P1, P2, P3, P4, P5 e P6 apresentaram tempos de retenção de 16, 25, 26, 26,5, 27 e 38 minutos, respectivamente. P1, P2 e P5 foram identificados utilizando substâncias padrões consideradas marcadores da própolis vermelha (Lopez et al., 2014). Estes padrões foram quantificados através de curvas de calibração tendo como resultado P1 - daidzeína (0,0285 mg/mg), P2 - formononetina (0,0405 mg/mg) e P5 - biochanina A (0,0325 mg/mg). Lopez et al. (2014) sugeriram através da técnica de UPLC-ESI-MS/MS (cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada com detecção por espectrometria de fragmentação de massa) que um novo composto identificado na própolis vermelha alagoana, além dos marcadores

utilizados acima, seriam benzofenonas preniladas (xantochimol e oblongifolin A). Estes padrões não estão disponíveis comercialmente para a tentativa de elucidação dos demais picos.

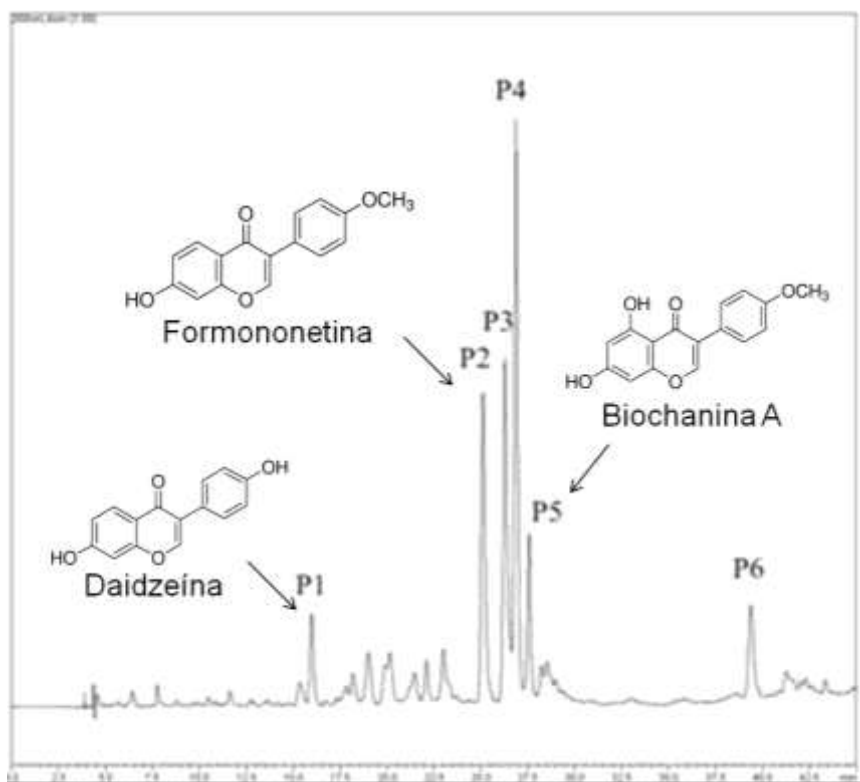


Figura 6. Cromatograma da própolis vermelha alagoana.

5.1.3. Determinação do comprimento de onda máximo de absorção no espectro de UV.

A leitura espectrofotométrica do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha revelou dois picos, sendo um no comprimento de onda 239 nm, região ultravioleta C, e outro em 283 nm, região ultravioleta B, conforme demonstrado na Figura 7. Esse resultado mostra um potencial efeito fotoprotetor do extrato de própolis vermelha frente às radiações ultravioleta, possivelmente pela presença de flavonóides, e confirma a assertiva de que quando dispersos em etanol, esses componentes químicos são capazes de revelar dois picos de absorção, um na região UVC e outro na região UVB (VIOLANTE et al., 2009). A formononetina, um dos principais marcadores da própolis vermelha apresenta, segundo Srivastava et al. (2015), picos de absorção na região do UV quando dissolvida em solução metanólica.

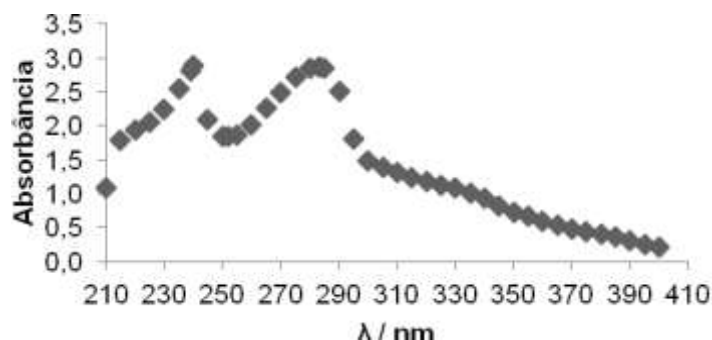


Figura 7. Perfil de absorção das moléculas contidas em solução hidroalcoólica de extrato hidroalcoólico de própolis vermelha a 50,0 mg/L na região do ultravioleta.

5.1.4. Atividade Antioxidante

Os métodos DPPH e ABTS baseiam-se em mecanismos de redução de radicais livres na presença de um agente antioxidante, desse modo um composto que apresente alta ação antioxidante promoverá mudanças na coloração do meio que apresenta determinada concentração de oxidantes, e ao ser realizada leitura espectrofotométrica produzirá valores indicativos do grau de redução das espécies reativas (BENZIE et al., 1999).

A análise da atividade antioxidante do EHPV revelou 3,07 mmol Trolox/g e 2,13 mmol Trolox/g para os métodos do DPPH e ABTS, respectivamente. A ação antioxidante do EHPV deve-se provavelmente à ação sinérgica dos compostos identificados nesse estudo (formononetina, biochanina A, daidzeína) (PARK et al., 2008). De acordo com estudo de Pietta (2000) a formononetina, a biochanina A e daidzeína apresentam separadamente valores de 0,11 mmol Trolox/g, 1,16 mmol Trolox/g e 1,25 mmol Trolox/g respectivamente. Essas isoflavonas são encontradas na natureza em plantas e alimentos como as leguminosas, e através da ação biológica, tais substâncias orgânicas podem atuar como agentes antioxidantes protegendo as células do estresse oxidativo (MITCHELL et al., 1998; BOADI et al., 2005).

5.2. Incorporação do EHPV em formulações cosméticas

5.2.1. Seleção da base cosmética

O EHPV pode ser incorporado nas formulações à base de Lanette®, Polawax® e Aristoflex® até a concentração de 3,5% (m/m). Concentrações superiores a esta mostraram-se inviáveis. O Creme Polawax®, apesar de apresentar facilidade de incorporação do EHPV, apresentou instabilidade física, com separação de fases, após o teste de

centrifugação. Em relação ao FPS, a formulação a base de creme Lanette® apresentou o maior valor, possivelmente devido a melhor dispersão das moléculas incorporadas (Tabela 5).

Tabela 5: Análise do EHPV em diferentes formas farmacêuticas.

Formulação		Miscibilidade (incorporação)		Separação de Fase	FPS
		EHPV 3,5%	EHPV 5%	EHPV 3,5%	EHPV 3,5%
Creme	Polawax®	S	N	S	nd
	Lanette®	S	N	N	1,24
Gel	Aristoflex® AVC	S*	N	N	0,60

N: não S: sim *com dificuldade nd: não determinado

A partir da triagem realizada para selecionar a base a ser trabalhada nesse estudo os resultados dos testes conduziram a escolha da base Lanette® por apresentar melhor estabilidade, incorporação do EHPV e valor de FPS.

A Figura 8 ilustra a aparência das formulações em creme Lanette® (Figura 8A), a qual mostrou facilidade para incorporação do EHPV devido à presença de fase oleosa na constituição da base, favorecendo a interação com os compostos lipossolúveis presentes no EHPV. A Figura 8B refere-se à base gel, a qual apresentou maior dificuldade para incorporação do EHPV devido à característica hidrofílica da dispersão polimérica. As isoflavonas presentes na própolis vermelha apresentam coeficiente de partição O/A maior que 3,0, indicando a escolha de formulações tipo emulsões para incorporação da mesma. O extrato apresenta constituintes hidrofóbicos dificultando a dispersão desses elementos na formulação. Bittencourt et al. (2014) demonstraram que o creme Lanette® apresentou-se como o excipiente de escolha para incorporação do extrato de própolis vermelha.

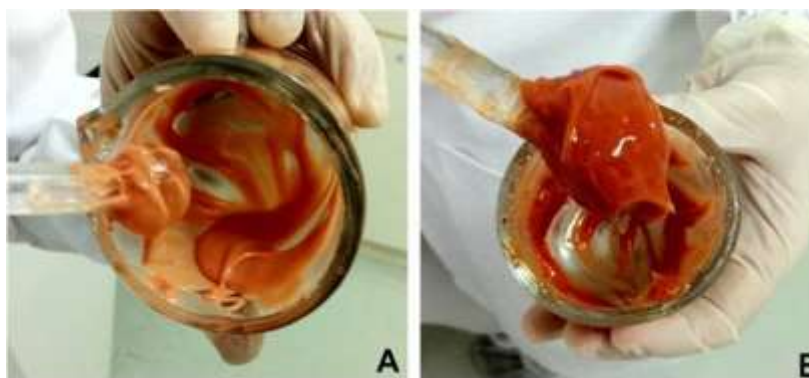


Figura 8. (A) Formulação cosmética em creme Lanette® com EHPV 3,5% (m/m). (B) Formulação cosmética em gel Aristoflex® com EHPV 3,5% (m/m).

