



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO – UFOP
ESCOLA DE FARMÁCIA- EFAR



WANESSA APARECIDA DA SILVEIRA ALMEIDA

**ESTUDO DA ATIVIDADE FOTOPROTETORA DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS
DE PRÓPOLIS VERDE EM FORMULAÇÃO DE PROTETOR SOLAR**

OURO PRETO – MG

2021

WANEISSA APARECIDA DA SILVEIRA ALMEIDA

**ESTUDO DA ATIVIDADE FOTOPROTETORA DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS
DE PRÓPOLIS VERDE EM FORMULAÇÃO DE PROTETOR SOLAR**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Viviane Martins Rebello Dos Santos

OURO PRETO – MG

2021

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

A447e Almeida, Wanessa Aparecida da Silveira .
Estudo da atividade fotoprotetora de extratos hidroalcoólicos de
própolis verde em formulação de protetor solar. [manuscrito] / Wanessa
Aparecida da Silveira Almeida. - 2021.
48 f.

Orientadora: Profa. Dra. Viviane Martins Rebello dos Santos.
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto.
Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Própolis. 2. Protetores contra radiação. 3. Pele- Efeito da radiação.
4. Radiação- Efeito fisiológico. 5. Fotoestabilidade. I. Santos, Viviane
Martins Rebello dos. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 615.324

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Wanessa Aparecida da Silveira Almeida

Estudo da atividade fotoprotetora de extratos hidroalcoólicos de própolis verde em formulação de protetor solar

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal
de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico Generalista

Aprovada em 02 de dezembro de 2021

Membros da banca

Porf. Doutora - Viviane Martins Rebello dos Santos - Orientadora (Departamento de Química, Universidade Federal de Ouro Preto)
Prof. Dr. - Gustavo Henrique Bianco De Souza - Avaliador (Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto)
Prof. Dr. - Rodrigo de Souza Corrêa - (Departamento de Química, Universidade Federal de Ouro Preto)

Viviane Martins Rebello dos Santos, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 02/12/2021



Documento assinado eletronicamente por **Viviane Martins Rebello dos Santos, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 02/12/2021, às 15:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0253263** e o código CRC **81E4146B**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.012674/2021-87

SEI nº 0253263

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35400-000
Telefone: 3135591707 - www.ufop.br

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, meu salvador e meu guia. Por toda força, por sempre me manter de pé nos momentos mais difíceis. Toda honra e toda glória a ti Jesus! A nossa senhora Aparecida, minha intercessora hoje e sempre, por me proteger e me abençoar nessa trajetória.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Viviane Martins Rebello Dos Santos, uma excelente profissional, obrigada por estar sempre disposta a ajudar e ser sempre solícita. Obrigada por todos os ensinamentos, pela confiança, por todas as oportunidades e incentivos concedidos, e por te acreditado na minha capacidade. Esse trabalho é nosso!

Aos amigos e professores do laboratório de Produtos Naturais e de Síntese Orgânica, em especial, a Prof^a. Dr^a. Andréa Mendes Do Nascimento, a Prof^a. Dr^a. Ângela Leão Andrade. Aos companheiros de pesquisa, Lucas Resende Dutra Sousa, Amanda Dos Santos Antunes, Amanda Scofield De Azevedo, por todos os momentos de aprendizado e pela troca de experiências. Vocês foram essenciais para a minha formação e para que essa pesquisa fosse possível.

À Dr^a. Tatiane Roquete Amparo pela colaboração na obtenção de resultados para esse trabalho e pela transmissão de conhecimentos. Ao laboratório LaQueEsl- Laboratório de química estrutural e inorgânica, pela utilização de equipamentos para leitura de amostras de própolis. Em especial agradeço ao Prof. Dr. Rodrigo De Souza Correa, pelo apoio e incentivo na pesquisa e nos trabalhos acadêmicos.

Às demais pessoas que também contribuíram de alguma forma com este trabalho, especialmente, Amanda, Izadora, Jakeline, Lourena, Yumi, Gessilie, Marina, Matheus, Kênia, Isabella e Lucas pelos momentos de alegria, aprendizado, companheirismo, ensinamentos de convivência e pelo respeito. É muito bom saber que posso contar com vocês!

Aos meus pais Wander Moreira De Almeida e Cleusa Aparecida Da Silveira Almeida, ao meu irmão Emerson Tadeu Da Silveira Almeida, a minha prima Taciana Silveira, e ao meu namorado Fabiano Mafia Niquini Júnior, obrigada por serem minha base e por todo apoio, companheirismo, incentivo e orações.

Por fim, agradeço à Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, a primeira da América Latina, pela inestimável formação e por permitir esta conquista!

RESUMO

A exposição solar excessiva e sem proteção representa um dos maiores riscos para a ocorrência do câncer de pele e fotoenvelhecimento; diante disso as matérias primas de origem natural como a própolis vem se destacando cada vez mais. A própolis é uma resina natural não tóxica produzida por abelhas melíferas, ela apresenta atividades biológicas, tais como atividades antimicrobianas, anti-inflamatória, anestésica e citostática. Atualmente, é utilizada nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. A própolis apresenta em sua composição química os flavonoides, que são substâncias capazes de absorver a radiação ultravioleta, indicando a possibilidade do uso desses produtos como filtros solares em fotoprotetores. Os fatores de proteção solar (FPS) *in vitro* dos extratos e da formulação de própolis verde, foram determinados por método espectrofotométrico desenvolvido por Mansur. Todos os extratos hidroalcoólicos de própolis verde (EHPV) preparados em temperatura ambiente e com aquecimento, apresentaram alta absorção na região do UVB (290 a 320nm). O extrato hidroalcoólico de própolis verde 70% com aquecimento, foi incorporado a uma formulação de filtro solar com Gel Permulem TR1, à fim de aumentar o FPS. A formulação do Gel Permulem TR1, sem a presença do extrato apresentou um FPS de 2,47; já com a incorporação do EHPV 70% a quente o FPS foi de 25,42 gerando um aumento significativo nos valores de FPS. Foi realizado um teste de fotoestabilidade e as amostras ficaram expostas a radiação por 1 h e 30 minutos, avaliando a absorbância a cada 15 min de exposição a luz. De acordo com os resultados é possível afirmar que a própolis é fotoestável e que houve um sinergismo entre as formulações com os extratos, comprovando a eficácia da própolis como uma substância fotoprotetora. Tal propriedade, se justifica pela análise da própolis verde realizada pela técnica de CLAE-DAD que comprovou a presença de substâncias fenólicas. Foi realizado também, o teste de HET-CAM que avalia se a substância em análise provoca ou não reações irritativas na pele. Após a realização do teste, o mesmo comprovou que a formulação do gel incorporado ao EHPV 70% a quente, foi classificada como não irritante/levemente irritante; o que certifica que esta é uma formulação segura para ser aplicada sobre a pele. Portanto a incorporação do produto natural como a própolis junto a uma formulação fotoprotetora é uma das alternativas para promover o aumento do FPS sem deixar a formulação com caráter irritante.

Palavras-chave: Própolis Verde; Fotoproteção; Fotoestabilidade; Gel de Permulem.

ABSTRACT

Excessive and unprotected sun exposure represents one of the greatest risks for the occurrence of skin cancer and photoaging; in view of this, raw materials of natural origin such as propolis have been standing out more and more. Propolis is a non-toxic natural resin produced by honey bees, it has biological activities such as antimicrobial, anti-inflammatory, anesthetic and cytostatic activities. It is currently used in the capable food, pharmaceutical and cosmetic industries. Propolis has in its chemical composition flavonoids, which are substances that absorb ultraviolet radiation, indicating the possibility of using these products as sunscreens in sunscreens. The in vitro sun protection factors (SPF) of the extracts and the green propolis formulation were determined by the spectrophotometric method developed by Mansur. All hydroalcoholic extracts of green propolis (EHPV) prepared at room temperature and with heating, showed high absorption in the UVB region (290 to 320nm). The hydroalcoholic extract of 70% green propolis with heating was incorporated into a sunscreen formulation with Gel Permulem TR1 in order to increase the SPF. The formulation of Gel Permulem TR1, without the presence of the extract, presented an SPF of 2.47; with the incorporation of hot 70% EHPV, the FPS was 25.42, generating a significant increase in the SPF values. A photostability test was performed and the samples were exposed to radiation for 1 h and 30 minutes, evaluating the absorbance every 15 min of exposure to light. According to the results, it is possible to affirm that propolis is photostable and that there was a synergism between the formulations with the extracts, proving the effectiveness of propolis as a photoprotective substance. This property is justified by the analysis of green propolis performed by the CLAE-DAD technique, which proved the presence of phenolic substances. The HET-CAM test was also carried out, which assesses whether the substance under analysis causes irritant reactions on the skin or not. After performing the test, it proved that the gel formulation incorporated into the hot 70% EHPV was classified as non-irritating/slightly irritating; which certifies that this is a safe formulation to be applied to the skin. Therefore, the incorporation of a natural product such as propolis together with a photoprotective formulation is one of the alternatives to promote an increase in SPF without leaving the formulation with an irritating character.

Keywords: Green Propolis; Photoprotection; Photostability; Permulem Gel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Própolis marrom (A); própolis amarela (B); própolis verde (C) e própolis vermelha (D).....	2
Figura 2: Estruturas químicas dos principais flavonoides.	5
Figura 3: Abelha <i>Apis mellifera</i> sobre a folha de <i>Baccharis dracunculifolia</i>	6
Figura 4: Própolis verde em pó (A) e na forma sólida (B).....	7
Figura 5: Espectro da radiação solar.....	8
Figura 6. Espectros de absorção de UV / Vis de todos os extratos (a-d), partições (e), Permulem TR1 (f) e quercetina (g).....	23
Figura 7. Espectros de absorção de UV / Vis de EHPV (70% quente) (a), EHPV (70% quente) incorporado em Gel Permulem TR1 (b) e Gel Permulem TR1 (c).....	25
Figura 8. Gráficos de fotoestabilidade do EHPV (70% quente) (a) e Gel Permulem TR1 incorporado com EHPV (70% quente) (b) e Gel Permulem TR1 (c).	26
Figura 9. Cromatograma do EHPV-70% a quente por LC-DAD-ESI-MS / MS.....	30
Figura 10. Fotografias representativas dos resultados do teste HET-CAM do gel Permulem TR1 incorporado com EHPV 70% quente, controle negativo (NaCl 0,9%) e controle positivo (NaOH 0,1 mol / L) após 300 s de contato.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação entre o efeito eritematógico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda.	11
Tabela 2: Expressões orientativas para rotulagem de protetores solares.	11
Tabela 3: Valores de FPS (média \pm desvio padrão) obtidos a partir da leitura espectrofotométrica dos EHPV e do controle positivo.	19
Tabela 4: Valores de FPS (média \pm desvio padrão) calculados a partir das frações do EHPV 70% a quente, em diferentes concentrações.	20
Tabela 5: FPS do EHPV 70% a quente incorporado ao Gel Permulem TR1.....	21
Tabela 6: Análise fitoquímica da EHPV-70% quente.	28
Tabela 7: Compostos do EHPV-70% a quente identificados por LC-DAD-ESI-MS/MS...	29

LISTA DE SIGLAS

CAM	Membrana corioalantóica
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DEM	Dose Mínima Eritematosa
EHPV	Extrato Hidroalcoólico de Própolis Verde
EPV	Extrato de Própolis Verde
FPS	Fator De Proteção Solar
HET-CAM	Teste de Membrana Corioalantóica de ovo de galinha
HPLC	Cromatografia Líquida acoplada à análise de espectrometria de massa
IS	Índice de Irritação
MI	Moderadamente Irritante
NI	Não Irritante
NM	Comprimento de onda
PABA	Ácido P-aminobenzóico
Q.S.P	Quantidade suficiente para
RT	Tempo de Retenção
SI	Levemente Irritante
SVI	Severamente Irritante
TFA	Ácido Trifluoroacético
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	2
2.1 Própolis	2
2.2 Própolis Verde	6
2.3 Atividade Fotoprotetora	8
3. JUSTIFICATIVA.....	12
4. OBJETIVOS.....	13
4.1 Objetivo geral:	13
4.2 Objetivos específicos:	13
5. METODOLOGIA:.....	14
5.1.1 Extrato hidroalcoólico de própolis verde (EHPV) a temperatura ambiente	14
5.1.2 Extrato hidroalcoólico de própolis verde com aquecimento	14
5.2 Partição líquido-líquido com EHPV-70% quente:.....	15
5.3 Formulação Fotoprotetora do Gel de Permulem TR1:	15
5.4 Determinação <i>in vitro</i> do Fator de Proteção Solar (FPS)	16
5.5 Avaliação da Fotoestabilidade	16
5.6 Triagem Fitoquímica.....	17
5.7 Identificação dos compostos fenólicos por HPLC.....	17
5.8 Teste de HET-CAM.....	18
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
6.1 Determinação do fator de proteção solar (FPS) <i>in vitro</i>	19
6.2 Partição Clorofórmica e Hexânica	20
6.3 Formulação	21
6.4 Determinação da absorbância máxima dos EHPV, das partições e do Gel Permulem TR1 incorporado com EHPV 70% com aquecimento.	22
6.5 Avaliação da Fotoestabilidade	26
6.6 Triagem fitoquímica.	28
6.7 Análise dos compostos fenólicos identificados por HPLC.....	28
6.8 Teste HET-CAM.....	31
7. CONCLUSÃO	33
8. REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

