

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Incorporação de nanoemulsões contendo extrato da própolis vermelha
brasileira em hidrogéis: preparação, caracterização e atividade antioxidante**

LUCIRIA DE FREITAS CORREA

PORTO ALEGRE, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Incorporação de nanoemulsões contendo extrato da própolis vermelha
brasileira em hidrogéis: preparação, caracterização e atividade antioxidante**

Dissertação apresentada por **Luciria de
Freitas Correa** para obtenção do GRAU
DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira
Coorientadora: Profa. Dra. Gilsane von Poser

PORTO ALEGRE, 2018

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul a ser apresentada em 21 de março de 2018, frente à Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Cristiana Lima Dora
Universidade Federal do Rio Grande

Prof. Dr. Martin Steppe
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Correa, Luciria de Freitas
Incorporação de nanoemulsões contendo extrato da própolis vermelha brasileira em hidrogéis: preparação, caracterização e atividade antioxidante / Luciria de Freitas Correa. -- 2018.
79 f.
Orientador: Helder Ferreira Teixeira.

Coorientadora: Gilsane Lino Von Poser.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Própolis vermelha brasileira. 2. Extrato n-hexânico. 3. Nanoemulsão e Hidrogéis. 4. Permeação/Retenção Cutânea. 5. Atividade antioxidante.
I. Teixeira, Helder Ferreira, orient. II. Von Poser, Gilsane Lino, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho

Laboratório de Desenvolvimento Galênico (606) da Faculdade de Farmácia da UFRGS e no Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

Aos meus pais Ione e Manoel dedico esta conquista, por todo o apoio, amor e dedicação durante todas as etapas desde o caminho, e por toda a vida. O incentivo foi fundamental para esta conquista. Obrigada por tudo. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Dr. Helder e Professora Dra. Gilsane, pela dedicação dispensada a mim durante toda esta caminhada, confiança, paciência, incentivo e por seus conhecimentos compartilhados.

A Lucélia Balestrin, por toda ajuda e conhecimento transmitidos, amizade e paciência.

A Gabriela Meirelles, pelo auxílio fornecido e conhecimento compartilhado.

A Flávia e Tainá que também me auxiliaram e ensinaram em muitos momentos.

A Priscila Oliveira do Departamento de Bioquímica, por todo o auxílio prestado na realização dos ensaios REDOX.

Aos queridos colegas e professores do LDG, que me acolheram e incentivaram durante esta etapa tão especial.

Agradeço aos amigos queridos que compartilharam comigo esta etapa e entenderam muitas vezes a minha ausência.

As professoras Marlise, Themis e Maria Rita por todo o incentivo, ensinamentos e carinho.

A minha família amada, minha mãe Ione que me ouviu e foi a principal incentivadora me dando força para prosseguir durante os momentos mais difíceis. Ao meu pai Manoel por estar sempre zelando por mim. A minha irmã Mônica pela paciência e ao meu cunhado Nicola que muito me ajudou durante toda esta jornada. Agradeço a todos da minha família, pois estiveram sempre torcendo e rezando por mim, para que tudo terminasse da melhor maneira possível.

E obrigada a Deus por ter me permitido concluir mais esta etapa, e a todos que me acompanharam e torceram por mim em algum momento, muito, mas muito obrigada!

RESUMO

Os extratos obtidos a partir da própolis vermelha brasileira (PVB) têm sido investigados devido às suas amplas atividades biológicas. Recentemente, em nosso grupo de pesquisa, demonstramos a viabilidade da incorporação de um extrato *n*-hexânico de PVB em nanoemulsões de uso tópico, bem como sua permeação/retenção em pele de orelha suína. No presente estudo, avaliamos as propriedades físico-químicas e reológicas de hidrogéis contendo essas nanoemulsões visando a obtenção de um produto semissólido adequado para aplicação tópica. Em uma primeira fase, foram preparadas nanoemulsões compostas de núcleo oleoso contendo extrato *n*-hexânico de PVB, miristato de isopropila, lecitina de ovo (NE) e DOTAP (NE/DT), e fase externa aquosa. O polímero gelificante hidroxietilcelulose foi incorporado às formulações após a sua obtenção por emulsificação espontânea (H-NE e H-NE/DT). As formulações apresentaram-se monodispersas com diâmetro médio na faixa de 200-300 nm, confirmado por microscopia eletrônica de transmissão. H-NE apresentou um potencial zeta negativo (-38mV), enquanto o mesmo parâmetro para H-NE/DT foi positivo (+36mV), devido à presença do lipídeo catiônico DOTAP na formulação. O teor de benzofenonas totais, determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foi de cerca de 85 mg/g de extrato. Esses parâmetros mantiveram-se constantes durante 90 dias de armazenamento a 4°C. As formulações H/NE e H-NE/DT apresentaram um comportamento não-Newtoniano pseudoplástico. Estudos de permeação/retenção das benzofenonas através da pele de orelha suína foram realizados utilizando células de difusão do tipo Franz. A maior retenção das benzofenonas na pele (18,11 µg/cm² após 8h) foi observada para a formulação H-NE/DT, demonstrando o efeito do lipídeo catiônico DOTAP nesse parâmetro. Em uma última etapa, investigou-se a capacidade das formulações de conferirem proteção à pele de orelha suína frente ao dano oxidativo gerado pela sua exposição à luz UVA/UVB. A proteção da pele de orelha suína foi evidenciada pelas técnicas de TBARS, carbonilação de proteínas e grupamentos tióis totais. Os resultados obtidos sugerem que os Hidrogéis contendo extrato de PVB apresentam propriedades físico-químicas e reológicas adequadas para serem utilizadas topicamente para a prevenção do dano oxidativo causado pela exposição à luz UVA/UVB.

Palavras-chave: Benzofenona; dano oxidativo; hidrogel; nanoemulsão; permeação/retenção cutânea; própolis vermelha brasileira.

ABSTRACT

Brazilian red propolis (BRP) extracts have been investigated due to their extensive biological activities. Recently, in our research group, we demonstrated the feasibility of incorporating an *n*-hexane extract of BRP into topical nanoemulsions, as well as the permeation/retention of these compounds in porcine ear skin. In the present study, we evaluated the physicochemical and rheological properties of hydrogels containing these nanoemulsions in order to obtain a semi-solid product suitable for topical application. In a first step, nanoemulsions composed of an oil nucleus containing BRP *n*-hexane extract, isopropyl myristate, egg lecithin (NE) and DOTAP (NE/DT), and an aqueous external phase were prepared. The hydroxyethylcellulose gelling polymer was incorporated into the formulations after being obtained by spontaneous emulsification (H-NE and H-NE/DT). The formulations were monodisperse exhibiting a mean diameter in the 200-300 nm range, confirmed by transmission electron microscopy. H-NE presented a negative zeta potential (-38mV), while H-NE/DT showed a positive value (+ 36mV) due to the presence of the cationic lipid DOTAP in the formulation. The total benzophenone content, determined by high performance liquid chromatography (HPLC), was about 85 mg/g extract. These parameters were maintained constant for 90 days of storage at 4°C. The formulations H/NE and H-NE/DT presented a non-Newtonian pseudoplastic behavior. Permeation/retention studies of benzophenones through porcine ear skin were performed using Franz type diffusion cells. The highest retention of benzophenones in the skin (18.11 µg/cm² after 8h) was observed for the H-NE/DT formulation, demonstrating the effect of the DOTAP cationic lipid on this parameter. In a last step, the ability of the formulations to confer protection of porcine ear skin against oxidative damage, generated by its exposure to UVA/UVB light, was investigated. The protection was evidenced by the TBARS, carbonylation of proteins, and total thiol groups techniques. The results obtained suggest that the hydrogels containing BRP have adequate physicochemical and rheological properties to be used topically for the prevention of oxidative damage caused by exposure to UVA/UVB light.

Keywords: Benzophenone; brasilian red propolis; hydrogel; nanoemulsion; oxidative damage; skin permeation/retention.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1. Revisão da literatura

Figura 1: Figura 1. Estrutura química da gutiferona E (1), xantochimol (2), oblongifolina A (3) e garcinol (4) (Fasolo et al., 2016).....37

Figura 2: Representação esquemática do espectro solar (Khury et al., 2007).....38

Capítulo 2. Atividade antioxidante de hidrogéis contendo benzofenonas da própolis vermelha brasileira incorporadas em nanoemulsões

Figura 1: Estrutura química das BZP identificadas na PVB: gutiferona E (A), xantochimol (B) e oblongifolina A (C).....53

Figura 2: Imagens das nanoemulsões contendo o extrato de BZP incorporadas em hidroxietilcelulose 1%, obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET): H-NE/DT (A) de 100-200 nm e H-NE (B) de 200-300 nm.....63

Figura 3: Perfil cromatográfico do extrato *n*-hexânico de PVB em método HPCL...64

Figura 4: Avaliação reológica do hidrogel contendo NE (A) e NE/DT (B).....67

Figura 5: Avaliação de estresse oxidativo através da determinação de (A) proteínas carboniladas, (B) tióis totais (proteicos e não-proteicos), (C) espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....69

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1. Revisão da literatura

Tabela 1: Exemplos de estudos demonstrando a atividade antioxidante da PVB....40

Tabela 2: Exemplos de estudos utilizando hidroxietilcelulose como espessante de nanoemulsões.....43

Capítulo 2. Atividade antioxidante de hidrogéis contendo benzofenonas da própolis vermelha brasileira incorporada em nanoemulsões

Tabela 1: Composição final (% , m/m) das formulações.....56

Tabela 2: Propriedades físico-químicas das nanoemulsões (NE e NE/DT) e hidrogéis (H-NEe H-NE/DT).....62

Tabela 3: Caracterização físico-química e teor de BZP dos hidrogéis H-NE e H-NE/DT em função do tempo de armazenamento à 4 °C.....65

Tabela 4: BZP (mg/cm²) retidas na pele de orelha suína a partir das formulações (H-NE, H-NE/DT e controle) em função do tempo.....68

LISTA DE ABREVIações

BZP/BZPs - Benzofenona poliprenilada/ Benzofenonas polipreniladas

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DOTAP - 1,2-dioleoil,3-trimetilamôniopropano

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

FPS – Fator de Proteção Solar

HEC – Hidroxietilcelulose

HEX - Fração *n*-hexano

HEXred - Extrato hexânico da própolis vermelha brasileira

H-NE- Hidrogel incorporado a nanoemulsão de PVB sem DOTAP

H-NE/DT – Hidrogel incorporado a nanoemulsão de PVB com DOTAP

H-NE/DTb – Hidrogel sem extrato de PVB com DOTAP

H-NEb – Hidrogel sem o extrato de PVB e sem Dotap

IST – Pele irradiada sem tratamento

NE- Nanoemulsão de PVB sem DOTAP

NE/DT- Nanoemulsão de PVB com DOTAP

NIST – Pele não irradiada sem tratamento

PVB - Própolis vermelha brasileira

UV - Ultravioleta

UVA – Ultravioleta A

UVB – Ultravioleta B

SUMÁRIO

Introdução	23
Objetivos	29
Capítulo 1 - Revisão da literatura	33
1. Própolis.....	35
2. Pele e radiação UVA/UVB.....	37
3. Antioxidantes.....	38
4. Nanoemulsões e Hidrogéis.....	41
Referências.....	43
Capítulo 2 - Atividade antioxidante de hidrogéis contendo benzofenonas da própolis vermelha brasileira incorporada em nanoemulsões	49
1. Introdução.....	53
2. Materiais e métodos.....	55
2.1. Materiais.....	55
2.2. Métodos.....	55
2.2.1. Preparação do extrato <i>n</i> -hexano.....	55
2.2.2. Análise do teor de BZP no extrato de PVB.....	55
2.2.3. Obtenção das nanoemulsões e hidrogéis derivados.....	56
2.2.4. Caracterização das formulações.....	57
2.2.5. Estudo de permeação/retenção cutânea.....	58
2.2.6. Estudo da atividade antioxidante.....	58
3. Resultados e Discussão.....	60
3.1. Preparação e caracterização das formulações.....	60

3.2. Estudo de permeação/retenção cutânea.....	67
3.3. Estudo da atividade antioxidante.....	68
4. Conclusão.....	72
5. Referências.....	72
Conclusões.....	77

INTRODUÇÃO

A própolis é um produto resinoso natural complexo produzido por abelhas da espécie *Apis mellifera* a partir de substâncias coletadas de diferentes partes de plantas como ramos, brotos, exsudatos, entre outros. Esse produto, rico em polifenóis, é produzido por abelhas com o objetivo de proteger as suas colmeias contra insetos e agentes infecciosos. Em geral, a própolis é composta de resinas e bálsamos (50-60%), ceras (30-40%), óleos essenciais (5-10%), grãos de pólen (5%), microelementos e vitaminas (Piccinelli et al.; 2011; Rufatto et al., 2017). No total, treze tipos de própolis já foram identificados no Brasil, os quais foram classificados de acordo com suas características físico-químicas, dentre eles destaca-se a própolis vermelha. Esse tipo é encontrado nas regiões norte e nordeste do Brasil, e possui a cor avermelhada devido aos exsudatos vermelhos presentes na superfície da espécie vegetal *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub, popularmente chamada rabo-de-bugio que é coletada por abelhas que vivem nessas regiões (Corrêa et al., 2017; Rufatto et al., 2017).