5.2.2. Determinação do FPS *in vitro* das formulações a base de Lanette®

A figura 9 mostra os valores de FPS das formulações em base creme Lanette® contendo EHPV 1,5%, EHPV 2,5%, EHPV 3,5% e oxibenzona 6 %.

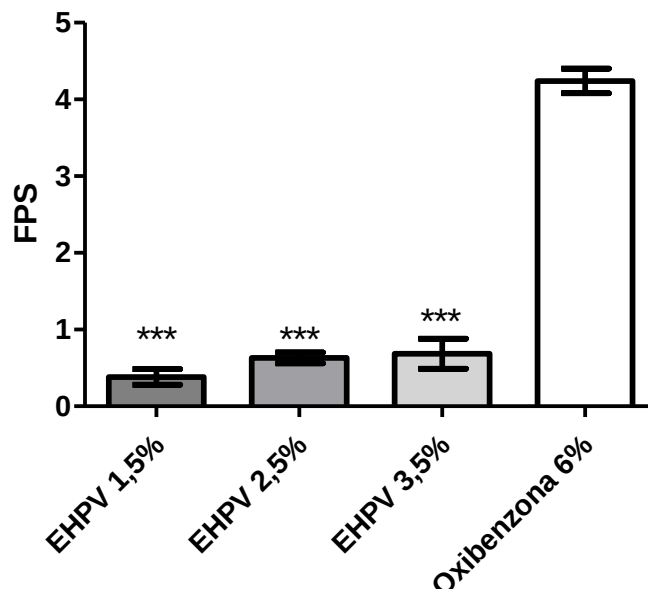


Figura 9. Fator de proteção solar em formulação cosmética elaborada com EHPV e oxibenzona na forma farmacêutica creme Lanette®. ***Diferença significativa em relação à Oxibenzona 6% ($p < 0,001$).

Os dados em estudo sugerem que o baixo valor de FPS para as amostras contendo extrato de própolis vermelha esteja relacionado com a concentração de moléculas com atividade absorvedora de RUV. O EHPV é composto por uma mistura de substâncias, as quais podem ou não possuir capacidade de absorção da RUV (BOBIN et al., 1994).

Além disso, a incorporação de EHPV em concentrações maiores que 3,5% nestas formulações apresenta limitações farmacotécnicas, devido à baixa solubilidade do extrato. Desta forma, a comparação direta com a formulação contendo 6% de oxibenzona fica dificultada, uma vez que as formulações contendo EHPV apresentam as concentrações de substâncias ativas diminuídas em relação ao filtro controle, gerando assim a menor possibilidade de absorção de radiação e consequentemente FPS baixo.

5.3. Ensaio biológico

5.3.1. Avaliação macroscópica dos efeitos fotoprotetores do EHPV em modelo *in vivo*

A Figura 10 ilustra que, a partir de 96 h, houve alteração na tonalidade da cor (ΔE) da pele dos animais irradiados, expressa por um aumento progressivo da vermelhidão (Δa), nos animais dos grupos controle (irradiado sem proteção e Lanette®). Outros estudos também relataram mudanças na cor da pele de animais em intervalo de tempo semelhante após irradiação por UVB (AKTER et al., 1998; PARK; SUH; YOUN, 2008), atestando a eficiência do modelo utilizado para indução de eritema. Todos os grupos tratados com EHPV e oxibenzona 6% exibiram variações significativamente menores na tonalidade vermelha ($p < 0,001$), sugerindo que as formulações a base de própolis vermelha utilizadas neste estudo foram capazes de prevenir a formação do eritema de maneira semelhante ao filtro químico padrão (oxibezona 6%). A justificativa para estes achados parece residir na atividade biológica dos compostos químicos presentes no extrato, uma vez que estudos prévios realizados por Lin et al. (2008) demonstraram que as isoflavonas formononetina, daidzeína e biochanina A, todas identificadas na amostra utilizada no presente trabalho, foram capazes de inibir com eficiência a formação de eritema induzido por UVB.

Pode-se observar também, que apesar da formulação apresentar coloração vermelha devido à presença de EHPV, a pele dos animais não foi manchada ou pigmentada pela formulação após 6 dias de aplicação, permanecendo com a coloração da pele semelhante à dos animais que receberam o tratamento com a formulação de oxibenzona, que não possui cor vermelha.

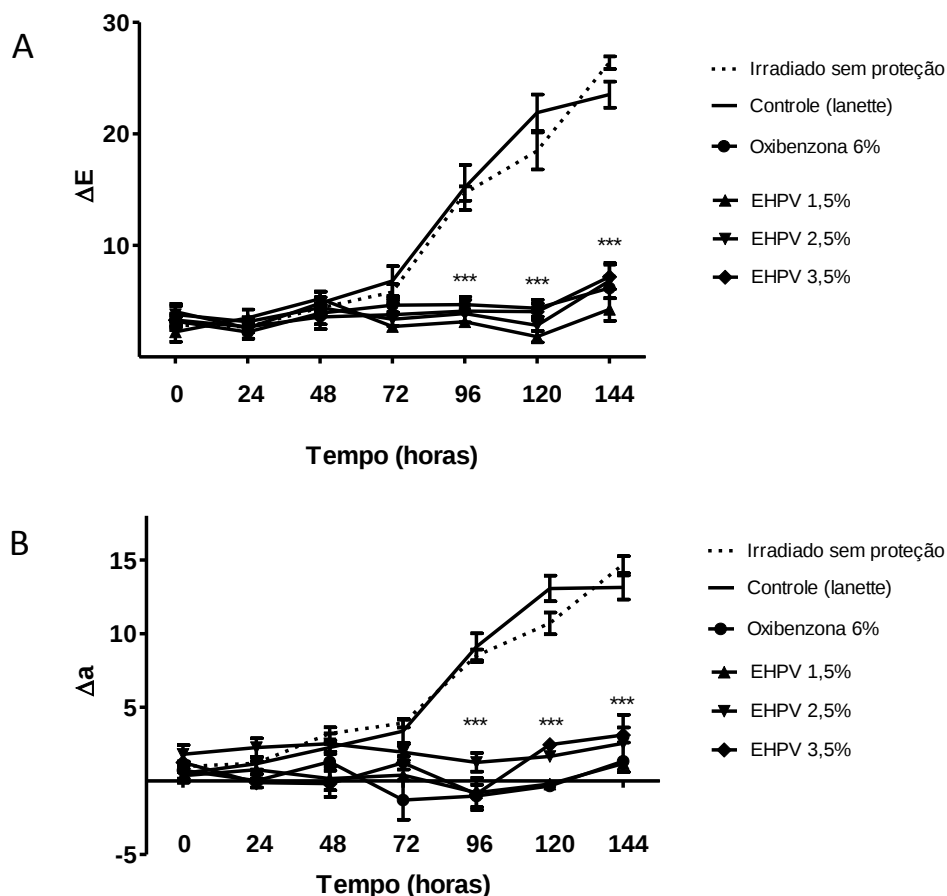


Figura 10. Medidas colorimétricas em diferentes tempos em função do tratamento.

(A) Diferença total de cor na amostra - ΔE , (B) Variação na tonalidade de cor vermelha - Δa .

***Diferença significativa em relação aos grupos Controles Irradiado sem proteção e Lanette® ($p < 0,001$).

Conforme pode ser observado na figura 11, a irradiação da pele dorsal dos animais do grupo sem proteção e do grupo Lanette® promoveu alterações macroscópicas compatíveis com queimaduras de segundo grau severas, expressas pela formação de espessa crosta superficial, edema e intenso eritema. Esses achados também foram descritos em estudos prévios e representam a expressão clínica da lesão por radiação UVB (DELICONSTANTINOS; VILLIOTOU; STRAVRIDES, 1995; CARINI et al. 2000; CAMPANINI et al., 2013). A utilização da formulação a base de EHPV 2,5% e 3,5%, bem como a Oxibenzona 6%, em área irradiada foram capazes de preservar o tecido cutâneo dos danos macroscópicos decorrentes da exposição à luz UVB. A formulação a base de EHP 1,5% inibiu o desenvolvimento de eritema, mas ainda foram observadas algumas formações papilomatosas, irregulares e de aspecto crostoso na superfície cutânea. Estes dados corroboram aqueles obtidos anteriormente neste estudo por meio da análise colorimétrica cutânea, e sugerem atividade fotoprotetora das formulações, particularmente nas concentrações mais elevadas avaliadas no presente trabalho. Além disso, ausência de

outros sinais clínicos como edema e fibrose, que surgem tipicamente em quadros de hipersensibilidade ao uso de produtos tópicos (CHOULIS, 2014), é fortemente sugestiva de baixa toxicidade do produto testado.