Atualmente as radiações ultravioletas (UV), vêm sendo a principal responsável pelo aparecimento de cânceres de pele e envelhecimento precoce que atinge muitos indivíduos. Diante deste cenário, o uso de protetores/filtros solares que atuam protegendo a pele desses danos, se faz extremamente necessário. De acordo com alguns estudos, a busca por produtos naturais que apresentem em sua composição, substâncias capazes de atuar protegendo a pele frente os raios UV, está cada vez maior. Entre os produtos naturais mais estudados, a própolis vem se destacando e chamando a atenção dos pesquisadores, pois esta é uma resina que apresenta em sua constituição química compostos fenólicos e flavonoides, que são substâncias capazes de absorver a radiação ultravioleta. (OLIVEIRA, 2007)

A própolis é uma resina natural, formada por uma rede complexa de constituintes químicos, sendo composta basicamente por: 50% de resinas, 30% de ceras, 10% de óleos vegetais, 10% de pólen e componentes orgânicos, além dos flavonoides, que são considerados os principais responsáveis pelos seus efeitos benéficos. Este apiterápico é formado por material resinoso e balsâmico, coletado pelas abelhas, dos ramos, flores, brotos e exsudatos de árvores. Diversas propriedades medicinais já foram atribuídas a própolis, incluindo, atividades anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana, fotoprotetora, imunomodulatória, entre outras. (GÓMEZ-CARAVACA et al., 2006)

Dentre todos os tipos de própolis brasileira que existem, a própolis verde, classificada como a do tipo 12, é uma das melhores em qualidade e uma das que mais se evidenciam, sendo amplamente consumida no mundo, principalmente no Japão. A própolis verde, produzida pelas abelhas a partir da resina do *Baccharis dracunculifolia*, também conhecido como alecrim do campo, é encontrada essencialmente no nordeste do estado de São Paulo e sul de Minas Gerais, e dentre seus constituintes químicos os flavonoides são considerados os mais relevantes. (BANKOVA et al., 1999; PARK, YONG AND ALENCAR, SEVERINO AND AGUILAR, 2007)

Sendo assim, a finalidade desta pesquisa é avaliar e demonstrar que a própolis verde brasileira é considerada uma forte candidata a ser incorporada em formulações tópicas fotoquimioprotetoras, com o objetivo de potencializar o fator de proteção solar dessas formulações, proporcionando a prevenção e/ou tratamento dos danos causados na pele pela radiação UV.

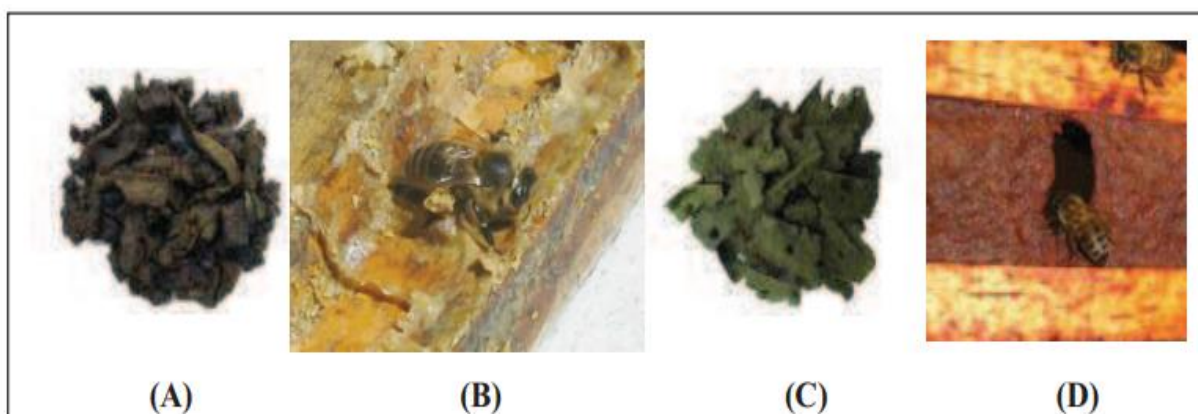
2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Própolis

A própolis é um produto natural, descendente de substâncias gomosas, resinosas e balsâmicas de consistência, textura e coloração variada. A palavra própolis tem origem do grego que significa; *pro-*, em defesa, e *polis-*, cidade ou comunidade, ou seja, em defesa da comunidade. A própolis é uma substância não tóxica que é coletada por abelhas de diversas espécies, tais como: *Scaptotrigona* aff. *Postica*, *Trigona recursa* e *Apis melífera*. As fontes de coleta de material são botões florais, brotos, flores e exudatos de plantas, nos quais são acrescentados secreções salivares, cera e pólen para a obtenção final da própolis. As abelhas fazem o uso da própolis para proteger contra a entrada de insetos, microorganismos, fungos e bactérias na colmeia e como um instrumento para vedar, bloqueando a entrada de luz e umidade em seu interior. (CARVALHO TAVARES et al., 2015; PARK, YONG AND ALENCAR, SEVERINO AND AGUILAR, 2007; D. S. PEREIRA et al., 2015)

A própolis é um material resinoso e lipofílico, que apresenta cor, e aromas bem característicos, suas características, variam muito de acordo com o local de onde é feita a coleta. Fisicamente a própolis em 15 °C é dura e quebradiça; já quando se tem um aumento na temperatura a partir dos 30 °C se torna maleável e pegajosa; seu ponto de fusão varia entre (60 °C - 70 °C). Ela apresenta um odor bem agradável que pode variar muito de uma amostra para outra, porém existem algumas amostras que não possui nenhum odor. Sua cor pode variar do amarelo, verde, vermelho ao marrom (**Figura 1**) e esta variação está relacionada com a origem geográfica e a vegetação de onde ela é extraída. (BALOGH, 2011; MARCUCCI, 1996; SALGUEIRO; CASTRO, 2016)

Figura 1: Própolis marrom (A); própolis amarela (B); própolis verde (C) e própolis vermelha (D).



Fonte: (BALOGH, 2011)

Desde a antiguidade a própolis foi um dos produtos naturais mais usados, sendo administrada de várias formas; seu emprego já era descrito pelos romanos, gregos, incas e egípcios. O uso da própolis na medicina popular é algo que vem sendo manuseado a séculos pela humanidade, desde 300 a. c. Os egípcios eles tinham domínio sobre as propriedades antiputrefativas da própolis, e utilizavam para embalsamar cadáveres. Na África, no final do século XIX a própolis foi muito utilizada devido as suas propriedades cicatrizantes e na segunda guerra mundial foi aplicada em diferentes clínicas soviéticas. A própolis também denominada de cola de abelha era conhecida por apresentar propriedades medicinais por antigos médicos e filósofos gregos como Aristóteles, Plíneo e Galeno. Até 1980 a própolis não era reconhecida nos países da américa do sul, norte e no Japão; apenas na metade dos anos 80 que ela se tornou um produto notável na medicina alternativa e complementar. O reconhecimento da própolis no Brasil ocorreu principalmente após a publicação do livro, “Abelhas e saúde” escrito por Ernesto Ulrich Breyer, onde ele relata sobre as propriedades terapêuticas da própolis e sua utilização como antibiótico natural. (CASTALDO; CAPASSO, 2002; LUSTOSA et al., 2008; MARCUCCI, 1996)

Com relação à composição química, a própolis apresenta uma composição muito complexa e diversificada, que está diretamente associada à região onde é feita a coleta do material, com a estação do ano e com a flora local. Essa variação é explicada devido à grande diversidade biológica brasileira, e devido à capacidade das abelhas modificarem a composição natural ou acrescentar outros componentes/substâncias a própolis. Já foram identificadas mais de 300 substâncias em diversas amostras de própolis, devido a tal fato a mesma é considerada uma das misturas mais heterogêneas encontradas em fontes naturais. De um modo geral essa resina é composta por: 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias variadas, incluindo resíduos orgânicos. (COSTA et al., 2013; DEVEQUI-NUNES et al., 2018)

Vários estudos realizados demonstram que já foram identificadas diversas substâncias em amostras de própolis; e apesar de ter essa composição variada o maior grupo de compostos da própolis são os flavonóides, encontrados também em inúmeros representantes do reino vegetal. Hoje, são conhecidas na própolis substâncias variadas, de estruturas químicas distintas, pertencentes às seguintes classes: flavonoides (galangina, apiginina, luteolina, crisina,

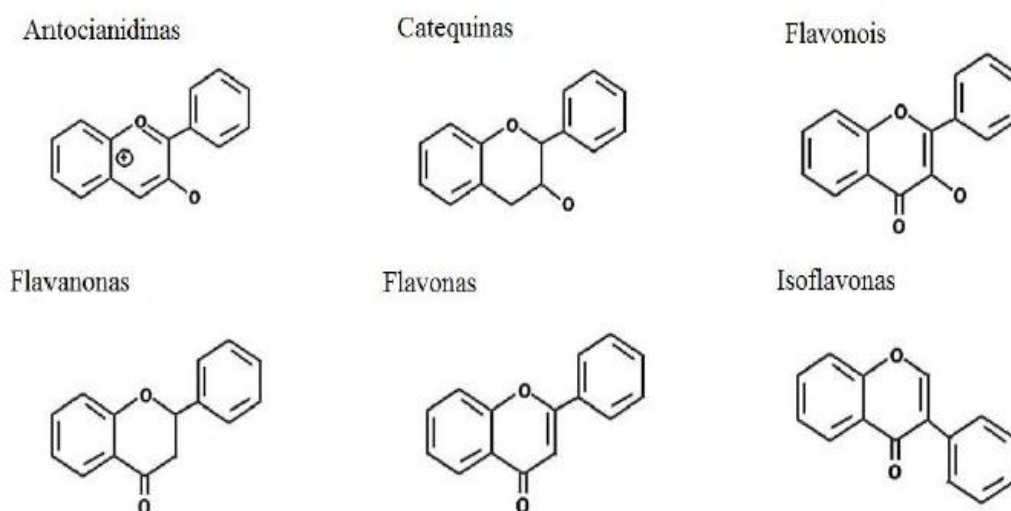
tectocrisina, pinocembrina, canferol e quercetina), hidrocarbonetos superiores, aldeídos aromáticos, vanilina e isovanilina, cumarinas, ácidos fenólicos como o ácido caféico, ferúlico, e cumárico; ácidos orgânicos, ácidos e ésteres alifáticos e aromáticos, açúcares, polissacarídeos, álcoois, ácidos graxos, aminoácidos, esteroides, cetonas, flavonas e flavonóis, flavononas, chalconas e diidrochalconas, terpenóides, proteínas, lignanas, vitaminas (A, B1, B2, B6, C, E e PP) e minerais (sódio, potássio, magnésio, bário, estrôncio, chumbo, cobre, manganês, ferro, cálcio, alumínio, zinco, titânio, prata, e cobalto). A própolis pode ser extraída utilizando água e etanol e seus componentes podem variar de acordo com o solvente que é utilizado para a extração. Quando se faz a extração com água, a própolis apresenta aminoácidos, matéria orgânica e carboidratos. Porém quando se realiza uma extração etanólica, os compostos lipofílicos são os que predominam. (LUTOSA et al., 2008; C. S. NASCIMENTO, 2009; SALGUEIRO & CASTRO, 2016.)

Dentre todos os compostos químicos que já foram descritos para a própolis, o que apresenta maior relevância e vem chamando a atenção dos pesquisadores é o grupo dos flavonoides. Os flavonoides são de origem natural e geralmente encontrados em frutas, vegetais, sementes, em raízes e cascas de árvores; eles são classificados como metabolitos secundários que ocorrem no reino vegetal. São considerados os principais compostos responsáveis pelos efeitos benéficos da própolis, uma vez que junto com os ácidos carboxílicos modificados, eles formam componentes estratégicos, que atuam contra vários microorganismos patogênicos. Aproximadamente 4.000 substâncias já foram classificadas como pertencentes ao grupo dos flavonoides, são elas: flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, flavanonóis (diidroflavonóis), flavanóis (flavan-3-óis) e antocianidinas. Essas substâncias apresentam uma estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos, e um heterocíclico oxigenado. (BARBOSA et al., 2009; KARINE & VIEGAS, 2011; SALGUEIRO & CASTRO, 2016; BEECHER, 2003)

Os flavonoides (**Figura 2**) como um dos constituintes principais presentes na própolis, são responsáveis por apresentar várias atividades biológicas, uma delas esta relacionado com a atividade de fotoproteção que essas substâncias exercem, esse mecanismo se baseia na semelhança da estrutura química entre os flavonoides e a estrutura dos filtros químicos que são utilizados para a proteção contra os raios ultravioletas. Baseado nesses fatos, a própolis como

um produto natural se torna uma forte candidata a ser usada como agente fotoprotetor, visto que ela é rica em flavonoides. (BABY et al., 2008; GUARATINNI et al., 2009)

Figura 2: Estruturas químicas dos principais flavonoides.