A própolis vermelha brasileira (PVB) tem despertado grande interesse dos pesquisadores devido às diversas atividades biológicas apresentadas, tais como antimicrobiana, anti-inflamatória, anticariogênica, anticancerígena, antifúngica e antioxidante. De modo geral, essas atividades são relatadas para extratos etanólicos e hidroetanólicos (Alencar et al., 2007; Righi et al., 2011). A composição química da própolis é complexa e variada, uma vez que se trata de uma mistura de diferentes substâncias, sendo que as mais citadas são os compostos fenólicos (Trusheva et al., 2004; Trusheva et al., 2006; Lustosa et al., 2008).

Dentre os compostos fenólicos da PVB, alguns estudos relatam a presença de benzofenonas polipreniladas (como a gutiferona E, o xantochimol e a oblongifolina A) em extratos (Piccinelli et al., 2011; Rufatto et al., 2017). Fasolo e colaboradores (2016) descreveram a presença dessas benzofenonas em extrato lipofílico (*n*-hexânico) de PVB. Esses autores também descreveram o desenvolvimento e validação de um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção no ultravioleta para a quantificação do teor de benzofenonas totais em extratos, formulações e amostras bionanalíticas, expressas em uma benzofenona poliprenilada comercial, o garcinol.

Em estudos recentes do nosso grupo de pesquisa foi demonstrada a viabilidade de incorporação de um extrato *n*-hexano da PVB (rico em benzofenonas) em nanoemulsões de uso tópico otimizadas por meio de experimento do tipo *Box-Behnken*. A formulação otimizada foi selecionada com base no menor tamanho de gotícula e maior valor de potencial zeta, assim como eficiência de associação das benzofenonas. Além disso, foi avaliada a permeação/retenção das nanoemulsões contendo benzofenonas em pele de orelha suína em células de difusão do tipo Franz. O conjunto destes resultados demonstrou que as benzofenonas se acumulam na estrutura cutânea (epiderme e derme) com ausência de permeação através das camadas da pele, apontando assim para uma possível utilização das formulações para aplicação tópica local (Fasolo et al., 2016).

Apesar destes resultados promissores, as nanoemulsões são obtidas como uma dispersão líquida de nanogotículas de óleo em água, e sua incorporação em uma forma farmacêutica com viscosidade adequada à aplicação tópica deve ser investigada. Assim, a presente dissertação visa desenvolver hidrogéis contendo extrato de PBV veiculado em nanoemulsões, bem como avaliar as potencialidades do produto desenvolvido na proteção de pele de orelha suína frente ao dano oxidativo causado pela luz UVA/UVB.

Referências

Alencar, S.M; Oldoni, T.L.C; Castro, M.L; Cabral, I.S.R; Costa-Neto, C.M; Cury, J.A; Rosalen, P.L; Ikegaki, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: *Red propolis*. *Journal of Ethnopharmacology*. 113, 278-283, 2007.

Corrêa, F.R.S.; Schanuelb, F.S.; Nunesa, N.M.; Alto-Costab, A.M.; Dalepranea, J.B. Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing suppressing inflammation-associated transcription factor NFκB. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 86, 162–171, 2017.

Fasolo, D; Bergold, A.M; Von Poser, G; Teixeira, H.F. Determination of benzophenones in lipophilic extract of Brazilian red propolis, nanotechnology – based

product and porcine skin and mucosa: analytical and bioanalytical assays. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 124, 57-66, 2016.

Fasolo, D. Desenvolvimento de nanoemulsões catiônicas contendo benzofenonas da própolis vermelha brasileira visando ao tratamento de infecções fúngicas mucocutâneas. Tese de Doutorado, UFRGS, 2016.

Lustosa, S.R.; Galindo, A.B.; Nunes, L.C.C.; Randau, K.P.; Rolin Neto, P.J. Propolis: Updates on chemistry and pharmacology. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 18, p. 447-454, 2008.

Piccinelli, A.L; Lotti, C; Campone, L; Cuesta-Rubio, O; Fernandez, M.C; Rastrelli, L. Cuban and Brazilian Red Propolis: Botanical Origin and Comparative Analysis by High-Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detection/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59, 6484-6491, 2011.

Righi, A.A.; Alves, T.R.; Negri, G.; Marques, L.M.; Breyer, H.; Salatino, A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of the Science Food and Agriculture*. 91,13, 2363-2370, 2011

Rufatto L.C; Santos, D.A.; Marinho, F.; Henriques, J.A.P.; Ely, M.R.; Moura, S. Red própolis; Chemical composition and pharmacological activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 7, 591-598, 2017.

Trusheva, B.; Popova, M.; Naydensky, H.; Tsvetrova, V.; Rodriguez, J.G.; Bancova, V. New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. *Fitoterapy*. 75, 683-689, 2004.

Trusheva, B; Popova, M; Bankova, V; Simona, S; Marcucci, M.C; Miorin, P.L; Pasin, F.R; Tsvetkova, I. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. *Oxford University Press*. 3(2), 249-254, 2006.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolver hidrogel contendo extrato rico em benzofenonas da PVB incorporado em nanoemulsões visando à obtenção de produto com atividade antioxidante para aplicação tópica.

Objetivos específicos

- Obter fração rica em benzofenonas polipreniladas;
- Preparar, caracterizar as propriedades físico-químicas e determinar o teor de benzofenonas polipreniladas totais em nanoemulsões contendo extrato *n*-hexano de PVB;
- Preparar hidrogel derivado contendo o extrato *n*-hexano de PVB incorporado em nanoemulsões;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas, morfologia e comportamento reológico dos hidrogéis contendo o extrato *n*-hexano de PVB incorporado em nanoemulsões;
- Avaliar a estabilidade das formulações obtidas;
- Avaliar a permeação/retenção das formulações a partir das nanoemulsões contendo o extrato *n*-hexano de PVB em células de difusão do tipo Franz;
- Avaliar a atividade antioxidante de nanoemulsões contendo o extrato *n*-hexano de PVB incorporadas em hidrogel em pele de orelha suína, após exposição à luz UVA/UVB.

CAPITULO I

Revisão da literatura

1. Própolis

A própolis é um produto resinoso composto por ceras, açúcares e exsudatos, produzida por abelha da espécie *Apis mellifera* que vem sendo utilizada na medicina popular por séculos (Alencar et al., 2007; Sawaya, et al, 2010). As abelhas utilizam a própolis para diversos fins, entre eles a vedação de aberturas na colmeia e como uma arma química contra microrganismos e insetos.

Este papel natural de defesa confere à própolis um amplo espectro de atividades biológicas, validando o seu uso no tratamento de várias condições, incluindo inflamações, feridas ou queimaduras, dor de garganta, infecções virais e úlceras. Este produto resinoso apresenta também efeito antifúngico, antimicrobiano e antioxidante (Alencar et al., 2007; Farooqui et al., 2010; Fasolo et al., 2016). A própolis também é um sensibilizador potente, podendo resultar em reações alérgicas da pele e mucosas. Dermatite de contato e prurido também tem sido relatadas (Castaldo et.al., 2002; Farroqui et al., 2010; Almeida et al., 2013).

Na última década, o conhecimento sobre a composição química da própolis avançou consideravelmente. Estudos revelam que a sua composição varia muito de acordo com a vegetação no local de coleta e sua localização geográfica, o que pode determinar a sua diversidade química (Piccinelli et al., 2011; Jacob et al., 2015). Este fato resulta na diversidade de sua composição química, especialmente para própolis originárias de regiões tropicais (Piccinelli et al., 2011; Jacob et al., 2015).

Até 2006, de acordo com Trusheva (2006), nenhum dado químico havia sido publicado sobre a PVB. Até este período existiam 12 tipos de própolis brasileiras que foram caracterizadas e classificadas (Park et al., 2000; Alencar et al., 2007). Porém, um décimo terceiro tipo de própolis foi identificado no estado de Alagoas, recebendo o nome de Própolis Vermelha Brasileira (PVB), devido à sua coloração. Esta foi descoberta em colmeias ao longo das linhas costeiras da região Nordeste do Brasil, e verificou-se a presença de compostos característicos dos exsudatos de coloração vermelha, produzidos pela espécie vegetal *Dalbergia ecastophyllum* (L.) (Fabaceae) (Piccinelli et al., 2011; Jacob et al., 2015; Rufatto et al., 2017), que são coletados pelas abelhas *Apis mellifera*. Outras espécies vegetais que são utilizadas pelas abelhas na produção da própolis vermelha brasileira são espécies de *Clusia* (Guttiferae), produtoras de benzofenonas polipreniladas (Piccinelli et al., 2011).

Na PVB foram encontradas, além de benzofenonas, compostos como elemicina, isoelemicina, metil isoeugenol, metil eugenol, formononetina, bioquanina A, isoliquiritigenina, liquiritigenina, medicarpina, homopterocarpano, quercetina e vestitol. Ensaios preliminares com frações hexânicas, clorofômicas e etanólicas, de PVB avaliaram a sua composição química, bem como demonstraram importantes atividades biológicas, tais como antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica e antimicrobiana (Trusheva et al., 2006; Alencar et al., 2007; Piccinelli, et al., 2011; Jacob et al., 2015; Fasolo et al., 2016).

Estudos vêm sendo realizados na tentativa de identificar novos componentes e atividades para a PVB. Dentre eles, o estudo realizado por Alencar et al. (2007) que verificou a presença de três componentes nunca antes observados em outros tipos de própolis: homopterocarpano, medicarpina e 4,7-dimetoxi-2-isoflavonol. Somado a este estudo, Fasolo et al. (2016) descreveu extrato lipofílico (*n*-hexano) de PVB rico em benzofenonas polipreniladas. Até estes trabalhos, os estudos descreviam apenas extratos etanólicos (Alencar et al., 2007; Farooqui et al., 2010; Piccinelli et al., 2011; Sawaya et al., 2011; Jacob et al., 2015).

Benzofenonas apresentam diversas atividades, tais como antitumoral, anti-inflamatória, antiulcerosa e antioxidante (Trusheva et al., 2006; Piccinelli et al., 2011; Bae et al, 2016; Fasolo et al, 2016). As benzofenonas polipreniladas (BPPs) têm sido foco de diversos estudos devido às suas propriedades biológicas. Os gêneros *Garcinia* e *Clusia* (Família Clusiaceae) têm sido reportados como as principais fontes de BPPs. Esses compostos também ocorrem em espécies de outros gêneros da mesma família, tais como *Vismia*, *Allanblackia*, *Moronobea*, *Symphonia*, *Hypericum*, *Tovomita*, *Tovomiptosis* *Ochrocarpus* (Acuna et al., 2009). Vale salientar que as resinas vêm sendo extensamente utilizadas na medicina popular, provavelmente em função de que constituem uma fonte importante de BPPs, que apresentam uma vasta gama de atividades biológicas (Trusheva et al., 2004). Na figura 1 apresenta a estrutura química das benzofenonas identificadas no extrato *n*-hexano da PVB. O garcinol (4) não foi relatado em PVB mas é um isômero comercialmente disponível que pode ser utilizado nas análises quantitativas.

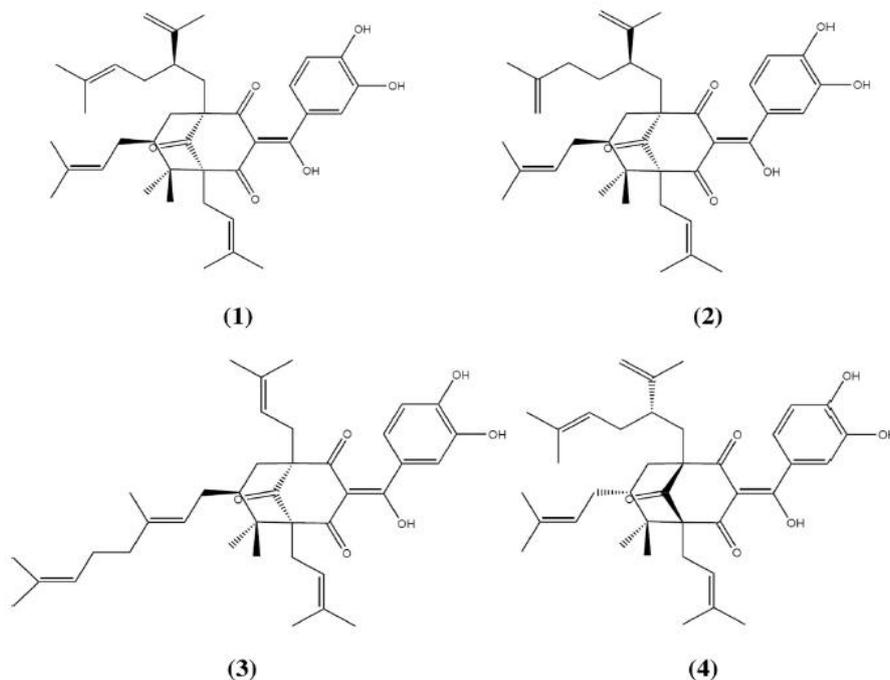


Figura 1. Estrutura química da gutiferona E (1), xantochimol (2), oblongifolina A (3) e garcinol (4) (adaptada de Fasolo et al., 2016).