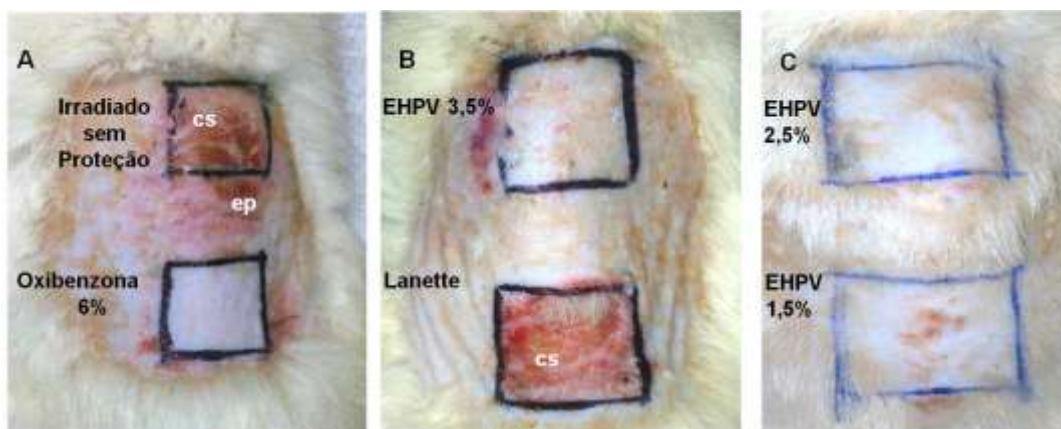


Figura 11 Ausência de alterações macroscópicas na pele dos animais irradiados, mostrando semelhança clínica entre as áreas tratadas com a formulação à base de Oxibenzona 6% **(A)** EHPV a 3,5% **(B)** e 2,5% **(C)** e alterações naqueles onde não foi utilizado qualquer produto (Irradiado sem Proteção) **(A)** e no grupo controle Lanette® **(B)**. Observar eritema periférico (ep) nas margens da área fotoprottegida. Observar controle irradiado sem proteção da área irradiada apresentando formação de espessa crosta superficial (cs) e eritema.

5.3.2. Avaliação histológica dos efeitos do EHPV em modelo *in vivo*

A análise histológica dos tecidos dérmicos mostrou similaridade nos achados morfológicos entre os grupos não irradiados com e sem a formulação testada (Figura 12). De modo geral, a epiderme se apresentou delgada e ortoqueratinizada, com discretos focos de espessamento. O tecido conjuntivo do cório dérmico apresentou intensa deposição de feixes grosseiros e entrelaçados de fibras colágenas de comprimento variado, alguns vasos sanguíneos e presença de constituintes celulares interpretados como fibroblastos, escassos linfócitos e ocasionais macrófagos. Os fâneros cutâneos derivados da epiderme exibiam características usuais em quantidade e distribuição. Esses achados histomorfológicos são corriqueiramente descritos como compatíveis com a normalidade (ENZINGER; WEISS, 1988) e sugerem que a utilização tópica do EHPV na concentração mais alta não promoveu sinais morfológicos de toxicidade.

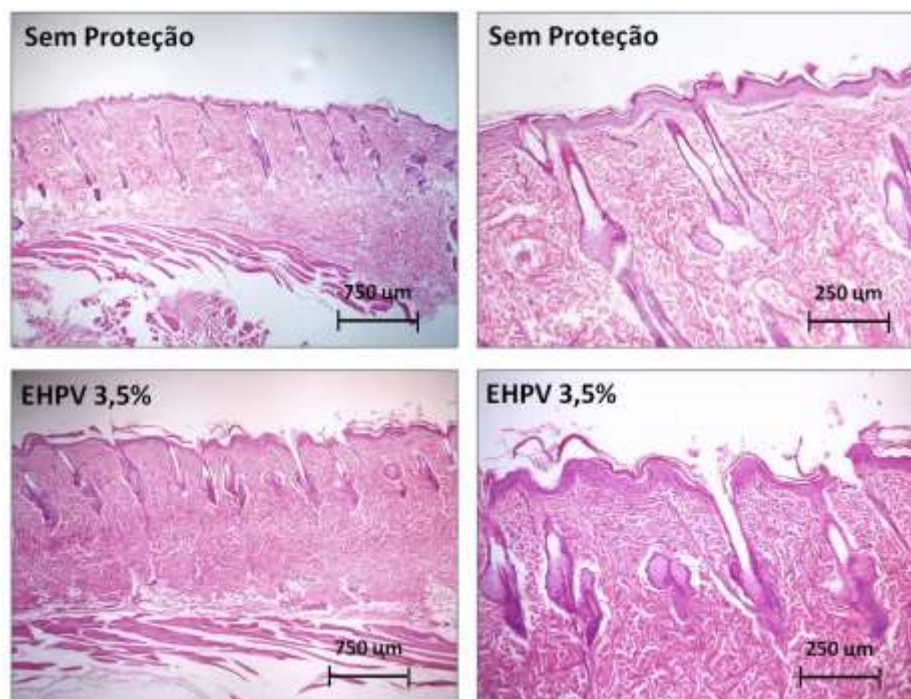


Figura 12. Secções histológicas coradas em hematoxilina-eosina mostrando tecidos dermoepidérmicos com características usuais, consistentes com quadro de normalidade em animais não irradiados Sem Proteção e com não irradiados com formulação à base de EHPV a 3,5 %.

A análise histológica das amostras de pele obtidas do grupo sem proteção e grupo Lanette® submetidos à irradiação com luz UVB conduziu a identificação de extensas alterações morfológicas nos tecidos dermoepidérmicos (Figura 13). Assim, observou-se marcante espessamento epidérmico, edema intracelular proeminente de queratinócitos, formação de vesículas intraepiteliais contendo material eosinofílico amorfo de aspecto seroso, aumento substancial na formação de corpos apoptóticos (estruturas celulares apresentando intensa eosinofilia citoplasmática e picnose nuclear, interpretadas como células “sunburn”), hiperqueratose e formação de crostas contendo grande quantidade de restos de neutrófilos. O tecido conjuntivo subepidérmico (derme papilar) apresentou sinais de infiltração inflamatória subaguda (representada por linfócitos, macrófagos e neutrófilos), edema intersticial e degeneração basofílica das fibras colágenas. Na derme reticular, evidenciou-se infiltração inflamatória de moderada a intensa e hiperemia, que se estendia até a hipoderme. Todas essas alterações morfológicas são consistentes com danos teciduais cutâneos induzidos por UVB, conforme previamente descrito por Filip et al. (2011) e Serafini et al. (2014).