Fonte:ROQUE (2013).

Devido a essa grande proporção de constituintes que a própolis apresenta, ela vem sendo cada vez mais explorada, onde vários estudos estão sendo realizados sobre as atividades farmacológicas que esse produto natural pode apresentar em decorrência de sua composição química. Dentre as atividades farmacológicas atribuídas à própolis, podemos destacar: atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antioxidante, antitumoral, imunomodulatória, fotoprotetora, ação bactericida e bacteriostática. Essas propriedades biológicas e farmacológicas, podem ser explicadas de acordo com o sinergismo que ocorre entre os seus constituintes, ou seja, as ações não são devido a presença de uma única substância específica, mas sim de uma ação complexa de vários compostos presentes na própolis. (LUSTOSA et al., 2008; PEREIRA et al., 2015)

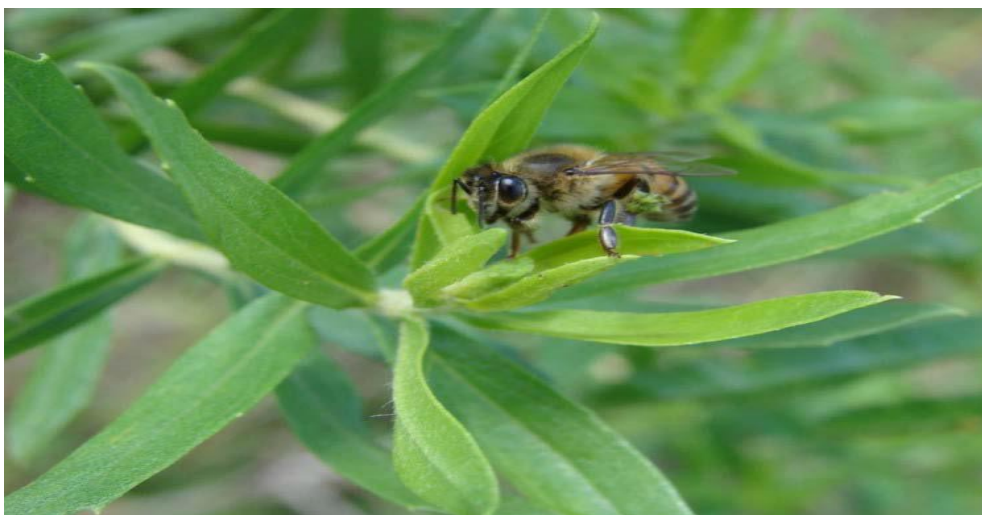
A partir das características farmacológicas apresentadas, a própolis tem sido utilizada na forma sólida, na forma de unguento à base de vaselina e na forma de extrato alcoólico e de extrato hidroalcoólico, sendo este o mais utilizado. A própolis é um produto que vem sendo empregada nas indústrias de cosméticos como um constituinte de cremes para a pele, gel pós-barba, shampoos, protetor solar, creme dental, enxaguante bucal e sabonetes. Tem destaque, também, na indústria de alimentos, sendo aplicada como ingrediente em pastilhas, cápsulas, e

em alimentos de uma forma geral. O Brasil é considerado um dos países de maior produção de própolis no mundo, ficando abaixo da China e Rússia. Ademais o Brasil, é o país responsável por produzir cerca de 50 a 150 toneladas deste apiterápico por ano, sendo que 75% desse total produzido é exportado para o Japão, pois os japoneses têm grande interesse nesse produto apícola, devido a suas propriedades terapêuticas e características organolépticas. (COSTA et al., 2013; PEREIRA; SEIXAS.;2002)

2.2 Própolis Verde

Já foram descritos 12 tipos de própolis brasileiras, caracterizadas de acordo com sua composição química, propriedades físicas, e com relatos de sua localização geográfica. Dentre esses tipos, a própolis verde foi identificada como a do tipo 12, no qual é uma das mais estudadas por apresentar diversas propriedades biológicas e farmacológicas. A própolis verde é conhecida internacionalmente como Green Própolis, e sua principal origem vegetal é a espécie *Baccharis dracunculifolia*; que é conhecida popularmente como “alecrim do campo” ou “vassourinha do campo”. A abelha do tipo *Apis mellifera*, coleta seu material, sobre a folha de *Baccharis dracunculifolia*. (**Figura 3**). A própolis verde é produzida principalmente no estado de Minas Gerais na região sul, leste, centro e zona da mata; estado este que conta com um solo ácido, característica fundamental para este tipo de resina se desenvolver; além de Minas Gerais, a própolis verde, também é produzida no leste de São Paulo, norte do Paraná e em regiões serranas do estado de Espírito Santo e Rio de Janeiro. Esta resina é um produto natural do Brasil que se desenvolve com facilidade em território brasileiro, e por apresentar diversas características se tornou um produto que é amplamente valorizado no mercado internacional principalmente no Japão. (FERREIRA, JOSELENA MENDONÇA; NEGRI, 2018; NASCIMENTO et al., 2008; TAQUARITINGA, 2018)

Figura 3: Abelha *Apis mellifera* sobre a folha de *Baccharis dracunculifolia*



Fonte: <http://revelatti.blogspot.com/2009/09/o-potencial-da-propolis-verde.html>

A composição química da própolis verde é complexa e é difícil de classificar devido ao fato de ser uma resina que conta com uma vasta gama de constituintes que variam principalmente de acordo com a região onde é feita a coleta do material e com a época do ano. Os constituintes típicos dessa própolis derivada da *Baccharis dracunculifolia* são: os flavonoides, ácidos fenólicos e ésteres, ácido cafeoquínico, atrepilin C, derivados do ácido cinâmico e ácido benzóico. A própolis verde que é conhecida internacionalmente e valorizada por suas características físico-químicas, é uma resina que apresenta várias atividades biológicas, que estão diretamente relacionadas com seus constituintes químicos. Dentre essas atividades podemos destacar; atividade antibacteriana (maior ação contra bactérias Gram-positivas) antifúngica, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora e atividade de fotoproteção. (ANDRADE et al., 2011; FERREIRA, JOSELENA MENDONÇA; NEGRI, 2018; LUSTOSA et al., 2008)

Com relação aos aspectos físicos e visuais a própolis verde, ela pode ser encontrada na forma sólida e rígida, ou na forma de um pó, após passar por um processo de moagem mecânica; essas duas formas físicas estão apresentadas abaixo (**Figura 4**). Esta resina brasileira apresenta um odor agradável e uma coloração que pode variar do amarelo-esverdeado ao verde-escuro. (FERREIRA, JOSELENA MENDONÇA; NEGRI, 2018)

Figura 4: Própolis verde em pó (A) e na forma solida (B).

(A)



Fonte: <https://images.app.goo.gl/ihzgA>

(B)



Fonte: <https://images.app.goo.gl/9TgxyY8dS61r9pxd6>

Dentre os componentes químicos que a própolis verde apresenta, os flavonoides têm sido classificados como um dos principais constituintes biologicamente ativos da própolis uma vez que eles são os responsáveis pelas atividades anti-inflamatória, antioxidante e fotoprotetora apresentados por essa resina. Baseado nessas atividades a própolis verde, passa a ser uma candidata promissora a ser empregada em formulações tópicas como um fotoprotetor, a fim de potencializar o fator de proteção solar dos filtros protegendo a pele contra os danos causados pela radiação solar, como por exemplo, fotoenvelhecimento e câncer de pele, visto que esses danos podem ocasionar a geração de radicais livres e a instalação de processos inflamatórios. (KARINE; VIÉGAS, 2011)

2.3 Atividade Fotoprotetora

Demograficamente boa parte do território brasileiro está localizado entre a linha do Equador e o Trópico de Capricórnio, região esta que se encontra em maior proximidade com o sol. O sol é uma fonte natural e é considerado essencial para que haja vida na terra, e seus efeitos sobre a pele humana vão variar de acordo com as características da pele exposta. A radiação solar pode trazer benefícios como: síntese de vitamina D, bem-estar físico e mental; por outro lado essa radiação em excesso pode provocar danos ao organismo como: queimadura solar, câncer de pele, fotoenvelhecimento e entre outros; diante desses malefícios causados pela radiação solar, o uso de protetor solar se torna algo indispensável. O espectro eletromagnético da radiação solar que chega até a superfície terrestre, é constituído predominantemente por radiações ultravioletas (100-400 nm), Visíveis (400-800 nm) e infravermelhas (acima de 800 nm), (**Figura 5**). A radiação ultravioleta (UV) por sua vez é subdividida em UVA (320 a 400 nm), que se subdivide em UV-A 1 (340 a 400 nm) e UV-A 2 (320 a 340 nm); UVB (290 a 320 nm) e UVC (100 a 290 nm). (BAILLO; LIMA, 2012; CABRAL et al., 2013; RIBEIRO et al 2004; SCHALKA; ADDOR, 2008)

Figura 5: Espectro da radiação solar



A radiação UV é a que chega com menor proporção na superfície terrestre, devido ao fato dela ser absorvida pelo oxigênio e pela camada de ozônio na estratosfera; entretanto, as ondas eletromagnéticas dessa radiação são as de menores comprimentos de onda, conseqüentemente são as mais energéticas, pois são duas grandezas inversamente proporcionais, devido a esse fato a radiação UV é a que se torna mais prejudicial para a saúde humana. (DO NASCIMENTO., 2014)

Com base nos danos que a radiação ultravioleta pode causar ao atingir a pele humana, o uso de fotoprotetores para proteger a pele se torna algo essencial. Para exercer tal proteção, existem os protetores/filtros solares, que contém moléculas ou complexos moleculares que são capazes de absorver, refletir ou dispersar a radiação UV. Os filtros solares podem ser classificados em dois tipos: filtros físicos e filtros químicos. Os filtros físicos ou inorgânicos são partículas de óxidos metálicos que são capazes de refletir ou dispersar a radiação incidente, seus principais representantes são: dióxido de titânio e óxido de zinco. Já os filtros químicos ou orgânicos são capazes de absorver a radiação UV de alta energia e transformá-la em radiações com energias menores que são incapazes de causar danos ao ser humano, eles protegem contra radiação UVA e UVB, promovendo uma proteção de amplo espectro a pele; esses filtros têm como principal representante o ácido para-aminobenzoico (PABA). (BALOGH et al., 2011; NASCIMENTO, 2009; SCHALKA; DOS REIS, 2011; VIOLANTE et al., 2009)

O protetor solar deve possuir algumas características para que possa ser considerado um bom fotoprotetor. Além de proteger contra a radiação UV incidente, um bom protetor deve ser estável na pele humana e ao calor, deve ser fotoestável frente a luz solar, a fim de promover uma proteção mais prolongada. O ideal é que esses protetores, não sejam irritantes e sensibilizantes e devem ser resistentes a água, ser atóxico, incolor e inodoro; devem recobrir e proteger a pele, mas não deve ser absorvido pela mesma, para evitar que seus constituintes químicos alcancem a corrente sanguínea. (ARAÚJO; SOUZA, 2008)

Para verificar a eficácia de um produto que atua protegendo a pele contra os raios solares é utilizada a técnica de determinação de FPS (Fator de proteção solar). O FPS é um sistema de classificação numérico que indica o grau de proteção oferecido pelos produtos de proteção solar, ele é aplicado exclusivamente para as radiações UVB, pois estas são as responsáveis por

causar eritemas. O FPS é definido como o valor obtido pela razão entre a dose mínima eritematosa (DEM), em uma pele protegida por um protetor solar e a dose mínima eritematosa na mesma pele quando desprotegida, conforme é observado na **equação 1**. Vale ressaltar que quanto maior for o FPS de um protetor, maior será a proteção, ou seja, maior será o tempo que a pele ficará protegida diante da radiação UVB. (ARAUJO; SOUZA, 2008; DO NASCIMENTO., 2014; RIBEIRO et al., 2004; SCHALKA; ADDOR, 2008)

Equação 1:

$$FPS = \frac{DME \text{ (na pele protegida)}}{DME \text{ (na pele desprotegida)}}$$

A determinação do FPS dos filtros solares pode ser realizada por métodos *in vivo* ou *in vitro*. É recomendado no Brasil, que a determinação do FPS seja realizada em testes *in vivo* em indivíduos com diferentes tipos de pele. Porém já foram realizados alguns testes *in vitro* que apresentaram bons resultados e uma boa correlação com os métodos *in vivo*, um exemplo é o método espectrofotométrico desenvolvido por Mansur (1986) e colaboradores. Esse método consiste na medida da absorbância de uma radiação que atravessa uma solução contendo uma substância absorvente e na relação entre estas medidas e a concentração da espécie analisada que é capaz de absorver a radiação. Para a determinação do FPS, mede-se a intensidade da luz em comprimentos de onda determinados entre 290 à 320 nm (espectro da região UVB) e depois se aplica a **equação 2**, desenvolvida por Mansur. (ARAUJO; SOUZA, 2008; DO NASCIMENTO., 2014; RIBEIRO et al., 2004; SCHALKA; ADDOR, 2008; MANSUR et al., 1986).