2. Pele e radiação UVA/UVB

A pele é o órgão que reveste, molda e protege o corpo humano, sendo composta por três camadas tissulares distintas, a epiderme, a derme e a hipoderme. A epiderme é a responsável pela formação do estrato córneo que além de ser a camada mais externa da pele, apresenta-se como a principal barreira à penetração de substâncias nocivas ao organismo. Por constituir uma interface com o meio ambiente e devido à função de barreira, a pele é considerada um órgão alvo de fatores externos como a radiação ultravioleta (UV), radiação ionizante e vários compostos químicos tóxicos (Balogh et al., 2011; Oliveira et al., 2015).

A radiação eletromagnética emitida pelo sol mostra um amplo espectro de comprimentos de onda, como pode ser verificado na Figura 2. Tal radiação é dividida em duas maiores regiões de acordo com a capacidade de ionização atômica: radiação ionizante, que por sua vez é subdividida em raios-X e raios gama, e radiação não-ionizante. A radiação não-ionizante se subdivide em radiação ultravioleta, luz visível e radiação infravermelho.

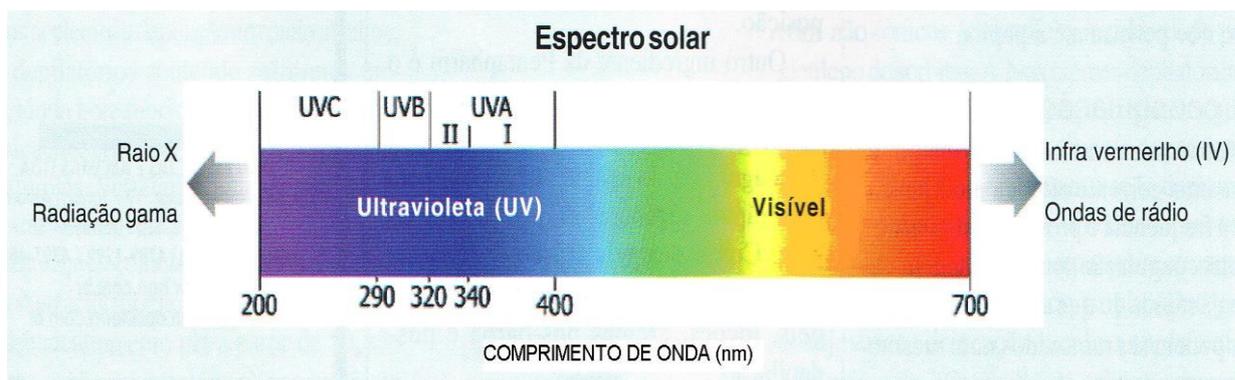


Figura 2: Representação esquemática do espectro solar (Khury et al., 2007).

Entende-se por radiação ultravioleta (radiação UV) a região do espectro eletromagnético emitido pelo sol compreendido entre os comprimentos de ondas de 200 a 400 nm, o que corresponde a apenas 5% do espectro solar, sendo, entretanto, causadora de 99% dos efeitos prejudiciais. Esta região está dividida em três faixas: ultravioleta C (UV-C), de 200 a 290 nm, ultravioleta B (UV-B), de 290 a 320 nm, ultravioleta A (UV-A), de 320 a 400 nm (Masson et al., 2003; Salgado et al., 2004, Katiyar et al., 2017).

Exposições moderadas das radiações solares, em curto prazo, podem ser causar efeitos benéficos ao organismo como o aumento da circulação sanguínea e incremento da produção de vitamina D3 por estimulação do 7-deidrocolesterol. Danos à saúde como queimaduras, hiperqueratinização, imunossupressão, envelhecimento da pele e câncer cutâneo podem ocorrer à médio e longo prazo. Neste contexto, os antioxidantes surgem como uma ferramenta para que possam reagir com os radicais livres produzidos pela radiação UV inibindo ou retardando seus efeitos nocivos (Bravo et al., 1998; Gregoris et al., 2011; Saric et al., 2016).

3. Antioxidantes

Radicais livres são moléculas instáveis que possuem um número ímpar de elétrons na última camada eletrônica, o que os torna instáveis e altamente reativos. A produção destes ocorre continuamente em todas as células vivas, como consequência de numerosos processos fisiológicos e bioquímicos gerando a

formação de espécies reativas de oxigênio (EROS). Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem normalmente nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma.

Os seres vivos aeróbios realizam processos oxidativos como consequência do consumo natural de oxigênio. Este se encontra em sua habitual forma estável, no entanto, determinadas situações como o consumo de cigarro, álcool, processos inflamatórios, radiações ionizantes e radiações ultravioleta, podem produzir espécies reativas de oxigênio que são especialmente nocivas porque tem um elétron não pareado, o que as deixa altamente instáveis e buscando o pareamento com um elétron de outra molécula para estabilizar-se (Cheeseman et al., 1993; Galvez, 2010, Gregoris et al., 2011). Por conseguinte, quando ocorre uma produção excessiva destes radicais livres ocorre o estresse oxidativo que é capaz de causar danos nas células da pele, tais como a peroxidação lipídica, desnaturação de proteínas e alterações do DNA. Os danos causados podem resultar em imunossupressão, envelhecimento prematuro da pele e desenvolvimento de câncer (Galvez, 2010; Nichols et al., 2010; Balogh et al., 2011).

Neste contexto, surgem os antioxidantes que quando presentes em baixas concentrações em comparação com os de um substrato oxidável, reduzem ou evitam a oxidação desse substrato. Eles podem prevenir a formação de radicais livres, a reparação dos danos causados por estes ou sequestra-los. Muitos produtos cosméticos disponíveis no mercado têm adicionados antioxidantes para combater os sinais de envelhecimento da pele (Oliveira et al., 2015).

Alguns estudos avaliam a sua ação na prevenção do eritema cutâneo pela determinação do valor do Fator de Proteção Solar e outros avaliam a sua proteção e efeitos contra os danos causados pelo estresse oxidativo induzido por radiação UV (Alencar et al., 2007; Farooqui et al., 2010; Galvez, 2010; Nichols et al., 2010; Balogh et al., 2011; Piccinelli et al., 2011).

A atividade antioxidante da PVB vem sendo relatada na literatura e parece estar relacionada a presença de isoflavonas (Trusheva et al., 2006; Alencar et al., 2007; Machado et al., 2016) e de benzofenonas na sua composição (Farooqui et al., 2010; Sawaia et al., 2001). Alguns dos estudos que demonstram a atividade antioxidante exercida pelo extrato da PVB estão listados na tabela 1.

Tabela 1: Exemplos de estudos demonstrando a atividade antioxidante da PVB.

Extrato e Ensaio antioxidante	Principais resultados	Referência
EHE (70%) e DPPH	Diferentes métodos cromatográficos aplicados à separação, identificação e quantificação de componentes da PVB e da Própolis Verde Brasileira. Também foi avaliada atividade antioxidante de compostos isolados da Própolis com as benzofenonas apresentando os melhores resultados.	Sawaia et al, 2010
EHE (70%) e DPPH	Foram identificados 14 novos compostos na PVB e realizados testes antioxidantes pela presença de Benzofenonas polipreniladas.	Popova et al., 2006
EHE (80%) e DPPH	O estudo avaliou amostras de diferentes tipos de própolis (vermelho, verde e marrom), coletados em diferentes regiões do Brasil. Dentre as amostras avaliadas, a própolis vermelha de Sergipe e Alagoas) apresentou o maior potencial biológico, assim como o maior teor de compostos antioxidantes.	Machado et al., 2016

EHE: Extrato hidroetanólico

Como pode ser observado, em todos os casos, os estudos foram realizados com extratos hidroetanólicos e o ensaio realizado foi o DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). Esse método baseia-se na transferência de elétrons onde, por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar, o DPPH que possui cor púrpura é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorvância.

Evidências sugerem que o extrato de própolis exerce efeito antioxidante através de diferentes mecanismos, incluindo a atividade de eliminação de radicais

livres, capacidade de doar hidrogênio e atividade quelante (Trusheva et al., 2006; Farooqi et al., 2010; Rufatto et al., 2017).

4. Nanoemulsões e Hidrogéis

Nanoemulsões são constituídas de gotículas oleosas dispersas em uma fase aquosa, estabilizadas por um sistema tensoativo e têm sido investigadas como potenciais carreadores para extratos e/ou frações de compostos bioativos oriundos de produtos de origem natural (Saraf, 2010). Esses carreadores apresentam dimensões nanométricas. Moléculas de reduzida hidrossolubilidade encontram-se preferencialmente incorporadas na fase oleosa e/ou adsorvidas na interface O/A enquanto que os mais hidrofílicos permanecem na fase aquosa externa. Assim, a incorporação de extratos vegetais pode conduzir à proteção de compostos bioativos frente à degradação, além de proporcionar maiores concentrações no local de ação devido ao aumento da solubilidade (Bidone et al., 2014; Gupta et al., 2016).

A viabilidade de incorporação dos extratos em nanoestruturas, como nanoemulsões, nanopartículas, lipossomas e agregados, foi descrita por nosso grupo de pesquisa (Carvalho et al., 2008). Bidone e colaboradores (2013) demonstraram a possibilidade de obtenção de nanoemulsões contendo até 1,0% de extrato de marcela (*Achyrocline satureioides* (Lam). DC), em resíduo seco, sendo que a partir dessas nanoemulsões foi alcançada satisfatória penetração dos marcadores quercetina e 3-O-metilquercetina até a epiderme após oito horas de estudos de penetração cutânea. Mais recentemente, Fasolo e colaboradores (2016) desenvolveram nanoemulsões contendo extrato *n*-hexânico da PVB, onde a otimização das mesmas foi realizada por meio de um experimento do tipo Box-Behnken, sendo possível obter formulações com tamanho de gotícula em torno de 140 nm e com um elevado potencial zeta. Estudos de permeação/retenção cutânea demonstraram o acúmulo das benzofenonas na estrutura cutânea e ausência de permeação desses compostos, apontando para uma possível utilização das formulações para aplicação tópica local (Fasolo et al., 2016).

Apesar de promissoras, as nanoemulsões apresentam-se como dispersões líquidas, o que representa um inconveniente quando se busca aplicação por via tópica. Neste sentido, o aumento da viscosidade da formulação é um fator importante para sua aplicabilidade, além de interferir na liberação e penetração

cutânea das moléculas (Bonina e Montenegro, 1994). Neste contexto, os hidrogéis apresentam-se como uma ótima opção, pois se assemelham ao tecido vivo. Isso ocorre devido ao seu elevado teor de água e consistência suave que é semelhante ao tecido natural. Este alto teor de água também contribui para a sua biocompatibilidade. São formulações aquosas com sensor de toque úmido e agradável, propriedades que não apresentam afinidade por gotas de óleo ou compostos lipofílicos (Ratner et al., 1976; Peppas et al., 2000).

Os hidrogéis apresentam uma estrutura hidrofílica que os torna capazes de reter grande quantidade de água em suas redes tridimensionais. Atualmente ocorre uma extensa utilização deste tipo de produto em diversas áreas industriais, devido a sua ampla gama de aplicações (Ahmed, 2015). A hidroxietil celulose (Natrosol® e Celosize®) é um polímero neutro (não iônico) que permite a obtenção de formulações semissólidas em uma ampla faixa de viscosidade e grande variação em relação ao pH e tem sido amplamente divulgado por suas propriedades de dispersão e facilidade de manipulação e aplicação sobre a pele. Além disso, possui toque mais aveludado que os Carbopóis® e tem sido recomendado para o preparo de géis em que serão incorporados derivados de plantas, devido sua elevada estabilidade (Ferrari, 2001; Fresno, 2002).

Os estudos citados na tabela 2 demonstram que a hidroxietilcelulose vem sendo utilizada entre 0,25 e 3% nas formulações. De modo geral, os estudos demonstram que uma maior concentração do polímero aumenta a viscosidade proporcionalmente e consistência da formulação, também aumentando a liberação dos componentes contidos na matriz do hidrogel.

Tabela 2 – Exemplos de estudos utilizando hidroxietilcelulose como espessante de nanoemulsões

Fármaco/Composto bioativo	HEC (%)	Referência
Própolis Verde Brasileira	1,0	Soares et al., 2009
Óleo de melaleuca e Vitamina A	0,25 e 0,5	Oliveira, 2011
Cumestrol	3,0	Argenta et al., 2011
Óleo de Copaíba	2,0	Lucca et al., 2017
Pomegranato	1,0	Nemazifard et al., 2017

Referências

Acuna, U.M.; Jankovski, N.; Kennelly, E.J. Polyisoprenylated benzophenones from Clusiaceae: potential drugs and lead compounds. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 9, 1560-1580, 2009.

Ahmed, E.M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research*. 6, 105–121, 2015.

Alencar, S.M; Oldoni, T.L.C; Castro, M.L; Cabral, I.S.R; Costa-Neto, C.M; Cury, J.A; Rosalen, P.L; Ikegaki, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*. 113, 278-283, 2007.

Almeida, E.B; Cardoso, J.C; Lima, A.K; Oliveira, N.L; Pontes-Filho, N.T; Lima, S.O; Souza, I.C.L; Albuquerque-junior, R.L.C. The incorporation of Brazilian propolis into collagen – based dressing films improves dermal burn healing. *Journal of Ethnopharmacology*. 147, 419-425, 2013.