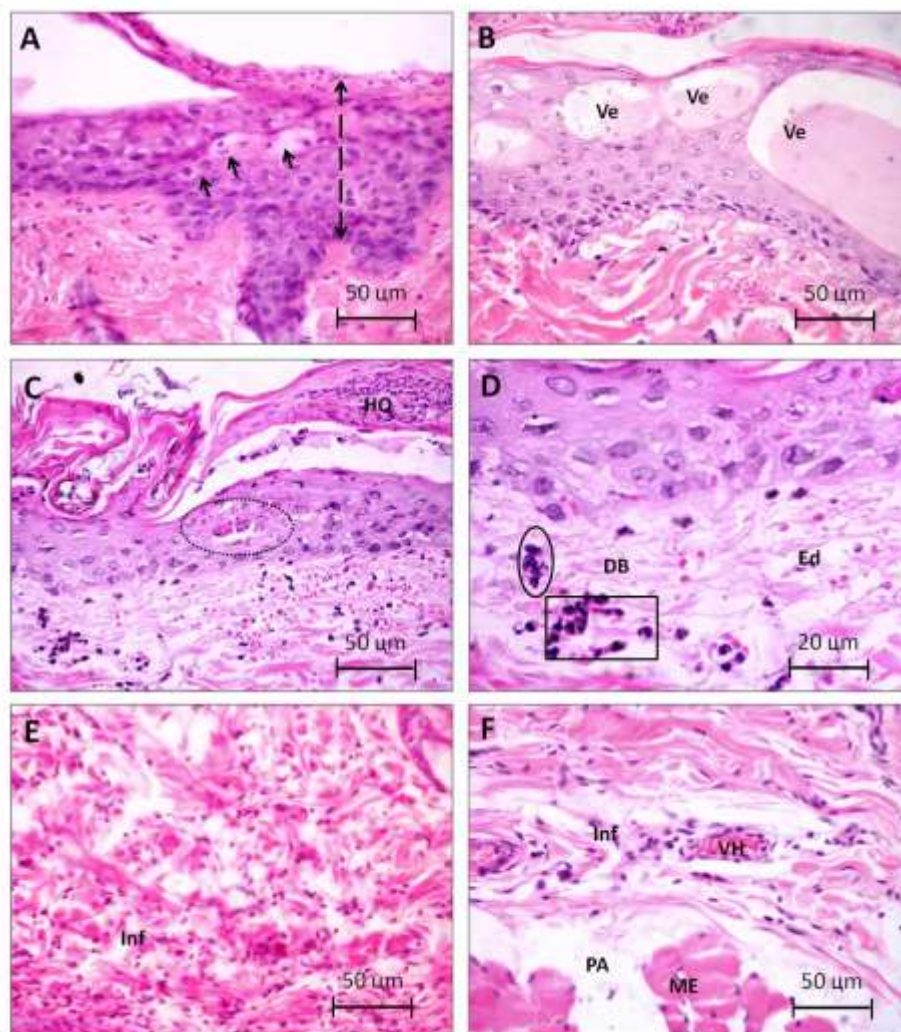


Figura 13. Secções histológicas coradas em hematoxilina-eosina mostrando alterações morfológicas dermoepidérmicas observadas induzidas por irradiação UVB. **(A)** Espessamento epidérmico (seta dupla tracejada) e edema intracelular de queratinócitos (setas). **(B)** Formação de vesículas intraepiteliais (Ve) contendo material eosinofílico de aspecto seroso no seu interior. **(C)** Hiperqueratose e formações crostosas contendo restos de neutrófilos (HQ), corpos apoptóticos interpretados com células “sunburn” (círculo tracejado). **(D)** Maior detalhe da região subepitelial (derme papilar) da figura anterior destacando as áreas de edema intersticial (Ed), degeneração basofílica das fibras colágenas (DB) e infiltração inflamatória por neutrófilos (quadrado) e linfócitos (círculo). **(E)** Infiltração inflamatória (Inf) presente na derme reticular profunda. **(F)** Infiltração inflamatória (Inf) no limite da hipoderme, destacando as fibras musculares estriadas esqueléticas (ME) e o pânículo adiposo (PA) hipodérmico.

No grupo onde foram utilizadas as formulações à base de EHPV a 2,5% e 3,5% (Figura 14), os aspectos morfológicos foram bastante semelhantes ao grupo Oxibenzona 6% (filtro químico padrão) e aos grupos não irradiados (estudo piloto), tendo sido notadas apenas algumas áreas de discreta infiltração inflamatória mononuclear (linfocitória) e focos de hiperemia capilar. De especial interesse foi a inibição do expressivo espessamento epidérmico nos grupos tratados topicamente com EHPV e Oxibenzona 6%, mas notadamente observado no grupo sem proteção e Lanette® (Figura 15). Esse efeito

hiperplásico UVB-induzido também foi descrito por outros autores, como Campanini et al. (2013) e Serafini et al. (2014) e sua inibição parece ser um indicador importante de fotoproteção cutânea. Esses achados sugerem que estas formulações a base de EHPV (2,5% e 3,5%) desempenham um importante papel fotoprotetor contra danos teciduais induzidos por radiação UVB, comparável ao filtro solar químico padrão. No grupo EHPV 1,5%, apesar dos achados dérmicos terem sido semelhantes aos demais, a epiderme mostrou sinais de espessamentos focais, formando pequenas projeções papilíferas exofíticas, corroborando os dados obtidos na análise macroscópica anterior, sugerindo que a concentração mais baixa teve menor efeito fotoprotetor que aquelas mais altas.

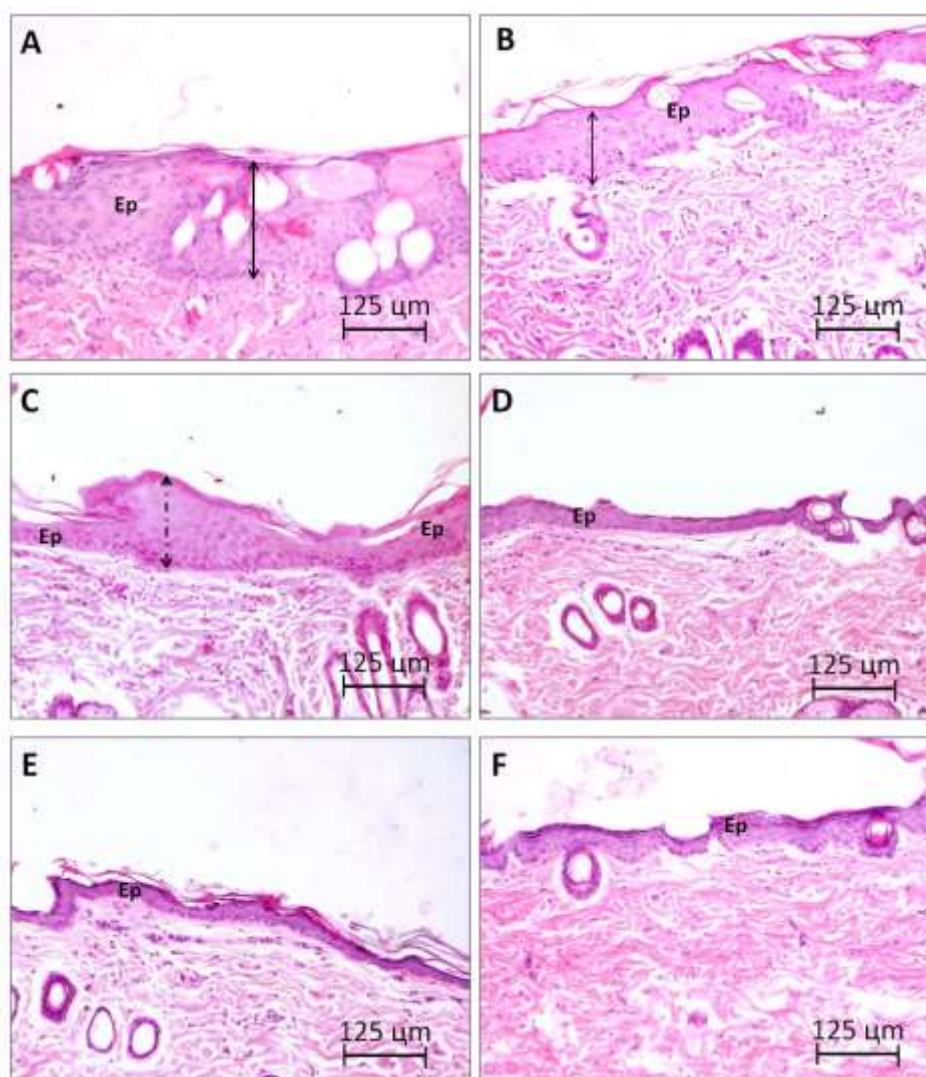


Figura 14. Secções histológicas coradas em hematoxilina-eosina dos grupos estudados destacando a epiderme (Ep). **(A)** Grupo sem proteção e **(B)** o grupo Lanette®, ambos exibindo marcante espessamento epidérmico (setas duplas contínuas). **(C)** Grupo EHPV 1,5% mostrando espessamentos exofíticos focais (seta dupla tracejada). **(D)** Grupo EHPV 2,5%, **(E)** EHPV 3,5% e **(F)** Oxibenzona 6% apresentando epiderme mais delgada, com características próximas as da normalidade.

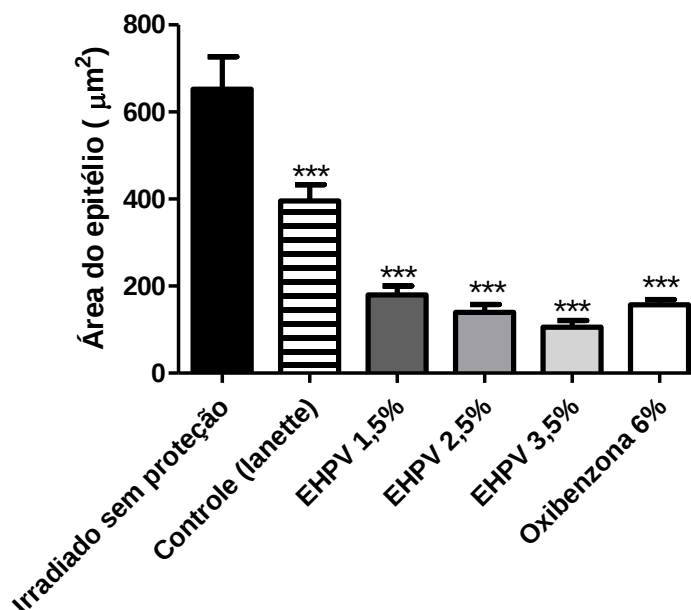


Figura 15. Medida da área epitelial dos grupos experimentais irradiados com UVB (**P<0,001) em comparação com os grupos irradiados tratados e não tratados com formulações fotoprotetoras.

A análise histopatológica sugere fortemente que a administração tópica do EHPV exerceu função fotoprotetora, inibindo o desenvolvimento das alterações morfológicas e arquiteturais tipicamente evidenciada nos grupos sem proteção ou protegidos apenas com o veículo (Lanette®). Vários estudos avaliando a atividade fotoprotetora de extratos de produtos naturais vêm sendo realizados nos últimos anos e os autores têm procurado estabelecer uma possível relação entre esta atividade biológica e os efeitos anti-inflamatório e antioxidante dos produtos testados (BOLFA et al., 2013; YIN et al., 2013; SERAFINI et al., 2014).