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

Onde: FC = fator de correção (= 10);

$EE(\lambda)$ = efeito eritematogênico da radiação solar em cada comprimento de onda (λ);

$I(\lambda)$ = intensidade da radiação solar em cada comprimento de onda (λ);

$Abs(\lambda)$ = leitura da absorbância obtida da amostra em cada comprimento de onda (λ).

Sendo que o produto entre o efeito eritematogênico (EE) e a intensidade da radiação (I) é constante em cada comprimento de onda, conforme representado na **Tabela 1**.

Tabela 1: Relação entre o efeito eritematígeno e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda.

Comprimento de onda (nm)	EE × I (normalizado) Valores relativos
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Total	1,0000

Fonte: (ROBERT M. SAYRE, PATRICIA POH AGIN; DEPT., 1979)

Foi estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA,2001) que seria obrigatório a indicação do número de proteção solar precedido pela sigla “FPS”, em todos os protetores solares que fossem comercializados contendo expressões orientativas, de acordo com o tipo de pele de cada pessoa. Além disso, no verso da embalagem foi estabelecido que deveria conter expressões orientativas como as apresentadas pela **Tabela 2**.

Tabela 2: Expressões orientativas para rotulagem de protetores solares.

Baixa: (FPS: $\geq 2 < 6$)	Pele pouco sensível	“Oferece baixa proteção contra queimaduras solares”
Moderada: (FPS: $\geq 6 < 12$)	Pele sensível	“Oferece moderada proteção contra queimaduras solares”
Alta: (FPS: $\geq 12 < 20$)	Pele muito sensível	“Oferece alta proteção contra queimaduras solares”
Muito Alta: (FPS: ≥ 20)	Pele extremamente sensível	“Oferece muito alta proteção contra queimaduras solares”

Fonte: ANVISA,2001.

3. JUSTIFICATIVA

Diante do aumento da incidência do câncer de pele, fotoenvelhecimento e outros problemas dermatológicos causados pela exposição à radiação ultravioleta, o uso de protetores solares se torna fundamental, esses por sua vez, tem como principal objetivo reduzir a quantidade de radiação a ser absorvida pela pele humana. Com base nesses fatos se torna essencial o uso de substâncias que tenham a capacidade de proteger a pele, ou seja que apresentem um caráter fotoprotetor. Como exemplo, temos a própolis verde que é uma resina natural, composta por flavonoides, substâncias que são capazes de absorver a radiação UV; o que mostra a possibilidade de utilizar extratos de produtos naturais como a própolis junto aos filtros químicos já existentes, uma vez que essa resina natural pode ser capaz de potencializar o fator de proteção solar desses filtros, exercendo uma atividade fotoprotetora segura e eficaz.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral:

Avaliar a atividade fotoprotetora de extratos hidroalcoólicos de própolis verde em formulação contendo Gel de Permulem TR1.

4.2 Objetivos específicos:

- Preparar os extratos hidroalcoólicos da própolis verde liofilizado a 70% e 75%;
- Avaliar a fotoproteção dos extratos da própolis verde liofilizado;
- Avaliar a fotoestabilidade do extrato da própolis verde 70% com aquecimento;
- Realizar a incorporação do extrato de própolis verde 70% com aquecimento, em Gel de Permulem TR1;
- Avaliar a fotoproteção e a fotoestabilidade do extrato da própolis verde 70% com aquecimento, incorporado ao Gel de Permulem TR1;
- Preparar e analisar a fotoproteção da partição líquido-líquido com o extrato da própolis verde 70% com aquecimento;
- Realizar a triagem fitoquímica do extrato da própolis verde;
- Identificar os compostos fenólicos presentes no extrato da própolis verde por HPLC;
- Realizar e analisar o teste de HET-CAM do extrato da própolis verde 70% com aquecimento incorporado ao Gel de Permulem TR1.

5. METODOLOGIA:

Preparação dos extratos de própolis verde

As amostras de própolis verde liofilizadas utilizadas nas preparações dos extratos foram adquiridas em Pharma Néctar e as amostras brutas de própolis verde foram adquiridas em Caeté, no estado de Minas Gerais, localizado na Região Sudeste do Brasil.

5.1.1 Extrato hidroalcoólico de própolis verde (EHPV) a temperatura ambiente

Os EHPV foram obtidos a temperatura ambiente por maceração durante 48h, utilizando soluções hidroalcoólicas 70% e 75%. Foi pesado em um Becker de 10mL 0,500g da própolis verde liofilizada, em seguida, foi diluída em 3,75 mL de etanol, e deixada a temperatura ambiente por 48h. Após esse procedimento, foi realizado uma filtração a vácuo a temperatura ambiente. Para a secagem dos extratos foi utilizado um secador de laboratório até a obtenção do extrato seco.

Pesou-se 0,010g de extrato seco em um becker de 10mL, em seguida foi transferido para um balão volumétrico de 10mL e diluído com uma solução hidroalcoólica 70% e 75%, dando origem a solução mãe, posteriormente foram retiradas alíquotas de 0,02/0,03/0,05/0,07/0,1mg/mL, que foram transferidas para cinco balões volumétricos de 10mL completando com o mesmo solvente da solução mãe. O álcool etílico 70% e 75% foram utilizados como branco e o experimento foi realizado em triplicata. A partir desta etapa foi realizada a varredura das amostras utilizando o espectrofotômetro de UV-Vis, e em seguida o cálculo do FPS (fator de proteção solar). (ALMEIDA et al., 2019)

5.1.2 Extrato hidroalcoólico de própolis verde com aquecimento

No processo de extração com aquecimento, pesou-se 0,500g de própolis que foi diluída em etanol/água e em seguida foi aquecida em banho-maria, com auxílio de um termômetro a temperatura foi mantida em torno de 70°C. A mistura foi mantida em aquecimento durante 30min.

Após os 30min foi realizada uma filtração a vácuo, e posteriormente, o solvente foi evaporado com o auxílio de um secador. O restante do processo de diluição e varredura para a obtenção dos valores de FPS foi realizado semelhante ao processo da extração com a temperatura ambiente como foi descrito anteriormente.

Ao final da extração, foram obtidos resultados de FPS da extração a temperatura ambiente e da extração com aquecimento sendo que ambas utilizaram porcentagens diferentes de solvente: etanol 70% e 75%, sendo obtido quatro extratos hidroalcoólicos diferentes.

5.2 Partição líquido-líquido com EHPV-70% quente:

O extrato hidroalcoólico da própolis verde 70% com aquecimento (EHPV-70% a quente) apresentou o melhor valor de FPS, e com isso foi desenvolvido em larga escala. A própolis verde liofilizada (28 g) foi extraída usando etanol 70%; sendo 15 mL de etanol para cada 2 g de amostra, a extração foi realizada utilizando banho-maria, controlando a temperatura em torno de 70°C durante 30 min.

Posteriormente, a amostra foi filtrada e 100 mL de etanol (70%) foram adicionados ao resíduo, e outra extração alcoólica foi realizada. A solução obtida a partir das duas extrações foi seca para obter 8,35 g do extrato etanólico. Parte deste extrato etanólico (5,35 g) foi submetida a partição líquido-líquido. Para isso, o extrato etanólico foi dissolvido em etanol absoluto e em água 7: 3 e então 100 mL de hexano foram adicionados. O procedimento foi repetido novamente com 100 mL de hexano.

Uma partição adicional com o solvente clorofórmio (100 mL, duas vezes) foi realizada. Como resultado a camada orgânica foi evaporada para produzir as frações hexânica (0,0208 g) e clorofórmica (3,1974 g). Após a obtenção das frações, elas foram diluídas, obtendo-se solução mãe para cada partição e realizado a diluição em 5 concentrações, as mesmas utilizadas para o EHPV, em seguida foi realizado a leitura espectrofotométrica das duas partições, para então realizar o cálculo do FPS.

5.3 Formulação Fotoprotetora do Gel de Permulem TR1:

Dentre os quatro extratos que foram obtidos e analisados, o extrato hidroalcoólico de própolis verde que apresentou maior valor de FPS foi incorporado na formulação fotoprotetora do Gel de Permulem TR1.

O EHPV-70% obtido por aquecimento, foi solubilizado em etanol e propilenoglicol com a proporção de 1: 1 e incorporado ao Gel Permulem TR1. Essa mistura foi deixada sob agitação por um período de 20 a 30 minutos. A composição final da formulação foi de 1% de extrato hidroalcoólico de própolis, 10% de etanol, 10% de propilenoglicol e Gel Permulem TR1 q.s.p.100%.

Em seguida, a formulação foi pesada, diluída em uma mistura de etanol/água, (1:1) e transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL obtendo-se uma concentração de 0,1 mg/mL. Através de um espectrofotômetro foi realizada a varredura da formulação em triplicata, e do gel sem a presença da própolis, e posteriormente foi realizado o cálculo do FPS. (ALMEIDA et al., 2020)

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

O espectrofotômetro é um equipamento acoplado a um computador, e para que seja possível realizar as leituras das amostras nesse equipamento foi utilizado cubetas de quartzo, com caminho óptico de 1,0cm. Para determinação da absorbância máxima na região do ultravioleta UVB, cada amostra com sua respectiva concentração foi transferida para as cubetas. A varredura foi então realizada entre os comprimentos de onda de 290nm a 320nm com intervalo de 5nm.

Posteriormente os dados coletados foram analisados utilizando o Excel, e através da equação do método de Mansur (1986) foi possível determinar o valor de FPS de cada concentração. É importante lembrar que para se obter resultados satisfatórios os valores de FPS devem ser crescentes, ou seja, quanto maior a concentração utilizada maior também deve ser o valor do FPS.

Para se avaliar os resultados obtidos da varredura das amostras foi utilizado o método de Mansur com a seguinte equação:

Equação para cálculo de fator de proteção solar:

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

5.5 Avaliação da Fotoestabilidade

A fotoestabilidade tem como objetivo demonstrar que uma exposição a luz não resulta em decomposições significantes nos extratos em análise. O teste de fotoestabilidade foi realizado utilizando uma câmara de luz com uma lâmpada UV no comprimento de onda de 365 nm. Após analisar os valores de FPS de cada extrato, a concentração do extrato analisado que apresentou maior valor de FPS (0,10 mg/mL) foi utilizada para realizar a fotoestabilidade. Foi realizado o teste de fotoestabilidade do extrato de própolis verde (EHPV 70% a quente), do Gel Permulem

TR1 e Gel Permulem TR1 incorporado com EHPV 70% a quente. As soluções a 0,10 mg/mL, foram depositadas em balões volumétricos de 10 ml e ficaram expostas a radiação por 1 h e 30 minutos, avaliando a absorbância a cada 15 min de exposição a luz. O extrato e a formulação obtidos foram estáveis na presença de luz ultravioleta.

5.6 Triagem Fitoquímica

Foram realizados testes químicos no extrato hidroalcoólico da própolis verde, que apresentou maior valor de FPS, para identificar os fitoconstituintes, ou seja, alcaloides, antraquinonas, flavonoides, saponinas, taninos e terpenóides, conforme procedimento padrão. (ABALAKA et al., 2011). A análise dos fenólicos totais foi realizada pelo método Folin-Ciocalteu, segundo Bonoli (2004).

5.7 Identificação dos compostos fenólicos por HPLC

Para cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (HPLC), 10 mg de extrato de própolis verde 70% a quente, foram ressuspensos em 1 ml de metanol e submetido a extração em fase sólida (C-18, 100 mg) para remover a cera e o material lipofílico.

O extrato obtido foi filtrado em uma membrana de acetato de celulose de 0,22 µm e então, submetido à análise CLAE-DAD. Para isso, uma quantidade de 20 µl dessas amostras foram analisadas por LC-DAD-ESI-MS/MS utilizando um sistema Shimadzu, acoplado a um espectrômetro de massa micrOTOF-Q II equipado com um Fonte ESI e um quadrupolo-tempo de analisador de voo.