Argenta, D.F.; Franco, C. ; Koester, L.S. ; Bassani, V. L. ; Teixeira, H.F. . LC analysis of coumestrol incorporated into topical lipid nanoemulsions. *Die Pharmazie* (Berlin). 66, 929-932, 2011.

Bae, J., Kim, S., Kannan, K., Buck Louis, G.M. Couples' urinary concentrations of benzophenone-type ultraviolet filters and the secondary sex ratio *Science of the Total Environment*. *Sci Total Environ*.543, pp. 28-36, 2016.

Balogh,T.S; Pedriali, C.A; Baby,A.R; Velasco, M.V.R; Kaneko, T.M. Ultraviolet radiation protection: current available resources in photoprotection. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. V. 86(4), 732-42, 2011.

Bidone, J.; Zorzi, G.; Carvalho, E. L.; Simões, C. M. O.; Koester, L. S; Bassani, V.L.; Teixeira, H. F. Incorporation of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC extracts in to topical nanoemulsions obtained by means of spontaneous emulsification procedure. *Industrial Crops and Products*. 62, 421–429,2014.

Bidone, J.; Argenta, D. F.; Kratz, J.; Pettenuzzo, L. F.; Horn, A. P.; Koester, L. S.; Bassani, V. L.; Simões, C. M. O.; Teixeira, H. F. Antiherpes activity and skin/mucosa distribution of flavonoids from *Achyrocline satureioides* extract incorporated into topical nanoemulsions. *Biomedical Research International*. 1-7, 2015.

Bonina, F.P.; Montenegro, L. Vehicle effects on in vitro heparin release and skin penetration from different gels. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 102, p. 19-24,1994.

Bravo, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition reviews*. 56, 317 – 333, 1998.

Castaldo, S; Capasso, F. Propolis, and old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 73, 1-6, 2002.

Cheeseman, K.H.; Slater, T.F. An introduction to free radical biochemistry, *British Medical Bulletins*. 49, 481-493, 1993.

Farooqui, T; Farooqui, A.A. Molecular Mechanism Underlyng the therapeutic activities of Propolis: A critical Review. *Current Nutrition & Food Science*. 6(3), 2010.

Fasolo, D. Desenvolvimento de nanoemulsões catiônicas contendo benzofenonas da própolis vermelha brasileira visando ao tratamento de infecções fúngicas mucocutâneas. Tese de Doutorado, UFRGS, 2016.

Fasolo, D; Bergold, A.M; von Poser, G; Teixeira, H.F. Determination of benzophenones in lipophilic extract of Brazilian red propolis, nanotechnology – based product and porcine skin and mucosa: analytical and bioanalytical assays. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 124, 57-66, 2016.

Fresno, M.J.C.; Ramírez, A.D.; Jiménez, M.M. Rheological characterization of hydroalcoholic gels — 15% ethanol — of Carbopol® Ultrez™ 10. *IL Farmaco*. 56, 437–441, 2001.

Galves, M.V. Antioxidantes en fotoproteccion, realmente funcionan?. *Actas Dermosifiliográficas*. 101(3),197–200, 2010.

Gregoris, E; Fabris, S; Bertellea, M; Grassato, L; Stevanato, R. Propolis as potential cosmeceutical sunscreen agent for its combined photoprotective and antioxidant properties. *International Journal of Pharmaceutical*. 405, 97–101, 2011.

Gupta, A.; Eral, H.B.; Hatton, T.A.; Doyle, P.S. Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Royal Society of chemistry*. 12, 2826-2841, 2016.

Jacob, A.; Parolia, A.; Pau, A.; Amalraj, F.D. The effect of Malaysian propolis and Brazilian red propolis on connective tissue fibroblasts in the wound healing process. *Bio Med Central, Complementary & Alternative Medicine*. 15294, 2015.

Katiyar, S.K.; Pala, H.C.; Prasada, R. Dietary proanthocyanidins prevent ultraviolet radiation-induced nonmelanoma skin cancer through enhanced repair of damaged DNA-dependent activation of immune sensitivity. *Seminars in Cancer Biology*. 2017.

Kotnik, K.; Kosjek, T.; Zegura, B.; Filipic, M.; Heath, E. Photolytic fate and genotoxicity of benzophenone-derived compounds and their photodegradation mixtures in the aqueous environment. *Chemosphere*. 147, 114–123, 2016.

Khury, E.; Nakano, A. Novo método para avaliar protetores solares UVA. *Cosmet. Toiletries*, v. 19, n 3, p. 116-119, 2007.

López, B.G.; Schmidt, E.M.; Eberlin, M.N.; Sawaya, A.C. Phytochemical markers of different types of red propolis. *Food Chemistry*.146: 174-180, 2014.

Lucca, L.G. Matos, S.P. Kreutz, T. Teixeira, H.F. Veiga Jr, V.F. Araujo, B.V. Limberger, R.P. Koester, L.S. Anti-inflammatory Effect from a Hydrogel Containing Nanoemulsified Copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne). *American Association Pharmaceutical Scientists*, 19(2):522-53, 2017.

Machado, B.A.S.; Silva, R.P.D. ; Barreto, G.A.; Costa, S.S.; Silva, D.F.; Brandão, H.N.; Rocha, J.L.C.; Dellagostin, O.A.; Henriques, J.A.P.; Umsza-Guez, M.A.; Padilha, F.F. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Própolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. *Plos One*. 1-26, 2016.

Nemazifard, M. Kavooosi, G. Marzban, Z. Ezedi, N. Physical, mechanical, water binding, and antioxidant properties of cellulose dispersions and cellulose film incorporated with pomegranate seed extract. *Internatinal Journal of Food Properties*. 20, 1501-1514, 2017.

Nichols JA, Katiyar SK. Skin photoprotection by natural polyphenols: antiinflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of Dermatological Reearch*.302, 71-83, 2010.

Oliveira, J. S., Aguiar, T. A., Mezdari, H., Dos Santos, O. D. H. Attainment of hydrogel-thickened nanoemulsions with tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) and retinyl palmitate. *African Journal of Biotechnology*. V. 10, Issue 60, 13014-13018, 2011.

Oliveira, C.A.: Peres,D.D.:Rugno, C.M.; Kojima, M.; Pinto,C.A.S.O.; Consiglieri, V.O.; Kaneko, T.M.; Rosado, C.; Mota,J. Velasco, M.V.R.; Baby, A.R.Funtional photostability and cutaneous compatibility of bioactive UVA. *Journal of Photochemistry and photobiology B: Biology*.148, 154-159, 2015.

Park, Y.K.; Ikegaki, M., Alencar, S.M.; Moura, F.F.Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. *Honeybe Science*. 21, 85–90,2000.

Peppas, N. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 50, 27-46, 2000.

Petrova, A.; Popova, M.; Kuzmanova, C.; Tsvetkova, I.; Naydenski, H.; Muli, E.; Bankova, V. New biologically active compounds from Kenyan propolis. *Fitoterapy*. 81, 509-514, 2010.

Piccinelli, A.L; Lotti, C; Campone, L; Cuesta-Rubio, O; Fernandez, M.C; Rastrelli, L. Cuban and Brazilian Red Propolis: Botanical Origin and Comparative Analysis by High-Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detection/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59, 6484-6491, 2011.

Ratner, B.D. Hoffman, A.S. Synthetic hydrogels for biomedical applications, in: J.D. Andrade (Ed.), *Hydrogels for Medical and Related Applications*, ACS Symposium Series, No. 31, *American Chemical Society, Washington, DC*. 1-36, 1976.

Soares, R. G. Furtado, V.A. Ramos, P. L. Moreira, L.M. Preparation of a sunscreen and evaluation of the photoprotective action of the green propolis from Vale do Aço, Minas Gerais, Brazil. *Bolem Latino Americano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*. 8, 282 – 288, 2009.

Rufatto L.C; Santos, D.A.; Marinho, F.; Henriques, J.A.P.; Ely, M.R.; Moura, S. Red propolis; Chemical composition and pharmacological activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 7, 591–598, 2017.

Saric, S.; Sivamani, R.K. Polyphenols and Sunburn. *International Journal of Molecular Sciences*. 17,1521, 2016.

Sawaya, A.C.H.F; Cunha, I.B.S; Marcucci, M.C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chemistry Central Journal*. 5:27, 2011.

Tang, Y; Yuxuan, Z; Jinliang, Y; Jun, N. Synthesis and characteristics of photopolymerized benzophenone. *Polymer Chemistry*. 55, 313–320, 2017.

Trusheva, B.; Popova, M.; Naydensky, H.; Tsvetrova, V.; Rodriguez, J.G.; Bancova, V. New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. *Fitoterapy*. 75, 683-689, 2004.

Trusheva, B; Popova, M; Bankova, V; Simona, S; Marcucci, M.C; Miorin, P.L; Pasin, F.R; Tsvetkova, I. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. Oxford University Press. 3(2), 249-254, 2006.

CAPITULO II

Parte experimental

Atividade antioxidante de hidrogéis contendo benzofenonas da própolis vermelha brasileira incorporadas em nanoemulsões

L. F. Correa^a, G. Meirelles^a, R. Schuh^a, L.A. Balestrin^a, P.O. Souza^b, J.C. Moreira^b, G.L. von Poser^a, and H.F. Teixeira^{a*}

^a Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 90610-000, Brazil.

^b Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.

*Endereço de correspondência:

Avenida Ipiranga, 2752, CEP: 90610-000 Porto Alegre/RS, Brasil.

Telephone number: +55 51 33085090; fax: +55 51 33085437

e-mail: helder.teixeira@ufrgs.br

1. Introdução

A pele é um órgão complexo formado por diferentes estruturas atuando como uma barreira protetora dos órgãos internos ao ambiente. Uma produção excessiva de radicais livres, gerados pela exposição da pele especialmente a agentes físicos, como a luz ultravioleta, pode levar a um quadro de estresse oxidativo. Os radicais livres gerados podem causar danos nas células que compõem a pele como a peroxidação lipídica, desnaturação de proteínas e alterações no DNA. Estudos relacionam os danos causados pelos radicais livres ao envelhecimento e desenvolvimento de câncer de pele (Galvez, 2010; Nichols et al., 2010; Balogh et al., 2011).

O uso de extratos ou compostos isolados de produtos naturais com atividade antioxidante tem sido considerado na prevenção e terapia de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (Parejo et al., 2003; Silva et al., 2005). Neste sentido, a própolis, uma resina natural e complexa constituída por ceras, açúcares e exsudatos, tem se destacado. Essa resina é produzida por abelhas (*Apis mellifera* L.) através da coleta de secreções de diferentes partes de plantas e modificadas por enzimas salivares das próprias abelhas (Farroqui et al., 2010; Sawaya et al., 2011; Rufatto et al., 2017). No Brasil existem treze tipos de própolis identificados pelas suas características físico-químicas, origem geográfica e flora (Alencar et al., 2007; trusheva et al., 2007; Fasolo et al., 2016). O último tipo, identificado no estado de Alagoas, foi denominado de Própolis Vermelha Brasileira (PVB) devido à sua coloração. A PVB foi descoberta em colmeias ao longo das linhas costeiras da região Nordeste do Brasil, onde foram encontrados exsudatos vermelhos na superfície das espécies vegetais *Dalbergia ecastophyllum* (L.) (Fabaceae) que é a principal fonte de resina para a produção da PVB (Piccinelli et al., 2011; Jacob et al., 2015; Parolia et al., 2015; Rufatto et al., 2017).

A PVB tem uma composição complexa, sendo especialmente relatada a presença de compostos fenólicos. Alguns estudos têm relatado a presença de benzofenonas polipreniladas em extratos alcoólicos e *n*-hexânico de PVB (Monzote et al., 2011; Piccinelli et al., 2011; Fasolo et al., 2016), sendo identificadas a guttiferona E, xanthoquimol e oblongifolina A (Figura 1). A presença destas substâncias indica que as abelhas utilizam espécies de *Clusia* (Clusiaceae) na

produção desse tipo de própolis, uma vez que benzofenonas polipreniladas são abundantes nesses vegetais. Esses compostos apresentam diferentes atividades biológicas, incluindo a atividade antioxidante (Farooqui et al., 2010; Sawaya et al., 2011; Rufatto et al., 2017). Fasolo e colaboradores (2016) validaram um método de CLAE/UV para a determinação quantitativa de benzofenonas totais da PVB, expressas em garcinol que é um diastereoisomero da BZP Guttiferona E.

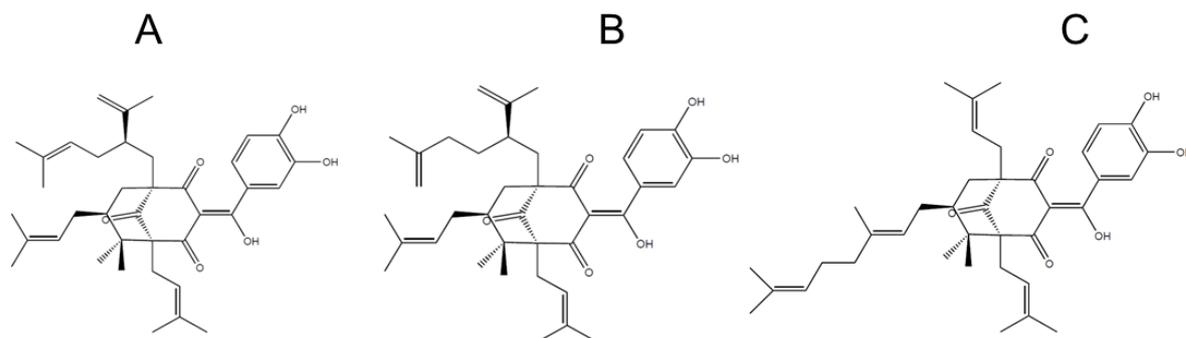


Figura 1. Estrutura química das BZP identificadas na PVB: gutiferona E (A), xantochimol (B) e oblongifolina A (C).