5.3.3. Atividade da MPO (Mieloperoxidase)

A MPO é uma enzima encontrada abundantemente nos grânulos primários dos neutrófilos que participa na geração de radicais livres associados à oxidação de compostos endógenos e a sinalização de eventos inflamatórios (KLEBANOFF, 2005). Assim, esta enzima constitui um importante marcador de intensidade da resposta inflamatória aguda em um órgão ou tecido alvo diante de uma injúria. No presente estudo, a irradiação UVB no grupo sem proteção e no grupo Lanette® aumentou significativamente a atividade de MPO quando comparado aos grupos tratados com as formulações contendo EHPV e Oxibenzona 6% ($p<0,001$) (Figura 16). Portanto, é possível sugerir que a redução nos teores de MPO reflita diretamente uma possível ação anti-inflamatória mediada pela inibição no

recrutamento de neutrófilos para o sítio de injúria tissular provocada por irradiação UVB (WITKO-SARSAT et al., 2000; CAMPANINI et al., 2013; CHIARI et al., 2014). Esta atividade biológica pode ser justificada pela presença dos compostos químicos no extrato que modulam a resposta inflamatória. Ma et al. (2013) demonstraram que a formononetina é capaz de promover redução significativa nos níveis de MPO em modelo de injúria pulmonar induzida por lipopolissacarídeo (LPS) enquanto Wang et al. (2014) relataram que a Biochanina A induz a redução significativa da MPO e da resposta inflamatória em modelos de isquemia reperfusão cerebral.

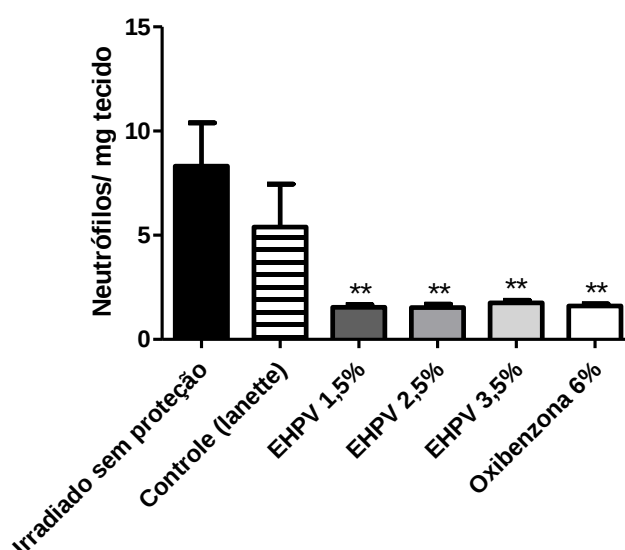


Figura 16. Atividade de MPO em grupos experimentais irradiados com UVB (** $p < 0,01$) em comparação com os grupos irradiados tratados e não tratados com formulações fotoprotetoras.

Entre os mecanismos fisiopatológicos associados ao dano tissular induzido por UVB, podem ser destacadas a atividade aumentada da MPO secundária ao recrutamento de neutrófilos (resposta inflamatória aguda) e a formação de radicais livres capazes de induzir estresse oxidativo aos tecidos (CAMPANINI et al., 2013). Como foi observado no presente estudo, o EHPV reduziu significativamente os níveis de MPO e apresentou alta atividade antioxidante, assim é possível sugerir que a atividade fotoprotetora do extrato poderia ser secundária a ação anti-inflamatória e a atividade sequestrante de radicais livres do mesmo.

Em uma análise geral, os resultados obtidos neste estudo sugerem que o extrato hidroalcoólico da própolis vermelha alagoana apresenta atividade fotoprotetora em modelo murino. Além disso, os dados obtidos nos ensaios *in vitro* e *in vivo* parecem sugerir que esta atividade fotoprotetora poderia estar mais relacionada ao potencial anti-inflamatório e antioxidante da combinação de compostos químicos (isoflavonas) presentes no extrato do que a fenômenos de absorção de luz. Esses resultados são bastante promissores quanto à

utilização do EHPV como um recurso adjuvante em formulações cosméticas. No entanto, estudos posteriores ainda são necessários a fim de elucidar os mecanismos bioquímicos envolvidos nesse efeito fotoprotetor.

CONCLUSÃO GERAL

6 CONCLUSÃO

- O EHPV é rico em isoflavonas, destacando-se entre elas a formononetina, daidzeína e biochanina A;
- O EHPV possui alta atividade antioxidante;
- A utilização de formulações a base de EHPV inibe a formação clínica de eritema induzido por radiação UVB;
- A utilização de formulações a base de EHPV reduz o recrutamento de neutrófilos (resposta inflamatória aguda) induzido por radiação UVB;
- A utilização de formulações a base de EHPV reduz o desenvolvimento de alterações histopatológicas dermoepidérmicas induzidas por radiação UVB;
- As formulações utilizando EHPV a 2,5 e 3,5% apresentaram melhor atividade fotoprotetora que com EHPV a 1,5%. Entretanto, não apresentou efeito dose-dependente;
- A atividade fotoprotetora das formulações contendo EHPV foi similar àquela apresentada por um filtro químico comercial.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

- ADELMAN, J. Própolis variabilidade composicional correlação com a flora e a bioatividade antimicrobiana/antioxidante. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Paraná, Brasil, 2005
- AHMED, R. S.; SUKE, R. V.; SETH, V.; JAIN, A.; et al. Impact of oral vitamin E supplementation on oxidative stress & lipid peroxidation in patients with polymorphous light eruption. *Indian J Med Res.* 123(6):781-7, 2006.
- AKTER, U.; NIWA, M.; NOSE, T.; KAIDA, T.; MATSUNO, H.; KOZAWA, O.; UEMATSU, T. Effects of several agents on UVB- and UVA plus systemic fluoroquinolone-induced erythema of guinea pig skin evaluated by reflectance colorimetry. *Free Radic Biol Med.* 24(7-8):1113-9, 1998.
- ALBUQUERQUE JUNIOR, R. L. C.; BARRETO, A. L. S.; PIRES, J.A.; REIS, F. P.; LIMA, S. O.; RIBEIRO, M.A.G. ; CARDOSO, J. C. Effect of bovine type-i collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. *International Journal of Morphology* (print). 27:1105-1110, 2009.
- ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. . *J Ethnopharmacol.* 113 (2): 278-83, 2007.
- ALMEIDA ,E. B.; CARDOSO, J. C.; LIMA, A. K.; OLIVEIRA N. L.; PONTES-FILHO, N. T.; LIMA S. O.; SOUZA, L. I. C.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing. *J Ethnopharmacol.* 147(2):419-25, 2013.
- BALOGH, T. S.; VELASCO, M. V.; PEDRIALI, C. A.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Ultraviolet radiation protection: current available resources in photoprotection. *An Bras Dermatol.* 86(4):732-42, 2011.
- BARBOSA, M. H.; ZUFFI, F. B.; MARUXO, H. B.; JORGE, L. L. R. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. *Acta Paul Enferm.* 22(3):318-22, 2009.
- BATISTA, L. L. V.; CAMPESATTO, E. A.; DE ASSIS, M. L. B.; BARBOSA, A. P. F.; GRILLO, L. A. M.; DORNELAS, C. B. Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. *Rev. Col. Bras. Cir.* 39(6):515-520, 2012.
- BENZIE, I.F.F., STRAIN, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* 299:15-27, 1999.
- BISHOP, T.; HEWSON, D. W.; YIP, P. K.; FAHEY, M. S.; DAWBARN, D.; YOUNG, A. R.; MCMAHON, S. B. Characterisation of ultraviolet-B-induced inflammation as a model of hyperalgesia in the rat. *Pain.* 131:70–82, 2007.
- BISSONNETTE, R.. Update on sunscreens. *Skin Therapy Lett.* 13:5–7, 2008.
- BITTENCOURT, F.; PADILHA, F. F.; SIQUEIRA, A. L.; DANTAS, C. G.; MENDONÇA, L. S.; ARAÚJO, Y. L. F. M.; ARAÚJO, E. D.; CARDOSO, J. C. Avaliação da atividade antifúngica de formulações semi-sólidas contendo extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. *Scientia Plena.* 10(10):104501-1-11, 2014.

BOADI, W. Y.; IYERE, P. A.; ADUNYAH, S. E. In vitro exposure to quercetin and genistein alters lipid peroxides and prevents the loss of glutathione in human progenitor mononuclear (U937) cells. *Journal of Applied Toxicology*. 25:82–88, 2005.

BOBIN, M. F.; RAYMOND, M.; MARTINI, M. C. UVA/UVB absorption properties of natural products. *Cosmet Toiletries*. 109:63-78,1994.

BOLFA, P.; VIDRIGHINESCU, R.; PETRUTA, A.; DEZMIREAN, D.; STAN, L.; VLASE, L.; DAMIAN, G.; CATOI, C.; FILIP, A.; CLICHICI, S. Photoprotective effects of Romanian propolis on skin of mice exposed to UVB irradiation. *Food and Chemical Toxicology*. 62:329–342, 2013.

BONHEVI, J. S.; COLL, F. V.; JORD, R. E. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. *J Am Oil Chem Soc*. 71:529–532, 1994

BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 42(4), 2006.