As separações cromatográficas foram obtidas usando uma coluna cromatográfica Ascentis Express C-18 (150 × 4,6 mm, 2,7 µm) protegida por uma pré coluna da mesma fase estacionária, que foi mantida a 30 ° C. A taxa de fluxo foi mantida em 1 ml /min aplicando um solvente gradiente com a fase A (água com 0,1% de ácido fórmico) e fase B (acetonitrila com 0,1% ácido fórmico), começando em 5% de B a 100% de 0 a 60 min.

A espectrometria de massa em tandem e a alta resolução foram realizadas nos modos positivo e negativo em um intervalo de m/z 50–1300. O equipamento estava internamente calibrado com ácido trifluoroacético (TFA). Os parâmetros de MS foram definidos da seguinte forma: pressão do gás do nebulizador: 5,0 bar; fluxo de gás seco: 10,5 L/min; tensão capilar: 3600 V; deslocamento da placa: - 450 V, temperatura da fonte de íons: 220 ° C; e aquisição de taxa de espectros: 2 espectros /s.

A fragmentação automática *MS / MS* foi realizada para os quatro íons mais intensos por espectro, e foi realizado aplicando um gradiente de energia de dissociação induzida por colisão de 20 a 50 V de acordo com a massa parental. Todos os dados de MS foram analisados com o software Bruker Compass DataAnalysis 4.3.

5.8 Teste de HET-CAM

O teste HET-CAM foi realizado para o Gel Permulem TR1 incorporado com EHPV que apresentou maior valor de FPS, de acordo com Luepke (1985). O ensaio baseia-se na análise do aparecimento de reações irritativas na membrana corioalantóica dos ovos de galinha fertilizados em resposta à exposição de substâncias testadas. Para o procedimento foi obtido comercialmente ovos de galinha fértil (Granja Tomolei, RJ, Brasil) sem micoplasmas e utilizados após o décimo dia de incubação a 38°C. Os ovos foram abertos perto da aérea da célula usando uma tesoura para revelar a membrana corioalantóica (CAM) altamente vascularizada. Depois de 20 segundos da aplicação do produto (0,1 mg), a superfície CAM foi lavada com solução salina e observada durante um período de 300 segundos para verificar se ocorreu o aparecimento de hemorragia, lise ou coagulação. O controle positivo utilizado foi 0,1 mol / L de hidróxido de sódio e o controle negativo foi 0,9% de cloreto de sódio. Para cada amostra foram utilizados 3 ovos.

Os efeitos irritantes foram classificados por escores de acordo com o tempo em que foram observados: menos de 30 s (hiperemia: 5; hemorragia: 7; formação de coágulo / opacidade: 9); entre 30 e 120 s (hiperemia: 3; hemorragia: 5; formação de coágulos / opacidade: 7); ou entre 120 e 300 s (hiperemia: 1; hemorragia: 3; coagulação / opacidade: 5). Se um efeito não for observado após 300 s, será marcado como zero. Cada formulação foi classificada de acordo com a pontuação média de três ovos: 0–4,99 correspondendo a não irritante / levemente irritante (NI / SI); 5,00–8,99 correspondendo a moderadamente irritante (MI); e 9,00–21,00 correspondendo a severamente irritante (SVI).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Determinação do fator de proteção solar (FPS) *in vitro*.

De acordo com o avanço de pesquisas e seguindo a tendência da utilização de produtos naturais na elaboração de cremes, bases dermatológicas e géis, ou seja, os produtos cosméticos de uma forma geral, vários estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de verificar e validar o potencial fotoprotetor de extratos e óleos vegetais que apresentem em sua composição, flavonoides, taninos, antraquinonas, alcaloides e entre outros. (OLIVEIRA; NAKANO; ROCHA-FILHO, 2007)

A avaliação da atividade fotoprotetora dos extratos hidroalcoólicos de própolis verde (EHPV) 70% e 75%, a temperatura ambiente e a quente foram realizadas, através de análises espectrofotométricas, **Tabela 3**. Além dos extratos vegetais puros, o controle positivo, quercetina também foi avaliado quanto a sua atividade fotoprotetora.

Tabela 3: Valores de FPS (média \pm desvio padrão) obtidos a partir da leitura espectrofotométrica dos EHPV e do controle positivo.

Concentração (mg/mL)	70% a frio	70% a quente	75% a frio	75% a quente	Controle positivo (Quercetina)
0,02	9,49 \pm 0,025	9,16 \pm 0,010	9,29 \pm 0,007	8,08 \pm 0,014	7,95 \pm 0,085
0,03	13,78 \pm 0,035	14,10 \pm 0,005	12,11 \pm 0,006	14,08 \pm 0,028	10,01 \pm 1,460
0,05	23,17 \pm 0,040	23,83 \pm 0,024	19,78 \pm 0,024	23,73 \pm 0,003	15,18 \pm 0,008
0,07	31,78 \pm 0,030	32,71 \pm 0,030	24,76 \pm 3,490	32,49 \pm 0,066	22,74 \pm 0,035
0,10	37,95 \pm 0,040	38,08 \pm 0,100	35,11 \pm 0,057	37,98 \pm 0,035	28,22 \pm 0,029

As leituras das amostras foram realizadas utilizando espectrofotômetro, GENESYS 10S. Foram analisadas 5 concentrações diferentes de extratos de própolis verde, e as leituras foram

realizadas em triplicata e feito o desvio padrão correspondendo a cada concentração analisada; e quanto maior a concentração do extrato, maior foi o FPS obtido, isso está diretamente relacionado com o teor de flavonoides entre outras substâncias que estão presentes na composição da própolis, e que são consideradas capazes de absorverem a radiação ultravioleta.

Os resultados obtidos representados na **Tabela 3**, demonstraram que os extratos de própolis verde puros quando analisados pela sua atividade fotoprotetora, apresentaram altos valores de FPS, pois de acordo com a legislação brasileira, RDC Nº 30 de 1º de junho de 2012 (BRASIL, 2012), um produto para ser utilizado como fotoprotetor, deve apresentar FPS de no mínimo 6, e os resultados de FPS da própolis verde a temperatura ambiente e a quente, ambos em sua maior concentração (0,10 mg/mL) apresentaram valores acima de 30.0, e em sua menor concentração (0,02 mg/mL) valores acima de 8.00.

Analisando de uma forma geral, todos os extratos 70% e 75%, promoveram proteção solar, ou seja, apresentaram atividade fotoprotetora considerável, e nas concentrações mais elevadas seus resultados foram maiores e melhores do que o controle positivo, a quercetina.

É possível observar também, que não houve diferença estatística, com relação a porcentagem do solvente utilizado entre os extratos 70% e 75%, e que o extrato com maior potencial fotoprotetor foi o extrato 70% a quente, na concentração de 0,10 mg/ml apresentando FPS de 38.08, por essa característica e pelo fato de apresentar menor teor alcoólico, quando comparado ao extrato de 75% a quente, ele foi selecionado para ser incorporado a formulação de gel.

6.2 Partição Clorofórmica e Hexânica

Como foi apresentado na tabela 3, o EHPV 70% a quente, foi o que apresentou maior valor de FPS, quando comparado com os resultados dos demais extratos. Posteriormente, foi realizado uma partição líquido-líquido, utilizando o extrato com maior potencial fotoprotetor. Os resultados dessa partição estão representados na **Tabela 4**.

Tabela 4: Valores de FPS (média \pm desvio padrão) calculados a partir das frações do EHPV 70% a quente, em diferentes concentrações.

Concentração mg/mL	FPS – EHPV 70% A QUENTE	
	Partição Clorofórmica	Partição Hexânica
0,02	4,22 \pm 0,035	3,15 \pm 0,030

0,03	7,53 ± 0,040	4,32 ± 0,035
0,05	12,83± 0,035	7,81 ± 0,030
0,07	17,53 ± 0,035	11,30±0,020
0,10	23,21± 0,025	16,07±0,040

Baseados nos valores expostos na **Tabela 4**, é observado que após a realização da partição clorofórmica e hexânica, a fração clorofórmica apresentou valores de FPS maiores, quando comparados com os valores obtidos na fração hexânica, levando em consideração que eles foram analisados sob as mesmas concentrações e condições. Esses resultados, indicam que os compostos polares são os principais bioativos do extrato, sendo considerados como os elementos cruciais, responsáveis pela atividade de fotoproteção apresentada.

Em contrapartida, antes da obtenção da partição, o EHPV 70% a quente, exibiu valores de FPS maiores, ou seja, apresentou maior atividade fotoprotetora. A partir desses resultados e observações, essa redução do FPS após a partição, revelou um efeito sinérgico entre as substâncias do EHPV 70% a quente, consequentemente, o uso de todo o extrato, demonstrou ser mais vantajoso do que a utilização das frações. (ALMEIDA et al., 2020)

6.3 Formulação

Após a partição líquido-líquido, foi desenvolvida uma formulação utilizando Gel Permulem TR1, tendo como princípio ativo o EHPV 70% a quente, pois de acordo com a tabela 3, foi o extrato que apresentou maior capacidade fotoprotetora, portanto, ele foi selecionado para ser incorporado na formulação. Na **Tabela 5**, é possível analisar os valores de FPS obtidos.

Tabela 5: FPS do EHPV 70% a quente incorporado ao Gel Permulem TR1.

Formulações na concentração de 0,1 mg/ml	FPS
Gel de Permulem TR1, 70%	2,47 ± 0,12
EHP Verde 70% a quente, incorporado na formulação Gel Permulem TR1	25,42 ± 0,80

Atualmente, muitas pesquisas têm voltado a atenção para explorarem as propriedades que a própolis apresenta, tais como propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e

entre outras. Dentre essas propriedades, a capacidade de fotoproteção, da própolis, vem ganhando destaque e interesse por parte dos pesquisadores. Nos últimos anos, as substâncias naturais com potencial fotoprotetor, têm sido progressivamente incorporadas em formulações dermocosméticas, a fim de aumentar a proteção da pele contra os danos causados pelos raios UVA e UVB. (SANTIAGO, PINTO et al., 2013)

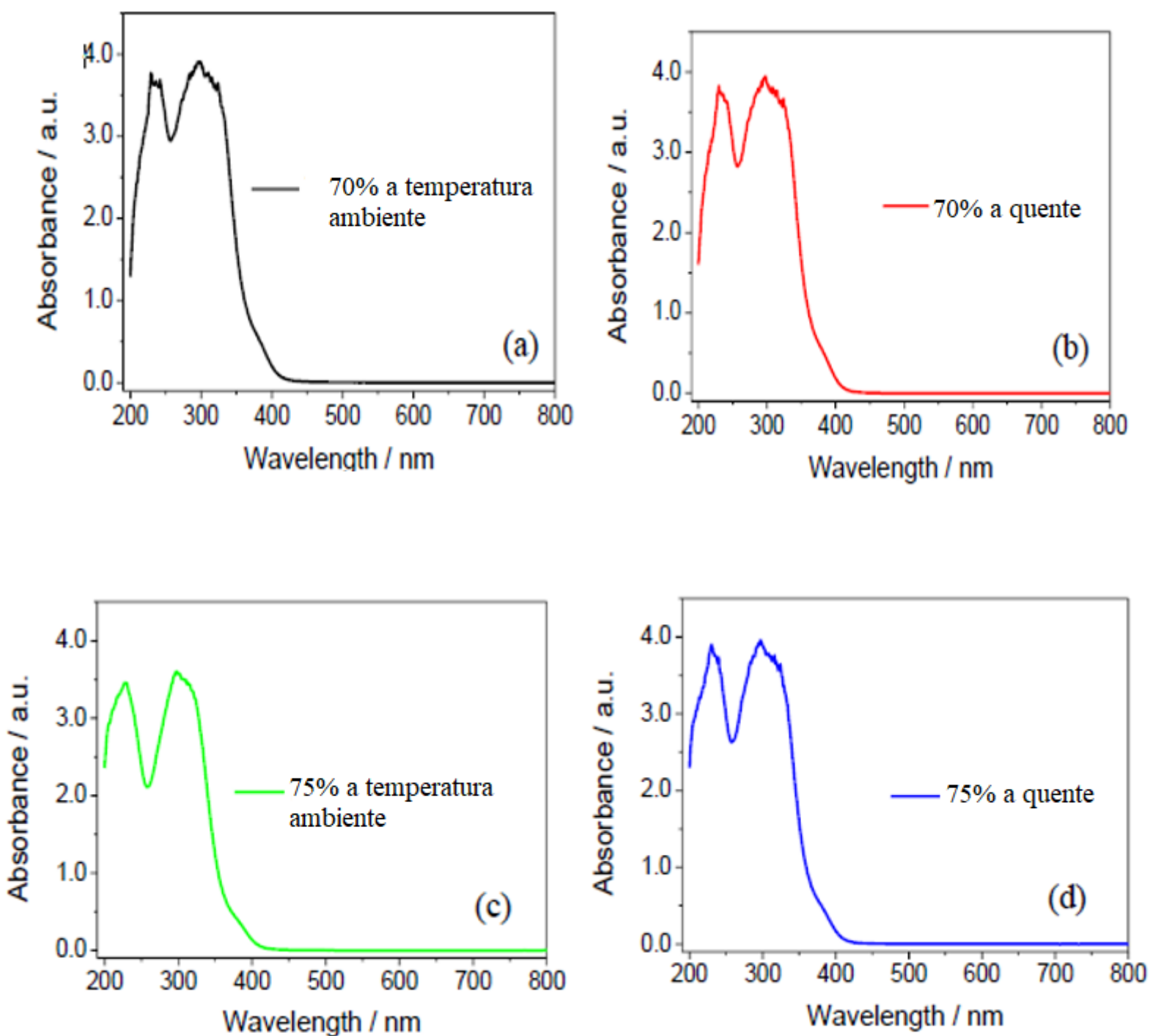
A formulação desenvolvida nesta pesquisa, apresentou um aspecto visual e textura adequados para ser aplicada topicamente. Em relação a composição, possui como princípio ativo, o EHPV 70% a quente e como excipientes, apresenta o propilenoglicol, que é considerado um solvente fundamental para a incorporação de essências e princípios ativos em preparações farmacêuticas e cosméticas. Além disso, o propilenoglicol, apresenta um potencial de inibição da fermentação e do emboloramento semelhante ao do etanol. O etanol 70% também foi utilizado na formulação com a função de co-solvente do extrato de própolis. (FONSECA, 2007)