Devido a reduzida solubilidade das benzofenonas da PBV, nosso grupo de pesquisa recentemente descreveu a otimização da incorporação desses compostos em nanoemulsões de uso tópico, através de um delineamento experimental do tipo Box-Benkhen Design (Fasolo et al., 2018). Nanoemulsões são dispersões de gotículas oleosas dispersas uma fase aquosa, estabilizadas por um sistema tensoativo que têm sido investigadas como potenciais carreadores para extratos e/ou frações de compostos bioativos oriundos de produtos de origem natural (Saraf, 2010). Esses carreadores apresentam dimensões nanométricas, geralmente entre 100 a 300 nm, e são capazes de carrear compostos lipofílicos incorporados preferencialmente na fase oleosa e/ou adsorvidos na interface O/A. Assim, a incorporação de compostos pode conduzir à proteção de compostos bioativos frente à degradação, além de proporcionar maiores concentrações no local de ação devido ao aumento da solubilidade (Bidone et al., 2014; Gupta, et al., 2016).

Apesar das vantagens apresentadas pelas nanoemulsões, a apresentação como dispersões líquidas representa um inconveniente quando se busca a aplicação

tópica. Nesse contexto, a adequação da viscosidade da formulação para uso tópico é um fator importante para sua aplicabilidade, além de interferir na liberação e penetração cutânea das moléculas (Bonina e Montenegro, 1994). Neste contexto, o propósito deste estudo foi desenvolver hidrogéis de hidroxietilcelulose contendo um extrato de PBV incorporado em nanoemulsões, visando o desenvolvimento de um produto de uso tópico com atividade antioxidante.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

Própolis vermelha Brasileira PVB (Natucentro, Brasil); *n*-hexano (Neon, Brasil); acetona (Neon, Brasil); Etanol (Exodo, Brasil); 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP) (Lipoid, Alemanha); Lecitina E80 (Lipoid, Alemanha); Miristato de isopropila (MIP) (Delaware, Brasil); Hidroetilcelulose (Natrosol®) (Pharma nostra, Brasil); Metanol (J. T. Barker, USA); Acetonitrila (J. T. Barker, USA); Pele de orelha Suína (Cooperativa Ouro do Sul (Rio Grande do Sul, Brasil).

2.2. Métodos

2.2.1. Preparação do extrato *n*-hexânico

O extrato *n*-hexânico da PVB foi obtido por maceração do material seco por 72 h (por três vezes) na proporção de solvente de 1:10 (m/v), de acordo com o descrito previamente por Fasolo et al. (2016). Os extratos foram então combinados e evaporados até *secura* sob pressão reduzida utilizando um evaporador rotatório a temperatura 40°C. O resíduo foi tratado na sequência com acetona fria para a remoção de ceras e obtenção de um resíduo lipídico. A fração solúvel em acetona foi evaporada até à *secura* e utilizada nos diferentes experimentos.

2.2.2. Análise do teor de BZP no extrato de PVB

O teor de BZP foi determinado por Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência (CLAE) com detecção no ultravioleta, conforme recentemente descrito por Fasolo et al. (2016). Para tanto, foi utilizada coluna cromatográfica de fase reversa C₁₈ (Shim-pack ODS, Shimadzu, Kyoto, Japan) 250 x 4,6 mm, 5 µm. A separação foi realizada sob eluição isocrática com metanol: acetonitrila (80:20, v/v) com tempo de corrida de

10 min à temperatura ambiente. Os parâmetros do sistema foram os seguintes: taxa de fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL, comprimento de onda de detecção a 260 nm. Para injeção, as amostras (extratos, nanoemulsões contendo o extrato e pele) foram solubilizados previamente em metanol e o conteúdo de BZP totais (somatório de gutiferona E, xantochimol e oblongifolina A) foi expresso em garcinol, partindo de uma curva de linearidade desta benzofenona.

2.2.3. Obtenção das nanoemulsões e hidrogéis derivados

As nanoemulsões foram obtidas pelo método da emulsificação espontânea. Os componentes do núcleo oleoso (miristato de isopropila, lecitina de gema de ovo e DOTAP) (NE/DT) foram dissolvidos em etanol, e o extrato de própolis em acetona. Após, a fase orgânica foi vertida sobre a fase aquosa (água purificada) sob moderada e constante agitação magnética. Após 15 minutos, a formulação foi concentrada até 10 mL por evaporação sob pressão reduzida a 40°C. Da mesma forma, também foi obtida uma formulação isenta do lipídeo catiônico, DOTAP (NE), para fins de comparação. Os hidrogéis foram preparados adicionando-se diretamente o agente gelificante hidroxietilcelulose nas nanoemulsões (gerando as formulações semissólidas codificadas como H-NE/DT e H-NE). Como controle foram utilizados gel natrosol contendo o extrato de PVB, hidrogel branco com (H-NE/DTb) e sem DOTAP (HNEb). A composição final das formulações está apresentada na tabela 1.

Tabela 1. Composição final (% , m/m) das formulações.

	NE	H-NE	H-NEb	NE/DT	H-NE/DT	H-NE/DTb
Extrato de PVB^a	0,34	0,34	-	0,34	0,34	-
MIP	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00
Lecitina	1,82	1,82	1,82	1,82	1,82	1,82
DOTAP	-	-	-	0,20	0,20	0,20
Natrosol	-	1,00	1,00	-	1,00	1,00
Água q.s.p.	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

(a) O teor de BZP totais no extrato de PBV foi de cerca de 25%

2.2.4. Caracterização das formulações

Diâmetro médio de gotícula, índice de polidispersão e potencial zeta

As formulações foram caracterizadas pelo tamanho médio de gotícula e índice de polidispersão, através da espectroscopia de correlação de fótons, após previa diluição das amostras em água purificada, à 25°C. O potencial zeta foi determinado pela mobilidade eletroforética e as análises foram realizadas em triplicata após previa diluição das amostras em NaCl 1 mM, à 25°C. Essas análises foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano-ZS90® (Malvern Instruments, Inglaterra).

Morfologia por microscopia eletrônica de transmissão

Para avaliação morfológica das nanoemulsões dispersas nos hidrogéis foi utilizada microscopia eletrônica de transmissão (MET). As amostras foram previamente diluídas em água na proporção 1:20 (hidrogel:água) e distribuídas em suporte metálico (200 mesh) de cobre com revestimento de Formvar® e carbono. Como contraste, foi utilizado o acetato de uranila (2%), onde a amostra permaneceu em contato por 24 horas.

Determinação do pH

Determinação do pH das formulações foi realizada em potenciômetro com eletrodo para microvolumes (Digimed®), previamente calibrado.

Avaliação da viscosidade

A avaliação da viscosidade dos géis foi realizada utilizando o equipamento Brookfield RVDV II equipado com spindle n° 21 a aproximadamente 23°C. Os resultados foram apresentados através da relação entre taxa e tensão e de cisalhamento.

Avaliação da estabilidade das formulações

Os estudos de estabilidade das formulações foram realizados a partir da avaliação das propriedades físico-químicas (tamanho médio de gotícula, índice de

polidispersão, potencial zeta, pH e teor de BZP totais) por 90 dias e armazenamento à 4°C. O teste foi realizado em triplicata.

2.2.5. Estudos de permeação/retenção cutânea

Para avaliação da permeação/retenção cutânea do extrato de PVB a partir dos hidrogéis (H-NE e H-NE/DT), foi utilizado n=6, e equipamento de células de difusão do tipo Franz (DIST, Brasil). Primeiramente, cortes circulares de pele de orelhas suínas foram hidratados com tampão fosfato (PBS) e dispostos sobre o compartimento receptor da célula (2,54 cm²). A temperatura foi ajustada a 32 ± 1 °C, e o compartimento receptor preenchido com um fluido adequado composto de PBS pH 7.0 e etanol na proporção 70:30 (v/v), sob agitação constante.

As formulações (500 µL) foram então adicionadas no compartimento doador e após 1, 2 e 8 horas de experimento, alíquotas (1 mL) foram coletadas do compartimento receptor a fim de avaliar a taxa de permeação cutânea das amostras. Ao final do ensaio, após limpeza dos cortes e retirada da formulação remanescente, a extração das benzofenonas a partir da pele foi realizada pela adição de metanol (5 mL) em banho de ultrassom durante 30 minutos a fim de avaliar a retenção das formulações sobre a pele. As amostras foram, então, avaliadas de acordo com o teor de BZP totais em CLAE utilizando a metodologia analítica descrita na seção 2.2.2. Para fins de comparação, também foi preparada uma formulação controle composta por extrato *n*-hexânico de PVB incorporada no hidrogel.

2.2.6. Estudo da atividade antioxidante

A fim de avaliar a capacidade protetora das formulações frente a radiação UVA e UVB, peles de orelha suína foram tratadas com H-NE, H-NEb, H-NE/DT e H-NE-DTb e controle (100 mg por 2,54 cm²). Amostras de pele não tratada sem a exposição à UVA/UVB (NIST) e submetidas à exposição UVA/UVB (IST) foram utilizadas como controle. As amostras foram dispostas em placas sobre papel filtro e algodão embebido em água, e então expostas às radiações UVA/UVB por um período de 5 horas.

Após o tempo de exposição, as amostras foram lavadas, homogeneizadas em Ultraturrax® com fosfato (PBS) pH 7,4, centrifugadas e congeladas para posteriores avaliações. Hidrogéis contendo nanoemulsões sem o extrato de PVB e o hidrogel contendo o extrato de PBV foram utilizados. Todos os resultados foram expressos em proteínas totais, determinadas pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951), utilizando albumina de soro fetal bovino como padrão. O valor obtido nesta quantificação foi utilizado para normalizar os resultados obtidos em todos os ensaios redox.

Determinação de Proteínas Carboniladas

O ensaio para determinação de proteínas carboniladas foi realizado como descrito por Levine et al. (1990). As proteínas carboniladas das amostras de pele foram precipitadas pela adição de 300 µL de ácido tricloroacético a 20% (na proporção de 1:1). Após centrifugação, o *pellet* formado foi ressuscitado em 300 µL de NaOH 2M e acrescido 300 µL de 2,4-dinitrofenil-hidrazina DNPH 10 mM, responsável pela coloração amarela. Após, o material foi centrifugado e o *pellet* lavado três vezes com uma mistura de etanol/acetato de etila 1:1 (para evitar reação dos reagentes utilizados com a ureia que será adicionada), e ressuscitado com uma solução de ureia 8M pH 2,3. Em seguida, a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 370 nm.

Determinação de Tióis totais (t-SH)

Neste ensaio, a reação do ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) com grupamentos SH, forma um composto amarelo que pode ser quantificado por espectrofotometria. Como descrito por Ellman (1959), uma alíquota de cada amostra foi diluída previamente em tampão PBS (pH 7,4) e adicionou-se DTNB às amostras. Após 60 minutos de reação, a intensidade da coloração amarela formada foi quantificada em espectrofotômetro a 412 nm.

Lipoperoxidação (TBARS)

A lipoperoxidação foi determinada pela avaliação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nas peles conforme metodologia descrita por Draper E hadley (1990). Primeiramente, aos homogeneizados de pele foi

adicionada uma solução de ácido tricloroacético (concentração final de 50 %) para a hidrólise dos lipoperóxidos da pele, e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi adicionada a 100 µL de ácido tiobarbitúrico a 0,67%, e aquecida em *dryblock* por 20 minutos. A absorbância foi determinada por espectrofotômetro a um comprimento de onda de 532 nm.

3. Resultados e Discussão

3.1. Preparação e caracterização das formulações

Como descrito anteriormente, a otimização da composição qualitativa e quantitativa das nanoemulsões foi descrita pelo nosso grupo de pesquisa (Fasolo et al., 2016). Essa otimização permitiu identificar a melhor combinação que conduz ao menor tamanho de gotícula, maior potencial zeta e eficiência de associação de BZP com as nanoemulsões. A tabela 2 apresenta os resultados de caracterização físico-química. Os resultados obtidos para as nanoemulsões está em acordo com relatos da literatura de nanoemulsões obtidas por emulsificação espontânea (Bidone et al., 2015; Balestrin et al., 2016; Fasolo et al., 2016; Argenta et al., 2018).

O emprego de hidrogéis na área farmacêutica tem sido uma escolha para a administração tópica de fármacos, uma vez que apresentam um elevado teor de água, são biocompatíveis, laváveis e não apresentam aspecto gorduroso sobre a pele, promovendo, assim, uma maior aceitação pelo paciente (Corrêa et al., 2005; Peppas et al., 2009). A incorporação de hidroxietilcelulose 1% (H-NE e H-NE/DT) conduziu a um aumento significativo tukey ($p < 0,05$) do diâmetro médio de gotícula e do índice de polidispersão, quando comparadas as formulações líquidas (NE e NE/DT), demonstrando a influência do polímero gelificante nas características da formulação. Esses resultados podem estar relacionados com a adsorção do polímero na interface O/A das nanoemulsões (Souto et al., 2004; Lucca et al., 2017).