BRADLEY, P. P., PRIEBAT, D.A., CHRISTENSEN, R.D., ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker, *J. Invest. Dermatol*. 78: 206–209, 1982.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*. 28(1):25-30, 1995.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa. Publicado no Diário Oficial da União de 23/01/2001, Seção 1, Página 18.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RDC Nº 30 de 1º de junho de 2012. Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology*, London, 36(4):347-363, 1998.

CAMPANINI, M. Z.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; IVAN, A. L.; FERREIRA, V. S.; VILELA, F. M.; VICENTINI, F. T.; MARTINEZ, R. M.; ZARPELON, A. C.; FONSECA, M. J.; FARIA, T. J.; BARACAT, M. M.; VERRI, J. R. W. A.; GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R. Efficacy of topical formulations containing Pimenta pseudocaryophyllus extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 127(5):153-160, 2013.

CAMPOS, V.; PITASSI, L. Oral administration of pycnogenol associated with sunscreen improve clinical symptoms of melasma *Journal of the American Academy of Dermatology*. 70(5 Supplement 1):AB19, 2014.

CAPASSO, F.; CASTALDO, S. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 73:S1-6, 2002.

CARINI, M.; ALDINI, G.; PICCONE, M.; FACINO, R. M. Fluorescent probes AS MARKERS OF OXIDATIVE STRESS IN KERATINOCYTE CELL LINES FOLLOWING UV-B EXPOSURE. *II FARMACO*, 55:526–534, 2000.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, Jr. W.A.; DORTA, D. J.; SANTOS, A.C.; FONSECA, M. J. V. J. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UV-B-induced oxidative stress in hairless mice. *J. Photochem. Photobiol. B*. 84: 21–27, 2006.

CAVALCANTE, D. R. R. Efeito quimiopreventivo de variedades de própolis brasileira sobre a carcinogênese oral experimentalmente induzida. Dissertação de mestrado, Universidade Tiradentes - UNIT, Aracaju, SE, Brasil, 2011.

CAVALCANTE, D. R. R.; DE OLIVEIRA, P. S.; GÓIS, S. M.; SOARES, A. F.; CARDOSO, J. C.; PADILHA, F. F.; ALBUQUERQUE JÚNIOR, R. L. C. Effect of green propolis on oral epithelial dysplasia in rats. *Braz J Otorhinolaryngol*. 77(3):278-84, 2011.

CESTARI, T. F.; BAZANELLA DE OLIVEIRA, F.; BOZA, J. C. Considerations on photoprotection and skin disorders. *Annales de dermatologie et de vénéréologie*. 139:S135-S143, 2012.

CHANG, N. B.; FENG, R.; GAO, Z.; GAO, W. Skin cancer incidence is highly associated with ultraviolet-B radiation history. *Int J Hyg Environ Health*. 213(5):359-68, 2010.

CHATELAIN, E.; GABARD, B. Photostabilization of butyl methoxydibenzoylmethane (Avobenzon) and ethylhexyl methoxycinnamate by bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (Tinosorb S), a new UV broadband filter. *Photochem Photobiol*. 74:401–406, 2001.

CHEN, A. C.; DAMIAN, D. L.; HALLIDAY, G. M. Oral and systemic photoprotection. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 30(2-3):102-11, 2014.

CHIARI, B. G.; TROVATTI, E.; PECORARO, E.; CORRÊA, M. A.; CICARELLI, R. M. B.; RIBEIRO, S. J. L.; ISAAC, V. L. B. Synergistic effect of green coffee oil and synthetic sunscreen for health care application. *Industrial Crops and Products*. 52:389–393, 2014.

CHOULIS, N. H. Chapter 14 - Dermatological drugs, topical agents, and cosmetics. *Side Effects of Drugs Annual*. 35:273-294, 2014.

CRIADO, P. R.; MELO, J. N.; OLIVEIRA, Z. N. Topical photoprotection in childhood and adolescence. *J Pediatr*. 88(3):203-10, 2012.

DA SILVA, J. F. M.; SOUZA, M. C.; MATTA, S. R.; ANDRADE, M. R.; VIDAL, F. V. N. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem*. 99:431-435, 2006.

DARVAY, A.; WHITE, I. R.; RYCROFT, R. J.; JONES, A. B.; HAWK, J. L.; MCFADDEN, J. P. Photoallergic contact dermatitis is uncommon. *Br. J. Dermatol*. 145(4): 597-601, 2001.

DAUGSCH, A; MORAES, C.S.; FORT, P.; PARK, Y.K. Brazilian Red Propolis – Chemical Composition and Botanical Origin. *eCAM*. 5(4):435-441, 2007.

DELICONSTANTINOS, G.; VILLIOTOU, V.; STRAVRIDES, J. C. Release by ultraviolet B (u.v.B) radiation of nitric oxide (NO) from human keratinocytes: a potential role for nitric oxide in erythema production. *Br. J. Pharmacol.*, 114:1257–1265, 1995

- DIFFEY, B. L. How much sun protection do we need? *IFSCC Magazine*. 5(3):155-159, 2002.
- DIFFEY, B.L. Indices of protection from in vitro assay of sunscreens. In:LOWE, N.J.; SHAATH, M.A.; PATHAK, M.A. Sunscreens development,evaluation, and regulatory aspects. *Marcel Dekker*. 589–600, 1997.
- EBERLEIN-KONIG, B.; RING, J. Relevance of vitamins C and E in cutaneous photoprotection. *J Cosmet Dermatol*. 4:4–9, 2005.
- ENZINGER, F. M.; Weiss SW: Soft Tissue Tumors, St Louis: CV Mosby, 828-831, 1988.
- FILIP, A.; CLICHICI, S.; DAICOVICIU, D.; CATOI, C.; BOLFA, P.; POSTESCU, I. D.; GAL, A.; BALDEA, I.; GHERMAN, C.; MURESAN, A. Chemopreventive effects of *Calluna vulgaris* and *Vitis vinifera* extracts on UVB-induced skin damage in SKH-1 hairless mice. *J. Physiol. Pharmacol*. 62:385-392, 2011.
- FILIFE, P.; SILVA, J. N.; SILVA, R. CIRNE DE CASTRO, J. L.; MARQUES GOMES, M.; ALVES, L. C.; SANTUS, R.; PINHEIRO, T. Stratum corneum is an effective barrier to TiO₂ and ZnO nanoparticle percutaneous absorption. *Skin Pharmacol. Physiol*. 22:266–275, 2009.
- FITZPATRICK, T. B. The validity and practicability of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol*. 124:869-71, 1988.
- Food and Drug Administration (FDA). Department of Health, Education and Welfare. USA: Sunscreen drug products for over-the-counter drugs: proposed safety, effective and labeling conditions. Federal register. 43/166. 38206-69, 1978.
- Food and Drug Administration [Internet]. Department of Health and Human Services. FDA, USA. Sunscreen Drug Product for Over-The-Counter Human Use, Final Monograph. Federal Register. 1999; 64(98):27689-93. Disponível em:www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/Over-the-CounterOTCDrugs/StatusofOTCRulemakings/ucm090244.pdf
- FORESTIER, S. Rationale for sunscreen development. *J Am Acad Dermatol*. 58:S133-8, 2008.
- FROZZA, C. O.; GARCIA, C. S.; GAMBATO, G.; DE SOUZA, M. D.; SALVADOR, M.; MOURA, S.; PADILHA, F. F.; SEIXAS, F. K.; COLLARES, T.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O. A.; HENRIQUES, J. A.; ROESCH-ELY, M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food Chem Toxicol*. 52:137-42, 2013.
- FU, R.; ZHANG, Y.; GUO, Y.; LIU, F.; CHEN, F. Determination of phenolic contents and antioxidant activities of extracts of *Jatropha curcas* L. *Industrial Crops and Products*. 58:265–270, 2014.
- GARRIDO, M. D.; AUQUI, M.; MARTI, N.; LINARES, M. B. Effect of two different red grape pomace extracts obtained under different extraction systems on meat quality of pork burgers. *LWT — Food Science and Technology*, 44:2238–2243, 2011.
- GASPAR, L. R.; MAIA-CAMPOS, P. M. Evaluation of the photostability of different UV filter combinations in a sunscreen. *Int J Pharm*. 307:123–128, 2006.

GHAZI, S.; COUTEAU, C.; PAPARIS, E.; COIFFARD, L. J. Interest of external photoprotection by means of clothing and sunscreen products in young children. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 26:1026-30, 2011.

GIACOMONI, P. U. Sunprotection: Historical perspective In: Shaath NA. Sunscreens: Regulation and commercial development. 3rd ed. Boca Raton: T&F INFORMA. 71-85, 2005.

GILABERT, Y.; GONZÁLEZ, S. Update on Photoprotection. *Actas Dermosifiliogr*. 101(8):659–672, 2010.

GONZÁLEZ, S.; FERNÁNDEZ-LORENTE, M.; GILABERTE-CALZADA, Y. *The latest on skin photoprotection*. *Clin Dermatol*. 26:614-26, 2008.

GONZÁLEZ, S.; PATHAK, M. Inhibition of ultraviolet-induced formation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, erythema and skin photosensitization by Polypodium leucotomos. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 12:45-56, 1996.