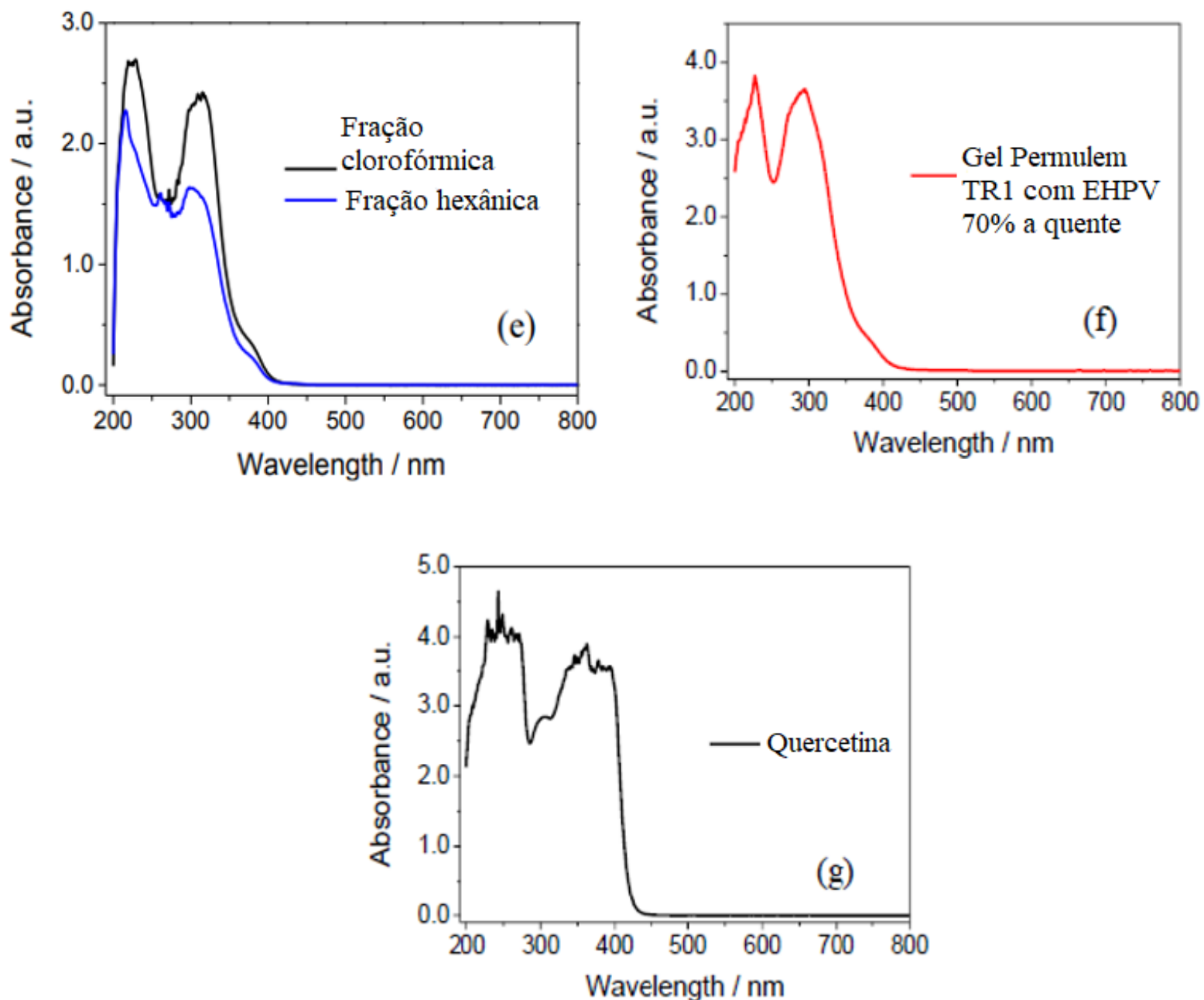
Analizando a **Tabela 5**, é possível observar que apenas a base do Gel de Permulem TR1 sozinho apresenta valor de FPS= 2,47, o que sugere e comprova que apenas a base do gel não é capaz de absorver a luz ultravioleta nos comprimentos de onda que foram analisados (290nm a 320nm com intervalo de 5nm). Porém quando o EHPV 70% a quente, é incorporado ao gel, ocorre um sinergismo entre as amostras e seus componentes, resultando em um aumento significativo no valor de FPS da formulação que vai para 25,42, isso garante que as absorbâncias encontradas nas leituras são exclusivamente do extrato analisado, comprovando que o extrato de própolis verde, possui uma excelente atividade fotoprotetora. Diante disso, a própolis verde pode ser considerada uma das opções de princípio ativo de formulações fotoprotetoras, a fim de proteger a epiderme contra os efeitos da radiação solar.

6.4 Determinação da absorbância máxima dos EHPV, das partições e do Gel Permulem TR1 incorporado com EHPV 70% com aquecimento.

Fundamentado em literaturas recentes, um dos princípios cruciais que determinam a eficácia de um produto natural, como fotoprotetor, é a sua composição química e consequentemente sua capacidade em absorver no espectro ultravioleta. (VIOLANTE et al., 2009). Com base nesses relatos, foi realizado uma avaliação da atividade fotoprotetora, com a determinação da absorbância, dos extratos de própolis verde, através da varredura espectrofotométrica, como é observado nos gráficos, apresentados na (**Figura 6**).

Figura 6. Espectros de absorção de UV / Vis de todos os extratos (a-d), partições (e), Gel Permulem TR1 (f) e quercetina (g).





Analisando os gráficos da **Figura 6**, é possível observar que os extratos hidroalcoólicos da própolis verde, a temperatura ambiente, espectros (a) e (c) e com aquecimento, espectros (b) e (d); a quercetina como controle positivo, representada no espectro (g) e o espectro (f) representando o Gel Permulem TR1 incorporado ao EHPV 70% a quente, na concentração de 0,1mg / mL, apresentaram absorbância entre 200-400 nm, nas regiões ultravioleta UVA, UVB e UVC.

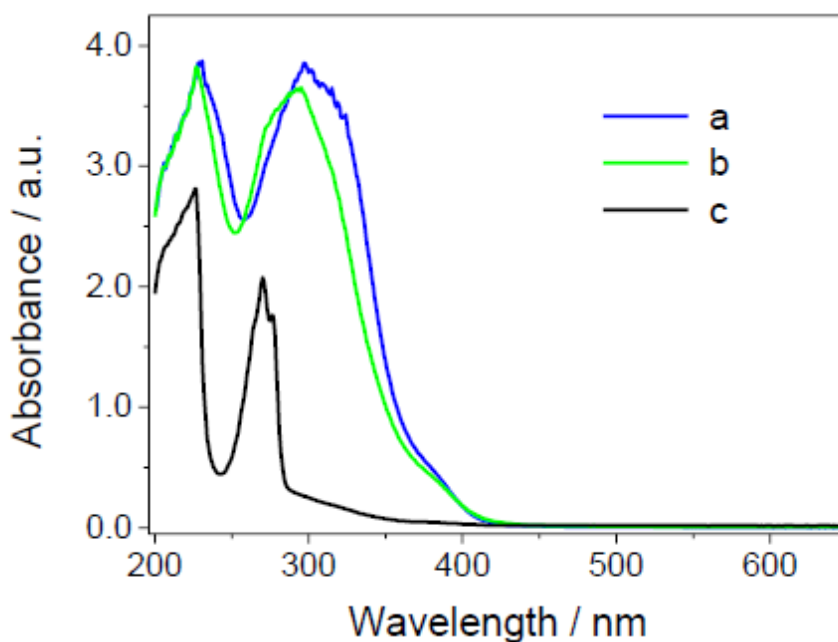
A leitura espectrofotométrica dos extratos hidroalcoólicos da própolis verde, e do extrato incorporado ao Gel, revelaram dois picos de absorção mais perceptíveis na análise, sendo um

no comprimento de onda 240 nm, região do UVC, e outro em 290 nm, região do UVB.

Esses resultados indicam um potencial efeito fotoprotetor do extrato de própolis verde frente às radiações ultravioletas, provavelmente, isto se justifica pela presença de flavonóides, o que confirma a assertiva de que quando essas substâncias são dispersas em etanol (solvente utilizado para a extração) esses componentes químicos são capazes de revelar dois picos de absorção, um na região UVC e outro na região UVB. (VIOLANTE et al., 2009) Com relação as partições realizadas, a fração clorofórmica apresentou bandas de absorção mais intensas, quando comparada com a fração hexânica na mesma concentração, entretanto ambas as frações apresentaram dois picos de absorção, um na região UVB e outro no UVC, de acordo com o exposto no espectro (e).

Ainda sobre os espectros de absorção, podemos observar na (**Figura 7**), a incorporação do EHPV-70% a quente, junto ao Gel Permulem TR1, que originou um deslocamento batocrômico, onde as bandas UV de EHPV 70% a quente, estão deslocadas para um comprimento de onda mais longo e absorbâncias maiores, comprovando a incorporação das substâncias analisadas.

Figura 7. Espectros de absorção de UV / Vis de EHPV (70% quente) (a), EHPV (70% quente) incorporado em Gel Permulem TR1 (b) e Gel Permulem TR1 (c).