A avaliação morfológica das nanoemulsões por MET utilizando contraste negativo confirmou a dimensão das gotículas dispersas observadas por espectroscopia de correlação de fótons. Como se observa na figura 2, os hidrogéis H-NE/DT apresentaram tamanho de partícula inferior a 200 nm corroborando os resultados obtidos na caracterização físico-química. As gotículas apresentam forma esférica com borda bem definida (Figura 2a). Em contrapartida, os hidrogéis

contendo as formulações NE (H-NE) apresentaram gotículas com tamanho próximo a 300 nm (Figura 2b), provavelmente em função da ausência de tensoativo catiônico. Esse parece influenciar o diâmetro da gotícula e o índice de polidispersão das formulações, pois quanto menor é o diâmetro de gotícula e PDI mais homogênea é a formulação (El-Aneed et al, 2004).

Tabela 2. Propriedades físico-químicas das nanoemulsões (NE e NE/DT) e hidrogéis (H-NEe H-NE/DT)

	NE**	H-NE**	H-NEb*	NE/DT	H-NE/DT	H-NE/DTb)*
Diâmetro médio (nm)	172.3±2.96 ^a	280.2±5.85 ^{ac}	286,1±3,30	152.3±1.95	181.5±3.01 ^c	183,4±1,41
Potencial zeta (mV)	-47,9±1,70	-41.1±2,35	-43,0±0.90	41.1±1,94	36,9±2,09	34,9±1,03
Índice de polidispersão	0,188±0,02 ^b	0,284±0,03 ^{bd}	0,276±0,24	0,152±0,02	0,215±0,01 ^d	0,220±0,01
pH	5,4 ±0,15	5,4±0,14	5,35±0,21	5,2±0,23	5,2±0,15	5,2±0,22
Teor de benzofenonas (mg/g)#	0,85±0,02	0,86±0,05	-	0,87±0,03	0,86±0,01	-

*Formulações que não contem extrato *n*-hexânico de PVB

**Formulações que não contem DOTAP

Considerando a incorporação de 0,34% extrato de PVB. Hidrogéis foram obtidos com a adição de 1% de natrosol diretamente na nanoemulsão.

^a Aumento significativo tukey ($p < 0,05$) entre os parâmetros analisados.

^b Aumento significativo tukey ($p < 0,05$) entre os parâmetros analisados.

^c Aumento significativo tukey ($p < 0,05$) entre os parâmetros analisados.

^d Aumento significativo tukey ($p < 0,05$) entre os parâmetros analisados.

#mg de extrato por g de formulação

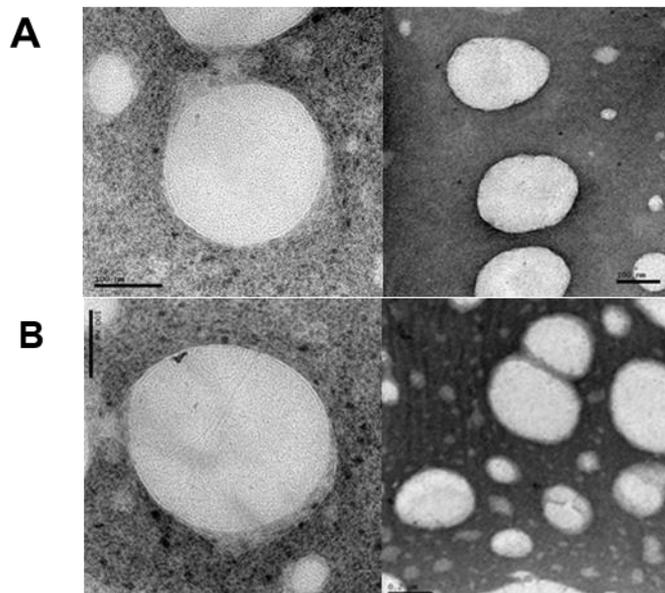


Figura 2. Imagens das nanoemulsões contendo o extrato de PBV incorporadas em hidroxietilcelulose 1%, obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET): H-NE/DT (A) de 100-200 nm e H-NE (B) de 200-300 nm.

As formulações NE e H-NE apresentaram potencial zeta negativo devido a presença de fosfolípidos de carga negativa e ácidos graxos livres da lecitina de gema de ovo (Fasolo et al., 2016). A adição do tensoativo catiônico DOTAP conduz a uma inversão do potencial zeta para valores positivos (NE/DT, H-NE/DT) devido ao fato desses tensoativos apresentarem um grupamento amônio quaternário que deve estar localizado na interface O/A das nanoemulsões (El-Aneed et al., 2004; Fasolo al., 2016). Ainda, observa-se uma tendência de redução dos valores de potencial zeta nas formulações que contém o polímero hidroxietilcelulose devido a sua provável localização da interface das formulações.

O pH de ambas formulações manteve-se em torno de 5,30. Este pH é próximo ao da pele que normalmente é levemente ácido (4,6 - 5,8). É importante a preservação deste manto ácido da pele, pois se comporta como uma barreira a entrada de agentes externos como microrganismos (Parra et al., 2003).

O teor de BZP para H-NE e H-NE/DT foi de aproximadamente 0,85 mg/g, avaliado como teor de benzofenonas totais, expresso em garcinol. De acordo com a figura 3, é possível verificar no pico do tempo de retenção de cerca de 6,0 minutos das benzofenonas do extrato lipofílico (*n*-hexânico), sendo identificadas como benzofenonas polipreniladas (guttiferona E, xanthoquimol e oblongifolina A). Em nosso grupo de pesquisa, Fasolo e colaboradores (2016) confirmaram a presença dessas benzofenonas na PVB.

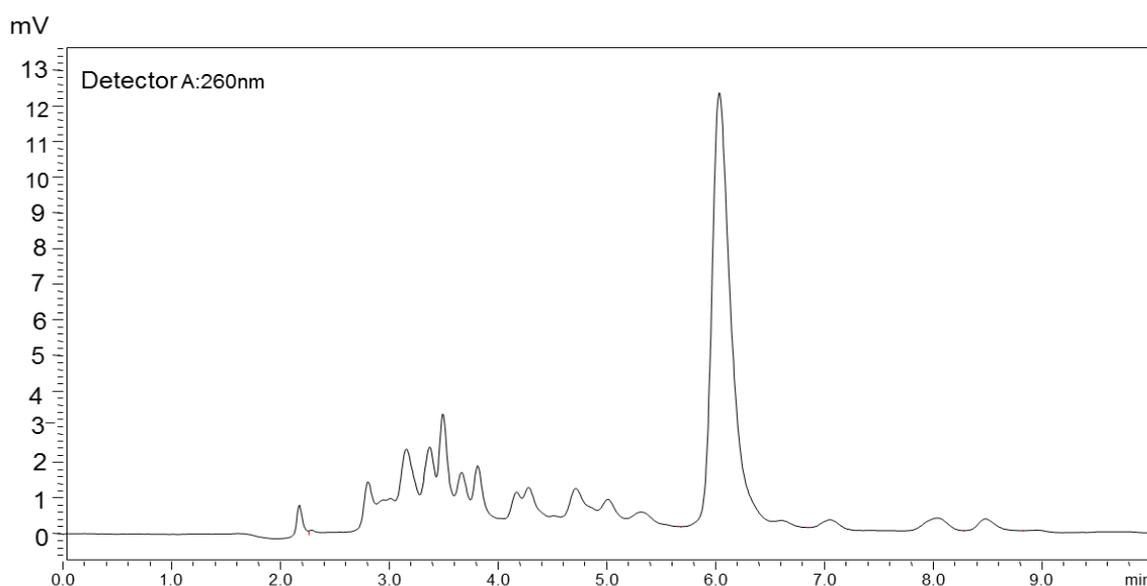


Figura 3: Perfil cromatográfico do extrato *n*-hexânico de PVB em método HPCL/UV. A separação foi realizada sob eluição isocrática com metanol: acetonitrila (80:20, v/v) com tempo de corrida de 10 min à temperatura ambiente. Os parâmetros do sistema foram os seguintes: taxa de fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 20 μ L, comprimento de onda de detecção a 260 nm.

A fim de avaliar preliminarmente a estabilidade físico-química, as formulações (H-NE e H-NE/DT) foram armazenadas em refrigerador (4 °C) e alguns parâmetros físico-químicos foram avaliados: diâmetro de gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta e teor de BZP. Os resultados estão apresentados na tabela 3. A caracterização físico-química de diferentes lotes avaliados indica que as formulações são estáveis em refrigeração por 60 dias considerando que os parâmetros avaliados permaneceram constantes. Após 90 dias de armazenamento, entretanto, um aumento significativo ($p < 0,05$) do diâmetro e índice de polidispersão foi detectado.

Esses resultados indicam que a presença do lipídeo catiônico DOTAP nas formulações (H-NE/DT) contribui favoravelmente para a manutenção do diâmetro e índice de polidispersão das formulações ao longo do período avaliado, de acordo com a literatura (El-Aneed et al, 2004; Saetern et al., 2005). Por fim, cabe salientar, que mesmo para as formulações da série H-NE após 90 dias e armazenamento não foi evidenciada coalescência ou separação de fases das formulações.

Tabela 3. Caracterização físico-química e teor de BZP dos hidrogéis H-NE e H-NE/DT em função do tempo de armazenamento à 4°C.

	Tempo (min)	DP	PZ	IPD	pH	Teor
H-NE	0	281±5,85	-39,1±0,50	0,277±0,03	5,33±0,15	0,85±0,14
	3	278±2,80	-38,6±0,35	0,274±0,02	5,23±0,11	0,86±0,20
	7	279±0,23	-38,8±0,38	0,285±0,35	5,40±0,20	0,85±0,16
	15	272±5,87	-39,3±0,46	0,278±0,01	5,38±0,30	0,86±0,05
	30	278±2,31	-38,8±0,50	0,279±0,01	5,41±0,10	0,72±0,01
	60	291±5,01 ^a	-38,2±1,90	0,305±0,10 ^b	5,45±0,22	0,74±0,05
	90	315±3,02 ^a	-44,3±4,33	0,310±0,42 ^b	5,51±0,15	0,80±0,08
H-NE/DT	0	184±3,45	36,9±1,59	0,214±0,01	5,13±0,15	0,86±0,04
	3	183±2,61	36,3±1,90	0,211±0,03	5,16±0,15	0,86±0,12
	7	181±2,94	36,8±2,81	0,215±0,03	5,23±0,3	0,87±0,07
	15	182±2,33	36,1±1,85	0,216±0,01	5,21±0,20	0,87±0,04
	30	184±3,86	37,5±0,40	0,216±0,05	5,23±0,12	0,85±0,32
	60	186±0,75	36,3±1,40	0,215±0,01	5,25±0,24	0,82±0,22
	90	200±4,55 ^a	36,5±0,50	0,223±0,23	5,30±0,16	0,86±0,18

DP (diâmetro da partícula), PZ (potencial zeta), PDI (índice de polidispersão), pH (potencial hidrogeniônico) e teor (teor de BZP na formulação) para as formulações H-NE (hidrogel com extrato de PVB sem DOTAP) e H-NE/DT (hidrogel com extrato de PVB com DOTAP).

^aAumento significativo tukey (p<0,05) entre os demais resultados para o mesmo parâmetro analisado DP.

^bAumento significativo tukey (p<0,05) entre os demais resultados para o mesmo parâmetro analisado IPD.

De modo geral, os hidrogéis possuem comportamento reológico do tipo pseudoplástico, ou seja, deformam-se durante a aplicação, tornando-se mais fluidos, facilitando o espalhamento e recuperando a viscosidade inicial no momento que encerra a aplicação, o que evita que o produto escorra.

A Figura 4 demonstra o perfil reológico dos hidrogéis H-NE e H-NE/DT. Os reogramas demonstram que os hidrogéis desenvolvidos apresentam comportamento não-Newtoniano, uma vez que a relação entre tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento é não linear. Entre os fluidos não-Newtonianos, existem três comportamentos: plástico, pseudoplástico ou dilatante. De acordo com os resultados obtidos, os hidrogéis produzidos apresentam características pseudoplásticas, pois em repouso, apresentam suas moléculas em um estado desordenado, e quando submetidas a uma tensão de cisalhamento, suas moléculas tendem a se orientar na direção da força aplicada. E quanto maior esta força, maior será a ordenação e, conseqüentemente, menor será a viscosidade aparente (Beck et al, 2011; Lucca et al., 2017).

O H-NE/DT apresentou maior viscosidade em relação a H-NE. Este fato pode estar relacionado à presença do tensoativo catiônico DOTAP, pois a formulação H-NE/DT apresenta um menor tamanho de partícula em relação a H-NE, o que poderia aumentar a sua viscosidade (Ishii et al., 1990) em virtude do aumento das interações interparticulares dos polímeros.