GREGORIS, E.; FABRISA, S.; BERTELLE, M.; GRASSATO, L.; STEVANATO, R. Propolis as potential cosmeceutical sunscreen agent for its combined photoprotective and antioxidant properties. *International Journal of Pharmaceutics*. 405:97–101, 2011.

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

HATFIELD, L. A.; HOFFBECK, R. W.; ALEXANDER, B. H.; CARLIN, B. P. Spatiotemporal and spatial threshold models for relating UV exposures and skin cancer in the central United States. *Computational Statistics and Data Analysis*. 53:3001-3015, 2009.

Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/20012>.

Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/20014>.

JANSEN, R.; WANG, S. Q.; BURNETT, M.; OSTERWALDER, U.; LIM, H. W. Photoprotection: part I. Photoprotection by naturally occurring, physical, and systemic agents. *J Am Acad Dermatol*. 69(6):853, 2013.

JURKIEWICZ, B. A., BISSETT, D. L., BUETTNER, G. R. Effect of topically applied tocopherol on ultraviolet radiation-mediated free radical damage in skin. *J Invest Dermatol*. 104:484–488, 1995.

KIM, S. J. Effect of biflavones of Ginkgo Biloba against UVB-induced cytotoxicity in vitro. *J Dermatol*. 30:193-9, 2001.

KIM, S. M.; OH, B. H.; LEE, Y. W.; CHOE, Y. B.; AHN, K. J. The relation between the amount of sunscreen applied and the sun protection factor in Asian skin. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 62(2):218-222, 2010.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*. 77(5):598-625, 2005.

KULLAVANIJAYA, P.; LIM, H. W. Photoprotection. *J Am Acad Dermatol*. 52:937-58, 2005.

- LIN, J. Y.; TOURNAS, J. A.; BURCH, J. A.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; ZIELINSKI, J. Topical isoflavones provide effective photoprotection to skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 24(2) :61-6, 2008.
- LIO, A.; OHGUCHI, K.; INOUE, H.; MARUYAMA, H.; ARAKI, Y.; NOZAWA, Y.; ITO, M. Ethanol extracts of brazilian red propolis promote adipocyte differentiation through PPAR γ activation. *Phytomedicine*. 17(12):974-9, 2010.
- LÓPEZ, B. G. C.; SCHMIDT, E. M.; EBERLIN, M. N.; SAWAYA, A. C. H. F. phytochemical markers of different types of red própolis. *Food Chemistry*. 146:174–180, 2014.
- MA, Z.; JI, W.; FU, Q.; MA, S. Formononetin inhibited the inflammation of LPS-induced acute lung injury in mice associated with induction of PPAR gamma expression. *Inflammation*. 36(6):1560-6, 2013.
- MAIA-ARAUJO, Y. L. F. Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. *Scientia Plena*. 7 (4):1-4, 2011.
- MAIO, M. (Organizador). Tratado de medicina estética: organização [de] Maurício de Maio. 2. ed. São Paulo, SP: Roca, 2011.
- MALBASA, C.; BARON, E. D. Photoprotection with clothing and sunscreens. *G Ital Dermatol Venereol*. 145:509-14, 2010.
- MANSUR, J. S.; BREDER, M. N. R; MANSUR, M. C. A; AZULAY, R. D. MANSUR, J. S.; Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An. Bras. Dermatol*. 61:121-124, 1986.
- MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Química Nova*. 19(5):529-536, 1996.
- MARQUELE-OLIVEIRA, F.; FONSECA, Y. M.; DE FREITAS, O.; FONSECA, M. J. V. Development of topical functionalized formulations added with própolis extract: Stability, cutaneous absorption and *in vivo* studies. *International Journal of Pharmaceutics*. 342:40–48, 2007.
- MASKE, P. P.; LOKAPURE, S. G.; NIMBALKAR, D.; MALAVI, S.; D'SOUZA, J. I. In vitro determination of sun protection factor and chemical stability of Rosa kordesii extract gel. *Journal of Pharmacy Research*. 7(6)520-524, 2013.
- MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H. N. Short-term and long-term cellular and molecular events following UV irradiation of skin: implications for molecular medicine. *Expert Rev. Mol. Med*. 4:1–22, 2002.
- MENAA, F., MENAA, A. Chapter 64 – Skin Photoprotection by Polyphenols in Animal Models and Humans. *Polyphenols in Human Health and Disease*. 1:831–838, 2014.
- MENDONÇA, L. S. Aspectos ambientais, químicos e biológicos relacionados à própolis vermelha. Dissertação de mestrado, Universidade Tiradentes. Aracaju, SE, Brasil, 2011.
- MIDDELKAMP-HUP, M.; PATHAK, M.; PARRADO, C.; GARCÍA-CABALLERO, T.; RIUS-DÍAZ, F.; FITZPATRICK, T.; et al. Orally administered Polypodium leucotomos extract decreases psoralen-UVA-induced phototoxicity, pigmentation, and damage of human skin. *J Am Acad Dermatol*. 50:41-9, 2004.

MITCHELL, J. H.; GARDNER, P. T.; MCPHAIL, D. B.; MORRICE, P. C.; COLLINS, A. R.; DUTHIE, G. G. Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 360:142–148, 1998.

MOHAMMADZADEH, S., SHARIATPANAH, M., HAMED, M., HMADKHANIHA, R., SAMADI, N., OSTAD, S. N. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food Chemistry*. 103:1097–1103, 2007.

MORAES, C. S. Isolamento e identificação de formononetina da própolis de joão pessoa-pb, estudo de sua sazonalidade e avaliação de suas atividades biológicas. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. São Paulo, SP, Brasil, 2009.

MOURÃO, L. R. M. B. Estudo in vivo da atividade antioxidante da própolis vermelha brasileira. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo – USP, Piracicaba, SP, Brasil, 2013.

MUNHOZ, V. M.; LONNI, A. A. S. G.; MELLO, J. C. P.; LOPES, G. C. Avaliação do fator de proteção solar em fotoprotetores acrescidos com extratos da flora brasileira ricos em substâncias fenólicas. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, 33(2):225-232, 2012.

NAIK, S. R.; KOKIL, G. R. Chapter 12 - Development and Discovery Avenues in Bioactive Natural Products for Glycemic Novel Therapeutics. *Studies in Natural Products Chemistry*. 39:431-466, 2013.

NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R.; MORAIS, S. A. L.; PILÓ-VELOSO, D.; REIS, D. C. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-Campo (*Baccharis dracunculifolia*). *Rev bras farmacogn*. 18(3):379-86, 2008.

NEVES, K. Sol e origem da radiação eletromagnética. *Cosmet. Toiletr.* 7:10-13, 2008.

NEWMAN, M. D.; STOTLAND, M.; ELLIS, J. I. The safety of nanosized particles in titanium - dioxide and zinc - oxide based sunscreens. *The American Academy of Dermatology*. 2009.

OLIVEIRA, C. N., DE REZENDE, A. A., BRANDÃO-NETO, J., SCHWARZ, A., ALMEIDA, M. D. Antioxidant activity and protective effect of *Turnera ulmifolia* Linn. var. *elegans* against carbon tetrachloride-induced oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol*. 50(12):4340-7, 2012.

OU-YANG, H.; STANFIELD, J.; COLE, C.; APPA, Y.; RIGEL, D. High-SPF sunscreens (SPF $\geq$ 70) may provide ultraviolet protection above minimal recommended levels by adequately compensating for lower sunscreen user application amounts. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 67(6):1220-1227, 2012.

PARK, H. J.; YANG, J. Y.; AMBATI, S.; DELLA-FERA, M. A.; HAUSMAN, D. B.; RAYALAM S.; BAILE, C. A. Combined effects of genistein, quercetin, and resveratrol in human and 3T3-L1 adipocytes. *J Med Food*. 11(4):773-83, 2008.

PARK, S. B., SUH, D. H., YOUN, J. I. A long-term time course of colorimetric evaluation of ultraviolet light-induced skin reactions. *Clin Exp Dermatol*. 24(4):315-20, 1999.

PARK, S. B.; SUH, D. H.; YOUN, J. I. A long-term time course of colorimetric evaluation of ultraviolet light-induced skin reactions. *Clin Exp Dermatol*. 24:315-320, 2008.

- PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO-NETO, F. R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova*. 25:321-326, 2002.
- PETROVA, A.; DAVIDS, L. M.; RAUTENBACH, F.; JEANINE, L. Marnewick. Photoprotection by honeybush extracts, hesperidin and mangiferin against UVB-induced skin damage in SKH-1 mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 103:126–139, 2011.
- PINHEIRO, K. S.; RIBEIRO, D. R.; ALVES, A. V. F.; PEREIRA FILHO, R. N.; OLIVEIRA, C. R.; LIMA, S. O.; REIS, F. P.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE JUNIOR, R. L. C.. Modulatory activity of brazilian red propolis on chemically induced dermal carcinogenesis. *Acta Cirúrgica Brasileira (Impresso)*, 29:111-117, 2014.
- PINHEIRO, M. S. Avaliação da atividade antimicrobiana e citoprotetora gástrica dos extratos de mangaba, caju e própolis vermelha. Dissertação de mestrado, Universidade Tiradentes - UNIT, Aracaju, SE, Brasil, 2009.
- PODDA, M.; GRUNDMANN-KOLLMANN, M. Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. *Clin. Exp. Dermatol.* 26:578-582, 2001.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 26:1231-1237, 1999.
- RIGEL, D. S. Cutaneous ultraviolet exposure and its relationship to the development of skin cancer. *J Am Acad Dermatol.* 58(5 Suppl 2):S129-32, 2008.
- RIGHI, A. A.; ALVES, T. R.; NEGRI, G.; MARQUES, L. M.; BREYER, H.; SALATINO, A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *J Sci Food Agric.* 91 (13):2363-70, 2011.
- RIJKEN, F.; BRUIJNZEEL, P. L. The pathogenesis of photoaging: the role of neutrophils and neutrophil-derived enzymes. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings.* 14(1):67-72, 2009.
- ROELANDTS, R. History of human photobiology In: Lim HW, Hönigsmann H, Hawk JLM. *Photodermatology*. New York: Informa Healthcare USA. 1-13, 2007.
- SAMBANDAN, D. R.; RATNER, D. Sunscreens: an overview and update. *J Am Acad Dermatol.* 64(4):748-58, 2011.
- SANTOS, F. S. M. Efeitos do tratamento oral com própolis vermelha e exercício de natação sobre a lesão medular em ratos. Dissertação de mestrado, Universidade Tiradentes - UNIT, Aracaju, SE, Brasil, 2013.
- SAYRE, R. M.; AGIN, P. P.; LEVEE, G. J.; MARLOWE, E. Comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of suncreening formula. *Photochem. Photobiol.* 29:559-566, 1979.
- SCHREINER, M.; HUYSKENS-KEIL, S. Phytochemicals in fruit and vegetables: Health promotion and postharvest elicitors. *Critical Reviews in Plant Sciences.* 25:267–278, 2006.
- SCHROEDER, P.; CALLES, C.; KRUTMANN, J. Prevention of infrared-A radiation mediated detrimental effects in human skin. *Skin Therapy Lett.* 14:4-5, 2009.
- SERAFINI, M. R.; DETONI, C. B.; MENEZES, P. P.; PEREIRA FILHO, R. N.; FORTES, V. S.; VIEIRA, M. J.; GUTERRES, S. S.; CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE JUNIOR, R. L.;

ARAÚJO, A. A. UVA-UVB photoprotective activity of topical formulations containing *Morinda citrifolia* extract. *Biomed Res Int.* 1-10, 2014.

SETLOW, J. K. Chapter V - The Effects of Ultraviolet Radiation and Photoreactivation. *Comprehensive Biochemistry.* 27: 157-209, 2014.

SILVA, M. A.; TREVISAN, G.; HOFFMEISTER, C.; ROSSATO, M. F.; BOLIGON, A. A.; WALKER, I. C.; KLAFKE, J. Z.; OLIVEIRA, S. M.; SILVA, C. R.; ATHAYDE, M. L.; FERREIRA, J. Anti-inflammatory and antioxidant effects of Aloe saponaria Haw in a model of UVB-induced paw sunburn in rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 133:47–54, 2014.

SIQUEIRA, A. L.; DANTAS, C. G.; GOMES, M. Z.; PADILHA, F. F.; ALBUQUERQUE JUNIOR, R. L. C.; CARDOSO, J. C. Estudo da ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico de propolis vermelha sobre *Enterococcus faecalis*. *Rev Odontol UNESP.* 43(6):359-366, 2014.

SOUSA, J. P. B.; FURTADO, N. A. J. C.; JORGE, R.; SOARES, A. E. E.; BASTOS, J.K. Physical chemical and chromatographic profiles of propolis samples produced in the micro regions of Franca (SP) and Passos (MG), Brazil *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 17(1):85-93, 2007.

SOUZA, I. C. L.; NASCIMENTO, M. F.; NETA, R. G. S.; SANTOS, J. C.; COSTA, L. P.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C. Effect of the maltodextrin-induced chemical reticulation on the physical properties and healing potential of collagen-based membranes containing Brazilian red propolis extract. *Int. J. Med. Med. Sci.* 5(12):514-524, 2013.

SRIVASTAVA, A.; MISHRA, R.; KUMAR, S.; DEV, K.; TANDON, P.; MAURYA, R. Molecular structure, spectral investigation (¹H NMR, ¹³C NMR, UV–Visible, FT-IR, FT-Raman), NBO, intramolecular hydrogen bonding, chemical reactivity and first hyperpolarizability analysis of formononetin [7-hydroxy-3(4-methoxyphenyl)chromone]: A quantum chemical study. *Journal of Molecular Structure.* 1084:55–73, 2015.

SRIVASTAVA, J.K.; GUPTA, S. Extraction, Characterization, Stability and Biological Activity of Flavonoids Isolated from Chamomile Flowers. *Mol Cell Pharmacol.* 1(3):138, 2009.

STAHL, W.; HEINRICH, U.; AUST, O.; TRONNIER, H.; SIES, H. Lycopene-rich products and dietary photoprotection. *Photochem Photobiol Sci.* 5:238-42, 2006.

STOKES, R. Project sunscreen protection. In: GABARD, B.; ELSNER, P.; SURBER, C.; TREFFEL, P., (Eds). *Dermatopharmacology of topical preparations.* Berlin: Springer, cap. 21:365-382, 2000.

SULAIMAN, G. M.; SAMMARAE, K. W. A.; AD'HIAH, A. H.; ZUCCHETTI, M.; FRAPOLLI, R.; BELLO, E.; ERBA, E.; D'INCALCI, M.; BAGNATI, R. Chemical characterization of Iraqi propolis samples and assessing their antioxidant potentials. *Food and Chemical Toxicology.* 49:2415–2421, 2011.

TAYEL, A. A.; EL-TRAS, W. F. Plant extracts as potent biopreservatives for *Salmonella typhimurium* control and quality enhancement in ground beef. *Journal of Food Safety.* 32:115–121, 2012.

TUCHINDA, C.; LIM, H. W. OSTERWALDER, U.; ROUGIER, A. Novel emerging sunscreen technologies. *Dermatol Clin.* 24:105-17, 2006.

URBACH, F.; FORBES, P. D.; DAVIES, R. E.; BERGER, D. Cutaneous photobiology: past, present, and future. *J Invest Dermatol.* 67:209-24, 1976.

VIOLANTE, I. M. P.; SOUZA, I. M.; VENTURINI, C. L.; RAMALHO, A. F.S.; SANTOS, R. A. N.; FERRARI, M. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. *Rev Bras Farmacogn.* 1(2A):452-57, 2009.

WANG, S. Q.; TOOLEY, I. R. Photoprotection in the Era of Nanotechnology. *Semin Cutan Med Surg.* 30:210-213, 2011.

WANG, W.; TANG, L.; LI, Y.; WANG, Y. Biochanin A protects against focal cerebral ischemia/reperfusion in rats via inhibition of p38-mediated inflammatory responses. *J Neurol Sci.* S0022-510X(14)00732-1, 2014.

WENTZELL, J. M. Sunscreens: the ounce of prevention. *Am. Fam. Physican.* 53(5):1713-1719, 1996.

WITKO-SARSAT, V.; RIEU, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; LESAVRE, P.; HALBWACHS-MECARELLI, L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest.* 80(5):617-53, 2000.

YAAR, M.; GILCHREST, B. A. Photoageing: Mechanism, prevention and therapy. *Br J Dermatol.* 157:874-887, 2007.

YAROSH, D. B. Enhanced DNA repair of cyclobutane pyrimidine dimers changes the biological response to UV-B radiation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 509 (1–2):221-226, 2002.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74:139-161, 1994.

ZAID, M. A.; AFAQ, F.; SYED, D. N., DREHER, M.; MUKHTAR, H. Inhibition of UVB-mediated oxidative stress markers of photoaging in immortalized HaCaT keratinocyte by pomegranate polyphenol extract POMx. *Photochem Photobiol.* 83:882–888, 2007.

ANEXO

ANEXO

Unit
UNIVERSIDADE TIRADENTES

UNIVERSIDADE TIRADENTES
DIRETORIA DE PESQUISA E EXTENSÃO
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

DECISÃO DA CEUA-UNIT

O projeto, “Desenvolvimento e avaliação da atividade quimioprotetora de formulações contendo extrato de própolis vermelha em animais submetidos à radiação UV”, processo nº 080514, foi submetido à avaliação na CEUA-UNIT, pela pesquisadora **Juliana Cordeiro Cardoso**, onde recebeu o parecer de **Aprovado**, dos membros dessa comissão, na reunião realizada no dia 22 de maio de 2014.

Maria Lídia Vardelli
Coordenador(a) da CEUA-UNIT

UNIVERSIDADE TIRADENTES
Prof. Maria Lídia Vardelli
Comissão de Ética no Uso Animal
Coordenadora

UNIVERSIDADE TIRADENTES
AV. MURILO DANTAS Nº 300 B.FAROLÂNDIA
CEP: 49.032-490 | ARACAJU - SE - BRASIL

TELEFONE: (79)3218 2112
F AX: (79) 3218 21 00