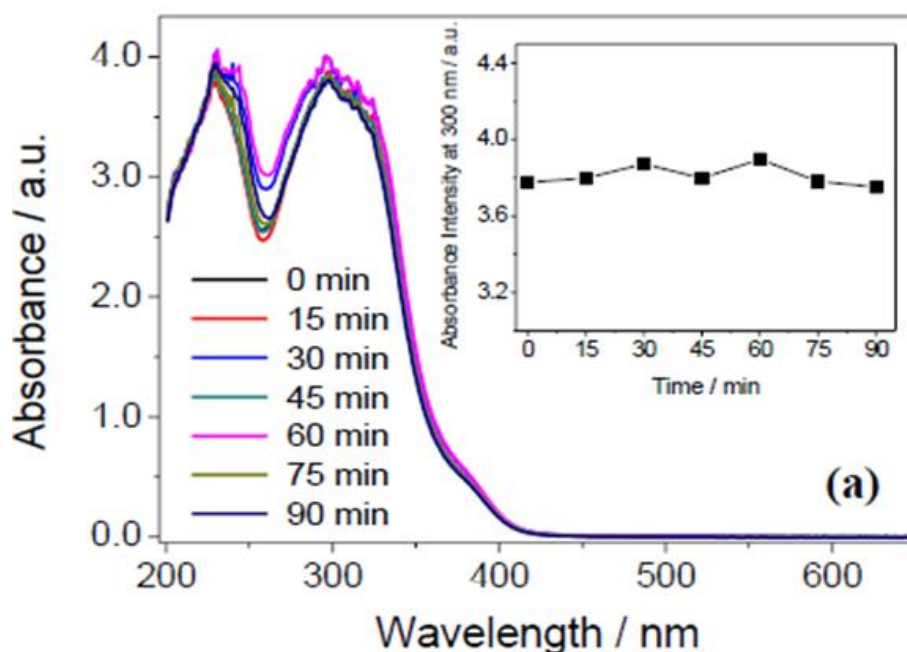


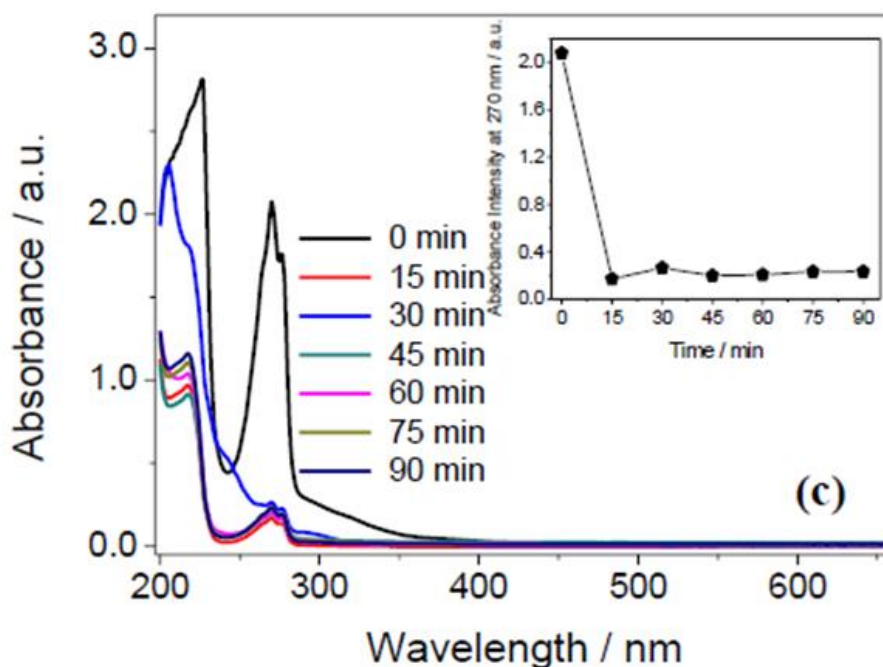
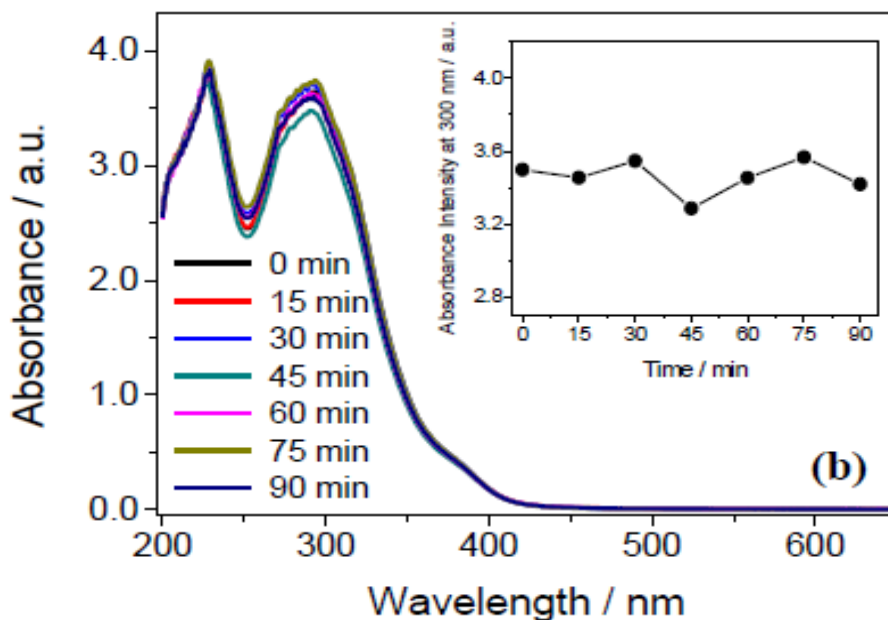
6.5 Avaliação da Fotoestabilidade

A fotoestabilidade de um filtro solar é a manutenção da eficácia fotoprotetora após a absorção da radiação ultravioleta, além de estar exclusivamente ligada à sua capacidade de liberar a energia absorvida para o meio externo sem sofrer alterações estruturais. Para a realização dos testes de fotoestabilidade, que conta com o objetivo de demonstrar que uma exposição à luz não resulta em alterações significantes no produto; deve-se manter um controle apropriado da temperatura, a fim de minimizar os efeitos de alterações localizadas deste fator. A amostra em análise, deve ser exposta diretamente a luz ou protegida em um recipiente quimicamente inerte e transparente. (MAIER et al., 2005; PERUGINI et al., 2002)

As amostras foram expostas em uma câmara oticamente isolada do ambiente externo com ventilação apropriada e a câmara por sua vez, estava em uma sala com temperatura controlada. Os resultados deste teste estão representados na (**Figura 8**).

Figura 8. Gráficos de fotoestabilidade do EHPV (70% quente) (a) e Gel Permulem TR1 incorporado com EHPV (70% quente) (b) e Gel Permulem TR1 (c).





As inserções mostram a intensidade de absorção versus tempo de exposição à radiação UV. Com os resultados obtidos da fotoestabilidade, é possível afirmar que a substância em estudo a própolis, como exposto no espectro (a), pode ser considerada um produto fotoestável e que ela não se degrada na presença dos raios ultravioletas, garantindo assim uma maior segurança para uso deste produto quando incorporado a formulação fotoprotetora do gel. Ao avaliarmos os gráficos (a) e (b), podemos observar que não houve diferença significativa entre

os tempos de radiação: 15, 30, 45, 60, 75, 90 minutos, o que comprova a estabilidade do material em análise, e da própolis juntamente com a formulação fotoprotetora do gel.

6.6 Triagem fitoquímica.

A investigação das classes de metabólitos secundários, foi realizada através da triagem fitoquímica. A **Tabela 6** expõe os resultados com a presença ou a ausência dos fitoconstituintes testados no extrato hidroalcoólico da própolis verde.

Tabela 6: Análise fitoquímica da EHPV-70% quente.

Alcalóide	Antraquinona	Flavonoide	Saponina	Tanino	Terpenóide
-	-	+	-	-	+

+ = presente; - = ausente

De acordo com os resultados expostos acima, verifica-se que o EHPV-70% a quente (mais ativo) apresentou um resultado positivo para flavonoides e terpenóides. Tal fator, justifica a utilização da própolis, como uma substância fotoprotetora, pois os fitoconstituintes presentes em sua composição química são capazes de absorverem a radiação UV, devido a semelhança da estrutura química que esses compostos apresentam com os filtros químicos, que já existem no mercado, sendo aplicados na pele e protegendo-a contra os danos causados pelos raios ultravioletas.

Ademais, a presença desses fitoconstituintes, indicam que a própolis possui, diversas atividades biológicas, sendo que essas atividades estão diretamente relacionadas com o sinergismo que ocorre entre seus diferentes componentes. Essas substâncias fenólicas presentes (+) são as que mais se destacam, principalmente os flavonoides, por possuírem atividades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias. (DOS SANTOS et al., 2020)

6.7 Análise dos compostos fenólicos identificados por HPLC

No Brasil, existe uma grande diversidade de própolis com composição química diferente. A técnica de CLAE-DAD nas condições experimentais já descritas anteriormente demonstra ser um método valioso para a determinação qualitativa e quantitativa das substâncias mais relevantes da própolis. A análise constitui uma alternativa para a identificação confiável de diversos componentes polifenólicos da própolis. (VOLPI; BERGONZINI, 2006)

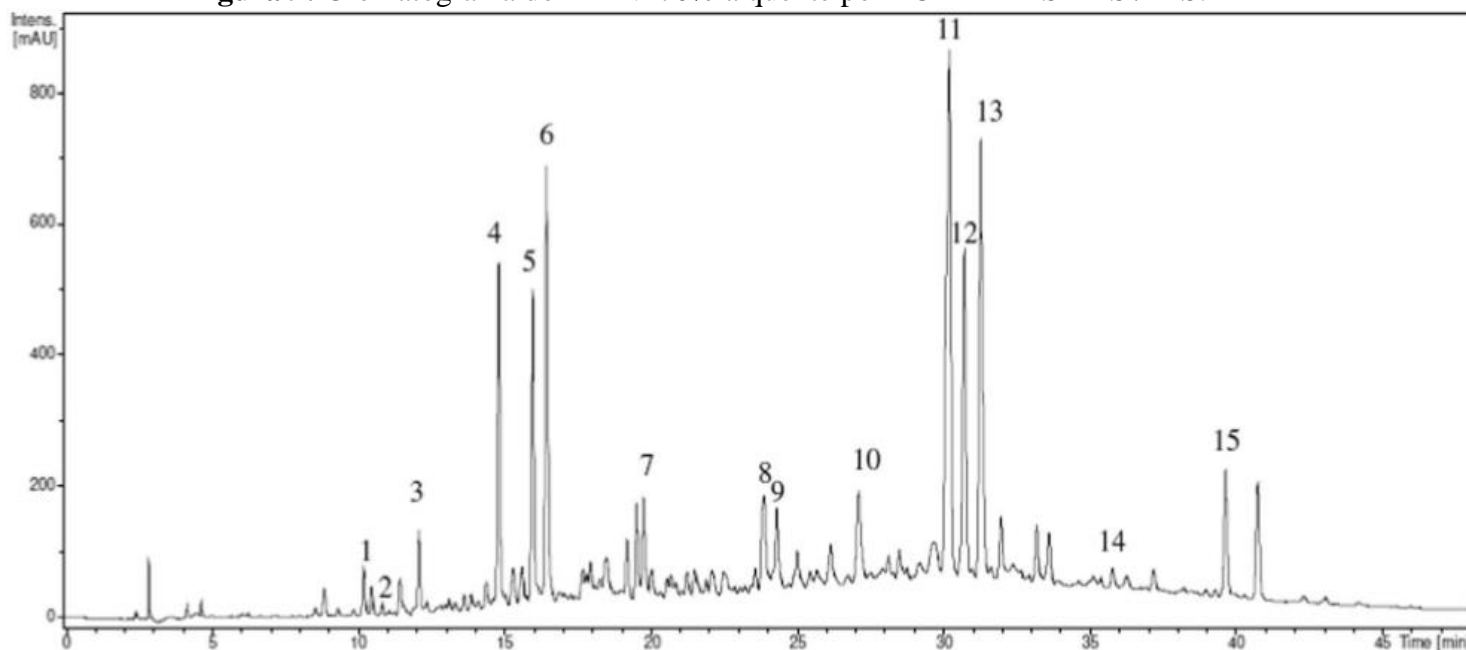
A **Tabela 7** e a **Figura 9** apresentam os resultados da CLAE-DAD que possibilitou a identificação de quinze compostos fenólicos presentes na amostra do EHPV 70% a quente.

Tabela 7: Compostos do EHPV-70% a quente identificados por LC-DAD-ESI-MS/MS.

Pico	Composto	<i>RT^{em}</i>		Ionização positiva (m/z)		Ionização negativa (m/z)	
		(min)	UV max (nm)	HRMS [M+H] ⁺	MS/MS (20-50 eV)	HRMS [M-H] ⁻	MS/MS (20-50 eV)
1	Ácido clorogênico	10.2	300 (326sh)	355.0841	355→337, 163, 135, 117	353.0944	353→191
2	Apigenina-6,8-di-C-Glucosídeo (vicenina-2)	10.9	270, 329	595.1339	395→577, 559.457	593.1617	593→473, 383.353
3	p-ácido cumárico	15.0	280; 308	165.0440	165→147, 119, 91	163.0428	163→119
4	p- Isômero de ácido coumaroylquinico	12.2	313	339.0901	335→147, 119, 91	337.0989	337→295, 191, 93
5	Isômero de ácido dicaffeoylquinico	16.0	242; 328	517.1050	517 →499, 337, 319, 163, 117	515.1289	515→353
6	Isômero de ácido dicaffeoylquinico	16.5	242; 329	517.1058	517 →499, 337, 319, 163, 117	515.1289	515→353
7	Ácido tricaffeolquinico	19.8	299, 324	792.1262	679→517, 499, 337, 291, 163, 135	677.1640	677→515, 353.335
8	Quercetina-3-metil-éter	23.9	267, 319, 368	317.0488	317→302, 121, 107	315.0578	615→300.271
9	Dihydrokaempferida	24.4	291.332 (sh)	303.0722	303→285, 257, 229, 185	301.0790	301→283
10	Ácido agathico	27.2	303	335.1673	335→317, 299, 283, 257, 213, 195	333.1772	333→315
11	Luteolina-metil-éter	30.0	272, 313	301.0559	301→286, 248, 153, 124	299.0624	299→284, 255, 132
12	Quercetina-dimetil-éter	30.7	270, 330	-	-	479.2148	479→329, 259, 229
13	Liquiritigenina-glicosídeo (apioseapiose-ramnose)	31.2	256.290.	707.2603 [M+Na+18] ⁺	689→557, 425, 279	-	-
14	3-diprenil-4- hidroxicinâmico ácido cinâmico	39.6	279	365.1538	365→291, 215, 177, 159, 131, 105	363.1665	363→319

um RT: tempo de retenção

Figura 9: Cromatograma do EHPV-70% a quente por LC-DAD-ESI-MS / MS.