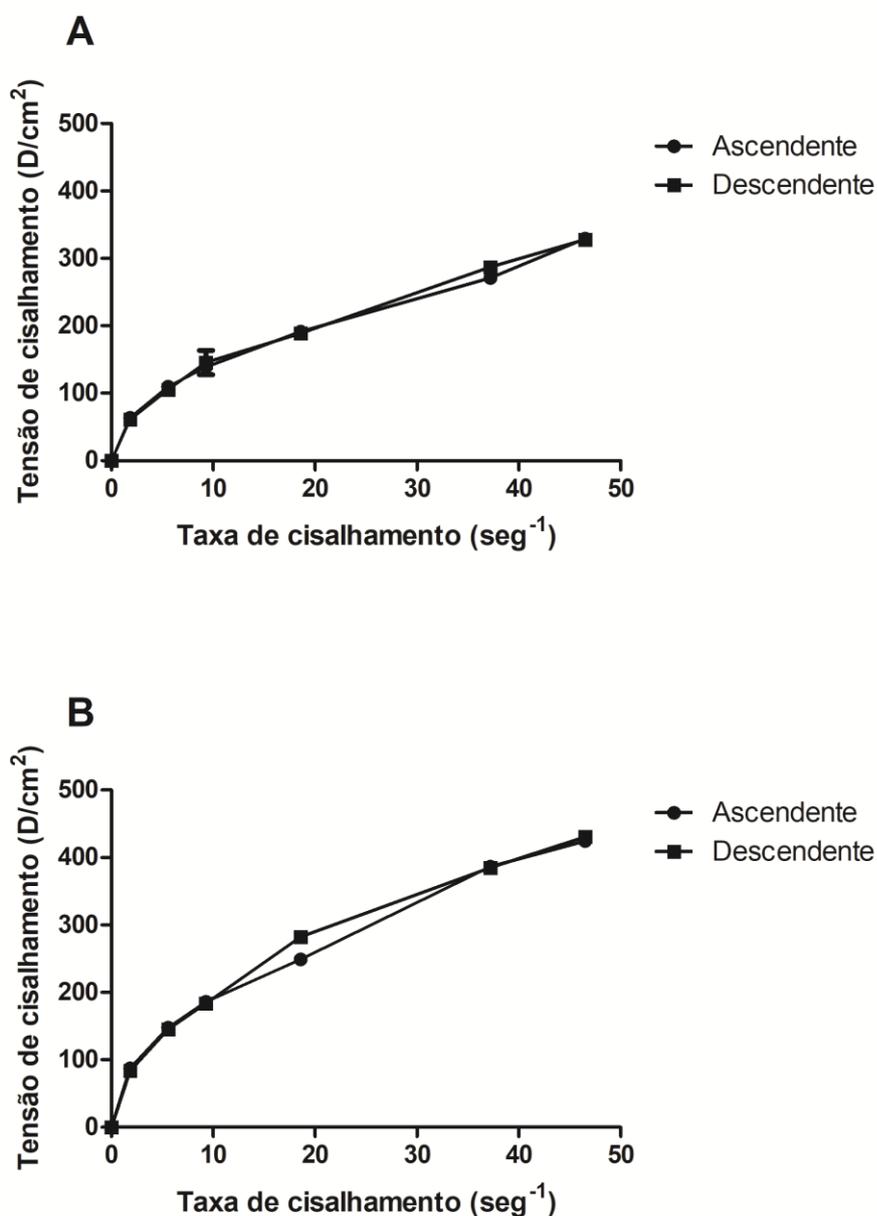


Figura 4: Avaliação reológica do hidrogel contendo NE (A) e NE/DT (B).

3.2. Estudo de permeação/retenção cutânea

A análise da permeação/retenção cutânea das BZP a partir dos hidrogéis foi realizada em diferentes tempos: 1, 2 e 8 horas. Estes tempos foram escolhidos visando verificar se em curto período de tempo já seria possível quantificar as BZP contidas nas formulações. Os resultados estão dispostos na tabela 4.

Desde a primeira hora de experimento, foi detectada a retenção das BZP na pele para as formulações analisadas: H-NE ($4,00 \pm 2,46 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), H-NE/DT ($8,81 \pm 2,21 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) e controle ($4,07 \pm 0,56 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). A medida que o tempo transcorreu, um aumento progressivo da retenção das BZP foi observado até 8 horas, atingindo até $18,11 \pm 1,10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para a formulação HNE-DT. Esses resultados demonstram que o hidrogel contendo a formulação catiônica (H-NE/DT) possui retenção cutânea 29% maior do que a formulação isenta deste lipídeo catiônico (H-NE) e 80% superior em relação ao controle. Estes resultados podem ser explicados em virtude das células epiteliais apresentarem cargas negativas em sua superfície. Assim sendo, os epitélios podem ser seletivos a sistemas de entrega positivamente carregados, que interagem com as células aumentando a permeabilidade de fármacos (Pieira et al, 2007). Não foi detectada BZP no fluido receptor em nenhuma das análises realizadas.

Tabela 4. BZP ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) retidas na pele de orelha suína a partir das formulações (H-NE, H-NE/DT e controle) em função do tempo.

Tempo (h)	BZP ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)		
	H-NE	H-NE/DT	Controle**
1	$4,00 \pm 2,46$	$8,81 \pm 2,21^{ac}$	$4,07 \pm 0,56$
2	$11,26 \pm 1,92^e$	$13,87 \pm 2,07^f$	$5,37 \pm 0,54$
8	$14,27 \pm 0,66$	$18,11 \pm 1,10^i$	$10,41 \pm 1,75$

**Controle= gel natrosol contendo o extrato de PVB

Existe diferença estatística (Tukey, $p > 0,05$) para o tempo de: a. 1 h entre H-NE e H-NE / DT; b. 1 h entre H-NE e Controle; c. 1 h entre H-NE/DT e Controle; d. 2 h entre H-NE e H-NE/DT; e. 2 h entre H-NE e Controle; f. 2 h entre H-NE/DT e Controle; g. 8 h entre H-NE e H-NE/DT; h. 8 h entre H-NE e Controle; i. 8 h entre H-NE / DT e Controle ($p \leq 0,05$).

3.3. Estudo da atividade antioxidante

A capacidade de proteção da pele pelas formulações, quando induzida por radiação UV, foi avaliada através da análise de diferentes parâmetros de oxidação (proteínas carboniladas, formação de grupos sulfidril e TBARS) (Figura 5).

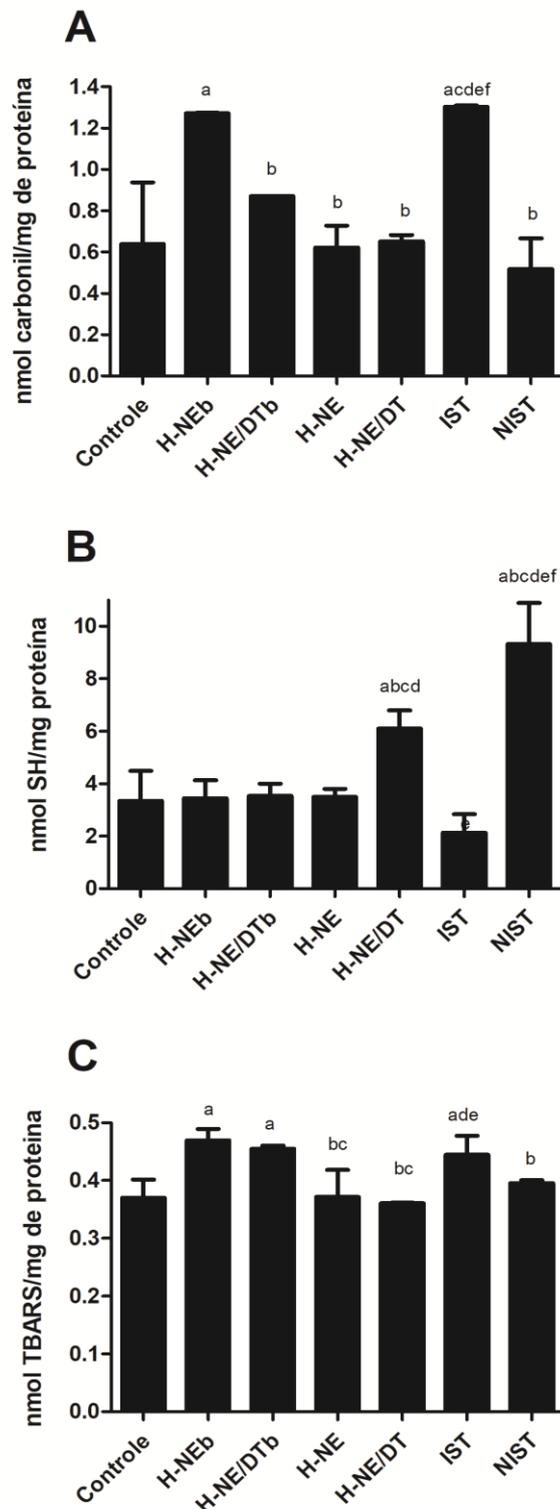


Figura 5. Avaliação de estresse oxidativo através da determinação de (A) proteínas carboniladas, (B) tióis totais (proteicos e não-proteicos), (C) espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Controle – Hidrogel contendo o extrato de PVB; H-NEb – Hidrogel sem o extrato de PVB e sem Dotap ; H-NE/DTb – Hidrogel sem extrato de PVB com DOTAP; H-NE- Hidrogel incorporado a nanoemulsão de PVB sem

DOTAP; H-NE/DT – Hidrogel incorporado a nanoemulsão de PVB com DOTAP; IST – Pele irradiada sem tratamento; NIST – Pele não irradiada sem tratamento.

A exposição da pele à radiação UVA pode danificar macromoléculas, como DNA, lipídios e proteínas gerando flacidez e fotoenvelhecimento. A radiação UVB é responsável por provocar queimaduras na pele. Assim, a proteção contra os raios UVA e UVB é essencial, estando os dois tipos de radiação diretamente envolvidos no câncer de pele (Oliveira et al., 2015; Katiyar et al., 2017). As espécies reativas de oxigênio são produzidas constantemente nas células em baixas concentrações. Quando há a produção excessiva dessas espécies, ocorre o estresse oxidativo, sendo que o alvo celular primário do estresse pode variar dependendo do tipo de célula, obstáculos, duração da produção das espécies reativas e proximidade do oxidante com um substrato celular específico. As proteínas são principais alvos para EROs e subprodutos secundários de estresse oxidativo (Dalle-Donne et al., 2006).

Algumas modificações induzidas pelos EROs às proteínas são reversíveis e outras irreversíveis, como as causadas pela carbonilação, uma vez que as células não conseguem reparar carbonilas de proteínas. Os grupos carbonil são introduzidos em proteínas por uma variedade de vias oxidativas. As espécies reativas podem reagir diretamente com a proteína ou com outras moléculas como açúcares e lipídios, gerando espécies reativas de carbonila (reactive carbonyl I species). A oxidação direta de proteínas por radicais livres produz derivados de carbonila altamente reativos, podendo resultar em modificações destas proteínas, as quais podem produzir um efeito sobre a atividade biológica de outras proteínas. Proteínas carboniladas formam agregados resistentes à degradação, que acabam se acumulando em massas disfuncionais de proteínas danificadas.

De acordo com o presente estudo foi possível verificar que a pele de orelha suína tratada com a formulação H-NEb e IST foram as que apresentam a maior concentração de proteínas carboniladas, apresentando diferença significativa (Tukey, $p < 0,05$) em relação as demais formulações. Isto pode ter ocorrido porque esta formulação não possui o extrato de PVB, que como já relatado em estudos anteriores, apresenta resultados positivos em relação a esta atividade (Jacob et al., 2015; Ruffato et al., 2017). As análises realizadas na pele irradiada (IST), demonstraram maior geração de proteínas carboniladas, fonte de EROs, em função da alta exposição à radiação UV (Mizutani et al., 2016). A formulação que

apresentou resultados mais promissores foi o hidrogel (H-NE/DT) devido à presença do extrato de PVB, que apresenta atividade antioxidante (Farooqui et al., 2010; Ruffato et al., 2017), e do tensoativo catiônico DOTAP que conduz a uma maior retenção das BZP na pele.

O teste sulfidrilado também foi realizado para verificar a atividade antioxidante. Tiois são uma classe de compostos que incluem um grupo sulfidrilado (-SH) e pode reagir com radicais livres de oxigênio para proteger os tecidos. A formação de ligações dissulfeto é reversível por antioxidantes endógenos ou exógenos. Quando o equilíbrio de tiol-dissulfeto é prejudicado, como resultado do estresse oxidativo, atividades celulares podem ser interrompidas (Balta et al., 2018). Como observado na figura 5, a maior concentração de -SH foi observada na pele não tratada e sem exposição a radiação (NIST) e a pele tratada com H-NE/DT, indicando que a formulação foi capaz de aumentar a produção de grupos tiol para proteger, isto pode ter ocorrido pois esta é a formulação que também mostrou-se mais estável e que permitiu uma maior retenção na pele, corroborando uma melhor atividade e possível maior proteção contra a radiação UVA/UVB. A pele não tratada que passou pela radiação (IST), foi a que apresentou a menor concentração de grupamento -SH. Isto pode ter ocorrido porque a maioria dos grupos -SH da pele são proteicos, e em proteínas com grupos tiol (-SH), o EROS pode levar à oxidação dos grupos tiol e, conseqüentemente, a perda de função (Balta et al., 2018).

Por fim, para avaliar o dano oxidativo lipídico, foi utilizada a determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Essa reação se baseia na reação do malondialdeído, produto da oxidação lipídica, com o ácido tiobarbitúrico gerando um composto corado que é determinado espectrofotometricamente (Bonina et al., 1996). Neste estudo também foi possível observar melhores resultados para as formulações contendo o extrato de PVB, e dentre as formulações contendo o extrato, a formulação H-NE/DT apresentou um dano lipídico inferior.

Os resultados do presente trabalho evidenciaram que formulações contendo o extrato *n*-hexânico de PVB foram os mais promissores em combater o estresse oxidativo. Este resultado pode ser devido à presença de benzofenonas polipreniladas (Santa-Cecília et al., 2012). Embora outras características também

contribuam para a atividade antioxidante de diversos compostos, esta é, geralmente, determinada pelo número de hidroxilas presentes na molécula (Rajalaksmi et al., 1995).

As benzofenonas exibem uma série de atividades biológicas, incluindo antifúngica, anti-HIV, e citotóxica, entre outras. Devido a estrutura fenólica, possuem propriedades antioxidantes que muitas vezes são as responsáveis pelas atividades verificadas (Wu et al., 2014). Quanto ao mecanismo antioxidante, Sang e colaboradores (2001) relataram que os principais responsáveis pelas reações antioxidantes são a 1,3-dicetona e o anel fenólico presentes nessas substâncias.

De fato, a atividade antioxidante de várias benzofenonas polipreniladas já foi demonstrada. Entre essas, pode-se citar gutiferona H, gambogenona, xantochimol, isoxantochimol, gutiferona E, cicloxantochimol, aristofenonas A e B, garcinol e isogarcinol (Almanza et al., 2011; Wu et al., 2014). Além dos produtos isolados, Trusheva e colaboradores (2006), verificaram a atividade antioxidante de uma mistura de benzofenonas isoladas de Propolis Vermelha Brasileira.

4. Conclusão

O presente estudo demonstrou as potencialidades de uso das formulações desenvolvidas, especialmente H-NE/DT, na proteção da pele contra o dano oxidativo causado pela luz UVA/UVB. Os resultados demonstraram a manutenção da estrutura nanométrica das nanoemulsões após a adição do agente gelificante pelo menos durante um período de três meses. A adição do lipídeo catiônico DOTAP nas formulações (H-NE/DT) conduziu a um aumento da retenção das BZP na pele de orelha suína ao longo do tempo. Os estudos antioxidantes realizados permitiram demonstrar uma proteção da pele frente ao dano oxidativo da radiação UVA/UVB com um possível efeito aditivo entre o extrato de PBV e o sistema nanoestruturado decorrente da sua capacidade de espalhamento de luz.

5. Referências

Almanza G.R.; Quispe R.; Mollinedo P.; Rodrigo G.; Fukushima O.; Villagomez R.; Akesson B.; Sterner O. Antioxidant and antimutagenic polyisoprenylated benzophenones and xanthenes from *Rheedia acuminata*. *Natural Products Communications*. 6(9), 1269-1274, 2011.

Aulton, E.M. Delineamento de Formas Farmacêuticas. 2ed. Porto alegre: Artmed, 2005. P.56-73.

Balestrin, L.A., Bidone, J., Bortolin, R.C., Moresco, K., Moreira, J.C., Teixeira, H.F. Protective effect of a hydrogel containing *Achyrocline satureioides* extract-loaded nanoemulsion against UV-induced skin damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*. 163, 269-276, 2016.

Balogh, T.S.; Pedriali, C.A.; Baby, A.R.; Velasco, M.V.R.; Kaneko, T.M. Ultraviolet radiation protection: current available resources in photoprotection. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 86(4), 732-42, 2011.

Balta, B. Erdogan, Alisik, M. Kiraz, A. Akalin, T. Bastug, F. Erel, O. Does thiol-disulphide balance show oxidative stress in different MEFV mutations? *Rheumatology International* 104, 38-97, 2018.

Beck R, Guterres S, Pohlmann A, editors. *Nanocosmetics and nanomedicines*. 1st ed. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 2011.

Bidone, J.; Argenta, D. F.; Kratz, J.; Pettenuzzo, L. F.; Horn, A. P.; Koester, L. S.; Bassani, V. L.; Simões, C. M. O.; Teixeira, H. F. Antiherpes activity and skin/mucosa distribution of flavonoids from *Achyrocline satureioides* extract incorporated into topical nanoemulsions. *Biomedical Research International*. 1-7, 2015.

Bidone, J.; Zorzi, G.; Carvalho, E. L.; Simões, C. M. O.; Koester, L. S.; Bassani, V.L.; Teixeira, H. F. Incorporation of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC extracts in to topical nanoemulsions obtained by means of spontaneous emulsification procedure. *Industrial Crops and Products*. 62, 421–429, 2014.

Bonina, F.P.; Montenegro, L. Vehicle effects on in vitro heparin release and skin penetration from different gels. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 102, p. 19-24, 1994.

Corrêa, N. M.; Júnior, F. B. C.; Ignácio, R. F.; Ricci, G.; Leonardi, G. R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.41, n.73-78, 2005.

EL- ANEED, A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J. Controlled Release*. v. 94, p. 1-14, 2004.

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 82, 70–77, 1959.

Farooqui, T; Farooqui, A.A. Molecular Mechanism Underlyng the therapeutic activities of Propolis: A critical Review. *Current Nutrition & Food Science*. 6(3), 2010.

Fasolo, D. Desenvolvimento de nanoemulsões catiônicas contendo benzofenonas da própolis vermelha brasileira visando ao tratamento de infecções fúngicas mucocutâneas. Tese de Doutorado, UFRGS, 2016.

Fasolo, D; Bergold, A.M; von Poser, G; Teixeira, H.F. Determination of benzophenones in lipophilic extract of Brazilian red propolis, nanotechnology – based product and porcine skin and mucosa: analytical and bioanalytical assays. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 124, 57-66, 2016.

Galves, M.V. Antioxidantes en fotoproteccion, realmente funcionan?. *Actas Dermosifiliograficas*. 101(3), 197–200, 2010.

Gupta, A.; Eral, H.B.; Hatton, T.A.; Doyle, P.S. Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter*. 12, p. 2826-2841, 2016.

Ishii, F. Sasaki, I. Ogata, H. Effect of phospholipid emulsifiers on physicochemical properties of intravenous fat emulsions and/or drug carrier emulsions. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 42, 513-515, 1990.

Jacob, A; Parolia, A; Pau, A; Amalraj, F.D. The effect of Malaysian propolis and Brazilian red propolis on connective tissue fibroblasts in the wound healing process. *Bio Med Central, Complementary & Alternative Medicine*. 15294, 2015.

Katiyar, S.K.; Pala, H.C.; Prasada, R. Dietary proanthocyanidins prevent ultraviolet radiation-induced nonmelanoma skin cancer through enhanced repair of damaged DNA-dependent activation of immune sensitivity. *Seminars in Cancer Biology*. 2017.

Lucca, L.G. Matos, S.P. Kreutz, T. Teixeira, H.F. Veiga Jr, V.F. Araujo, B.V. Limberger, R.P. Koester, L.S. Anti-inflammatory Effect from a Hydrogel Containing

Nanoemulsified Copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne). *American Association Pharmaceutical Scientists*.19(2):522-532017.

Mackensie, C. S.; Rachael, M.C.; Jeffrey, D.C.; Scott, E.M. Zeta potencial: case study of cationic, anionic and neutral liposomes. *Anal Bioanal chemistry*. 409, 5779-5787, 2017.

Nichols JA, Katiyar SK. Skin photoprotection by natural polyphenols: antiinflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of Dermatological Research*. 302, 71-83, 2010.

Parra JL, Paye M. EEMCO Guidance for the in vivo Assessment of Skin Surface pH. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 16, 188-202,2003.

Parejo,I.; Viladomat, F.; Bastida, J.; Rosas-Romero, A.; Saavedra, G.; Murcia, M.A.; Jiménez, A.M.; Codina, C. Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidante activity. *Life Sciences*. 73, 1667-1681, 2003.

Peppas, N. A.; Bures, P.; Leobandung, W.; Ichikaea, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.50, p.27-46, 2009.

Pieira E, Carlotti ME, Trotta C, Cavallil R, Trotta M. Positively charged microemulsions for topical application. *International Journal of Pharmaceutical*. 346(1-2):119-23, 2007.

Piccinelli, A.L; Lotti, C; Campone, L; Cuesta-Rubio, O; Fernandez, M.C; Rastrelli, L. Cuban and Brazilian Red Propolis: Botanical Origin and Comparative Analysis byHigh–Performance Liquid Chromatography–Photodiode ArrayDetection/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agriculturaland Food Chemistry*. 59, 6484-6491, 2011.

Rajalaksmi, D.; Narasimhan, S. Food antioxidants: sources and method of evaluation. In: Madhavi, D.L.; Deshpande,S.S.; Salunkhe, D.K. Food Antioxidants – technological, toxicological and health perspectives. *New York: Marcel Dekker*. 65-157, 1995.

Sang, S.; Pan, M. H.; Cheng, X.; Bai, N.; Stark, R.E.; Rosen, R.T.; Lin-Shiau, S.Y.; Lin, j.k.; Ho, C.T. Chemical studies on antioxidant mechanism of garcinol: analisis of

radical reaction products of garcinol and their antitumoral activities. *Tetrahedron*. 57, 9931-9938, 2001.

Silva, C.G.; Herdeiro, R.S.; Mathias, C.J.; Panek, A. D.; Silveira, C.S.; Rodrigues, V. P.; Rennó, M.N.; Falcão, D.Q.; Cerqueira, D.M.; Minto, A.B.M.; Nogueira, F.L.P.; Quaresma, C.H.; Silva, J. F. M.; Menezes, F.S.; Eleutherio, E.C.A. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. *Pharmacological Research*. 52, 229-233, 2005.

Rufatto L.C; Santos, D.A.; Marinho, F.; Henriques, J.A.P.; Ely, M.R.; Moura, S. Red propolis; Chemical composition and pharmacological activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 7, 591–598, 2017.

Saetern, A. M.; Skar, M.; Braaten, A.; Brandl, M. Camptothecin catalyzed phospholipid hydrolysis in liposomes. *International Journal of Pharmaceutical*. 288, p.73-80, 2005.

Santa-Cecília, F.V; Santos, G.B; Fuzissaki, C.N.; Derogis, P.B.M.C.; Freitas, L.A.S.; Gontijo, V.S.; Strihueta, P.C.; Nagem, T.J.; Brigadão, M.R.P.L.; Santos, M.H. Epclusianona the natural prenylated benzophenone, inhibits superoxide anions in the neutrophil respiratory burst. *Journal of medicinal food* 15, 200-205, 2012.

Saraf, A.S. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. *Phytotherapy*. 81(7), 680-689, 2010.

Souto E.B.; Wissing S.A.; Barbosa C.M.; Mu R.H. Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 90, 58-83, 2004.

Trusheva, B; Popova, M; Bankova, V; Simona, S; Marcucci, M.C; Miorin, P.L; Pasin, F.R; Tsvetkova, I. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. *Oxford University Press*. 3(2), 249-254, 2006.

Wu S. B; Long C.; Kennelly E.J. Structural diversity and bioactivities of natural benzophenones. *Natural Products Reports*. 31(9), 1158-117, 2014.

CONCLUSÕES

- A partir da PVB foi obtida uma fração rica em benzofenonas polipreniladas com teor de cerca de 25%;
- As nanoemulsões NE e NE/DT foram preparadas pelo método da emulsificação espontânea e mostraram-se monodispersas, com tamanho nanométrico (200 nm) e potencial zeta em torno de -40 mV para NE e + 36 mV para NE/DT.
- O teor de benzofenonas polipreniladas totais em nanoemulsões contendo extrato *n*-hexânico de PVB também foi avaliado e apresentou valor de aproximadamente 0,85mg/mg.
- A incorporação em hidrogel não alterou de maneira marcante as características físico-químicas das nanoemulsões. As formulações mantiveram tamanho de gotícula nanométrico H-NE em torno de 200-300nm, indicando a viabilidade de utilização da formulação semissólida;
- De modo geral, os parâmetros físico-químicos avaliados, diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e teor de BZP, permaneceram constantes durante 60 dias de armazenamento à 4°C. Após 90 dias, o diâmetro de gotícula e índice de polidispersão aumentou para as formulações H-NE, sendo que o teor de BZP dos hidrogéis avaliados não apresentou alteração significativa;
- Os hidrogéis H-NE e H-NE/DT apresentaram comportamento não-Newtoniano pseudoplástico, características desejáveis em formulações de uso tópico;
- Após analisada a permeação/retenção das BPZ a partir dos Hidrogéis H-NE e H-NE/DT foi observada retenção desde a primeira hora de experimento, porém a formulação H-NE/DT apresentou diferença significativa para todos os tempos avaliados (1, 2 e 8 horas) em relação ao controle (gel natrosol contendo o extrato de BZP);
- As BPZ permaneceram retidas na pele, não sendo possível identificá-las no fluido receptor, independente da formulação;
- A partir dos estudos de avaliação de atividade antioxidante foi possível evidenciar a proteção da pele de orelha suína ao dano oxidativo decorrente da radiação UVA/UVB com a aplicação das formulações. O conjunto dos resultados evidenciou o efeito do extrato *n*-hexânico de PVB na atividade antioxidante exercida pelas BZPs na proteção da pele contra as radiações.