A Bacarina foi identificada no EHPV 70% quente, sugerindo a espécie *Baccharis* como uma das fontes de espécies botânicas utilizadas pelas abelhas para a elaboração da própolis verde. A substância Artepillin (composto 14) também foi identificada, porém não é um dos principais compostos. O perfil de compostos fenólicos do EHPV 70% quente difere da maioria dos extratos de própolis verde. (COELHO et al., 2017)

Os compostos presentes nos extratos da própolis estão relacionados principalmente à sua origem botânica. Pesquisas destacam as diferenças entre as amostras de própolis verde de algumas regiões do Brasil, com ausência de compostos marcadores, como os compostos 1 e 2.(COELHO et al., 2017; MACHADO et al., 2016)

Analisando o cromatograma (**Figura 9**), deve-se levar em consideração que quanto maior a intensidade de um pico no cromatograma, maior é a concentração de determinada substância na amostra em análise, e os picos que apresentam menor tempo de retenção (RT), ou seja, que estão no início do espectro, significa que apresentam uma menor interação com a coluna cromatográfica, e quanto maior é o tempo de retenção em minutos, maior é a interação dos compostos com a coluna. Todos os compostos identificados e apresentados pela **Tabela 7** e pelo cromatograma na **Figura 9**, são metabólitos secundários classificados como fenólicos, que são fundamentais para a planta se proteger dos danos causados pela radiação UV. Devido à sua estrutura química, esses compostos fornecem fotoproteção por meio de sua triagem UV e seus

efeitos antioxidantes. (TAKSHAK; AGRAWAL, 2019). A presença destes quinze compostos fenólicos no EHPV 70% a quente justifica os resultados para a atividade fotoprotetora exercida pela formulação desenvolvida neste trabalho.

6.8 Teste HET-CAM

Para que a formulação fotoprotetora desenvolvida, possa ser considerada segura para a aplicação tópica, é imprescindível a avaliação do potencial irritante dessa formulação, que pode ser realizado através de testes *in vitro* e *in vivo*, visando a segurança desses produtos quando aplicados na pele. Deste modo, foi realizado o teste de HET-CAM (teste de membrana corioalantóica de ovo de galinha) *in vitro* (**Figura 10**), que diz sobre o potencial ocular irritativo de uma dada substância, bem como dos defeitos que a mesma pode provocar na membrana ocular. (BARILE, 2010; REIS MANSUR et al., 2016)

Figura 10: Fotografias representativas do teste HET-CAM do Gel Permulem TR1 incorporado com EHPV 70% quente, controle negativo (NaCl 0,9%) e controle positivo (NaOH 0,1 mol / L) após 300 s de contato.



Controle negativo

Controle positivo

Gel + EHPV 70% a quente

O método utilizado em questão, é fundamentado na semelhança entre a membrana corioalantóica (CAM) de um ovo de galinha com embrião e os tecidos mucosos vascularizados dos olhos de coelhos e de humanos. Na avaliação desse teste, deve-se verificar se ocorreu hemorragia, coagulação ou hiperemia dos vasos sanguíneos, além de avaliar a toxicidade da substância, baseados no índice de irritação (IS). Esses efeitos irritantes que foram observados foram classificados, levando em consideração o tempo no qual foram testados, 300 segundos de contato. (REIS MANSUR et al., 2016; SCHEEL et al., 2011)

Analisando a **Figura 10**, é possível verificar que quando aplicado o controle negativo (NaCl 0,9%) na membrana, foi observado ausência de qualquer tipo de alteração, durante os 300 segundos de contato. Em contrapartida, no controle positivo (NaOH 0,1 mol / L) foi observado hiperemia e coagulação dos vasos sanguíneos, que corresponde a irritabilidade severa.

Com relação a formulação Gel Permulem TR1 incorporado com EHPV 70% quente, quando em contato com a membrana após 300 s, os resultados indicaram leve hiperemia pontual e hemorragia, resultando em uma pontuação média de 2,0. De acordo com a classificação por pontuação, a formulação foi então, classificada como não irritante / levemente irritante (NI / SI), sugerindo que é segura para ser aplicada na pele com menor potencial de irritação, uma vez que a irritação da pele se inicia com alterações vasculares.

7. CONCLUSÃO

Todos os extratos hidroalcoólicos da própolis verde 70% e 75%, a temperatura ambiente e com aquecimento, nas concentrações analisadas, apresentaram valores de FPS satisfatórios. Ademais, o trabalho desenvolvido evidenciou a importância de se aplicar extratos vegetais de própolis verde em formulações dermocosméticas como a do Gel Permulem TR1, uma vez que a presença da própolis no gel, promoveu um aumento significativo na atividade fotoprotetora da formulação desenvolvida, o que sugere a sua indicação para o uso em produtos fotoprotetores, além de comprovar sua fotoestabilidade frente a exposição aos raios UV. Por fim, com base na avaliação do teste HET-CAM, e dos demais resultados apresentados, a formulação desenvolvida mostrou-se promissora para aplicação na pele sem causar irritações.

8. REFERÊNCIAS

- ABALAKA, ME, Adeyemo SO, Daniyan SY. Avaliação dos potenciais antimicrobianos dos extratos de folhas de *Khayasenegalensis*. **J. Pharm Res.** Opinião 1(2):48–51, 2011.
- ALMEIDA, W. A. DA S. et al. Photoprotective activity and increase of SPF in sunscreen formulation using lyophilized red propolis extracts from Alagoas. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 29, n. 3, p. 373–380, 2019.
- ALMEIDA, W. A. DA S. et al. Green Propolis: In Vitro Photoprotective and Photostability Studies of Single and Incorporated Extracts in a Sunscreen Formulation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2020.
- ANDRADE, S. P. et al. Aqueous extract of Brazilian green propolis: Primary components, evaluation of inflammation and wound healing by using subcutaneous implanted sponges. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, 2011. Disponível em <<https://doi.org/10.1093/ecam/nep112>>.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução nº 161, de 11 de setembro de 2001. Lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Disponível em <<http://elegis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=262>>.
- ARAÚJO, T. S. DE; SOUZA, S. O. DE. Protetores Solares e os Efeitos da Radiação Ultravioleta. **Scientia Plena**, v. 4, n. 11, p. 1–7, 2008.
- BABY, A. R. et al. Estabilidade e estudo de penetração cutânea in vitro da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, 2008.
- BAILLO, V. P.; LIMA, A. C. DE. Nanotecnologia aplicada à fotoproteção. **Rev. Bras. Farm**, v. 93, n. 3, p. 271–278, 2012.
- BALOGH, T. S. Uso cosmético de extratos glicólicos: avaliação da atividade antioxidante, estudo da estabilidade e potencial fotoprotetor. p. 1–267, 2011. Disponível em <<https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000400016>>

- BALOGH, T. S. et al. Proteção à radiação ultravioleta: Recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 732–742, 2011.
- BANKOVA, V. et al. Phytochemical Evidence for the Plant Origin of Brazilian Propolis from São Paulo State. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 54, n. 5–6, p. 401–405, 1999.
- BARBOSA, M. H. et al. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 22, n. 3, p. 318–322, 2009.
- BARILE, F. A. Validating and troubleshooting ocular in vitro toxicology tests. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 61, n. 2, p. 136–145, mar. 2010.
- BEECHER, G. R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence, and intake. **The Journal of nutrition**. v. 133, p. 3248-3254, 2003.
- BONOLI, M, Verardo V, Marconi E, Caboni MF. Fenóis antioxidantes na cevada (*Hordeum vulgare* L.) farinha: estudo espectrofotométrico comparativo entre métodos de extração de compostos fenólicos livres e ligados. **J. Agric. Food Chem**, v. 52, p. 5195-5200, 2004.
- CABRAL, L. D. DA S.; PEREIRA, S. D. O.; PARTATA, A. K. Filtros solares e fotoprotetores – uma revisão. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 25, n. 2, p. 107, 2013.
- CARVALHO TAVARES, L. et al. Estudo químico de uma amostra de Própolis Verde de Passa Quatro, Minas Gerais, Brasil. The phytochemical investigation of a sample of propolis from Passa Quatro-Minas. **Quim. Nova**, v. 33, n. 10, p. 2051–2054, 2015.
- CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, n. SUPPL. 1, p. 1–6, 2002.
- COELHO, J. et al. Composición fenólica y evaluación de la actividad antioxidante de los propóleos del sureste y sur de Brasil. **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 1, p. 21–31, 1 jan. 2017.
- COSTA, A. S. et al. Levantamento dos estudos realizados com a própolis produzida no estado da Bahia. **SITIENITIBUS série Ciências Biológicas**, v. 13, n. Bittencourt 2008, p. 1–7, 2013.

- DEVEQUI-NUNES, D. et al. Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. **PLoS ONE**, v. 13, n. 12, p. 1–20, 2018.
- DO NASCIMENTO, L. F.; DOS SANTOS, E. P.; DE AGUIAR, A. P. Organic sunscreens. Research, innovation and the organic synthesis importance. **Revista Virtual de Quimica**, v. 6, n. 2, p. 190–223, 2014.
- DOS SANTOS, D. C. et al. Chemical prospecting and evaluation of the biological activity of the propolis of Salinópolis, Pará. **Revista Virtual de Quimica**, v. 12, n. 2, p. 492–499, 2020.
- FERREIRA, JOSELENA MENDONÇA; NEGRI, GUISEPPINA. Acta apicola brasilica. **ACTA Apicola Brasilica**, v. 06, p. 6–15, 2018.
- GÓMEZ-CARAVACA, A. M. et al. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 4, p. 1220–1234, 2006.
- GUARATINI, T. et al. Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 717–721, 2009.
- KARINE, E.; VIÉGAS, D. Propriedade antibacteriana da própolis verde sobre bactérias contaminantes da fermentação etanólica Piracicaba. **Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”** 2011.
- LUEPKE, N. P. Teste de membrana corioallantônica de ovo de galinha para potencial de irritação. **Chem. Toxic**, v. 23, p. 287–291, 1985.
- LUSTOSA, S. R. et al. Própolis: Atualizações sobre a química e a farmacologia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 447–454, 2008.
- MACHADO, C. S. et al. Comparative Study of Chemical Composition and Biological Activity of Yellow, Green, Brown, and Red Brazilian Propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 20, 2016.
- MAIER, H. et al. Ultraviolet protective performance of photoprotective lipsticks: change of spectral transmittance because of ultraviolet exposure, 2005.

MANSUR JS, Breder MVR, Mansur MCA, Azulay RD. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiro Dermatol**, 1986; 61:121–124

MARCUCCI, M. Biological and therapeutic properties of chemical propolis constituents. **Web of Science**, 1996.

MENDONÇA, A. Tecnologia Infra'Aging: uma nova abordagem sobre fotoenvelhecimento. Disponível em: <<https://adeliamendonca.com.br/blog/tecnologiainfraaging-uma-nova-abordagem-sobre-o-fotoenvelhecimento/>>

NASCIMENTO, C. S. Incremento do FPS em formulação de protetor solar utilizando extratos de própolis verde e vermelha. **Rev Bras Farm**; v. 90, n. 4, p. 334–339, 2009.

NASCIMENTO, E. A. et al. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-Campo (*Baccharis dracunculifolia*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 379–386, 2008.

OLIVEIRA, F. M. DE. Desenvolvimento de formulações tópicas fotoquimioprotetoras contendo extrato de própolis: estudos de estabilidade, permeação e retenção cutânea in vitro e de eficácia in vivo. **Tese de Doutorado**, p. 205, 2007.

OLIVEIRA, M. S. C.; NAKANO, A. K.; ROCHA-FILHO, P. A. Artigo Determinação do fator de proteção solar (FPS) in vitro e in vivo. v. 17, n. 4, p. 626–630, 2007.

PARK, YONG AND ALENCAR, SEVERINO AND AGUILAR, C. Bathurst Inlet Port and Road Project: Draft Environmental Impact Statement. Volume 5B, Appendix D-4. Surficial Geology, Soils, and Ecosystem Mapping. **Agricultural and Food Chemisry**, p. 2502–2506, 2007.

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

PEREIRA, D. S. et al. Histórico e principais usos da própolis apícola. **Agropecuária Científica no Semi-árido**, v. 11, n. 2, p. 1–21, 2015.

PERUGINI, P. et al. Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. 2002. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/ijpharm>.

REIS MANSUR, M. C. P. P. et al. In vitro and in vivo evaluation of efficacy and safety of photoprotective formulations containing antioxidant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 2, p. 251–258, 1 jan. 2016.

RIBEIRO, R.; SANTOS, V.; MEDEIROS, E. Avaliação do fator de proteção solar (FPS) in vitro de produtos comerciais e em fase de desenvolvimento. **Pharm Bras**, p. 85–88, 2004.

ROBERT M. SAYRE, PATRICIA POH AGIN, G. J. L. AND E. M.; DEPT. a Comparison of In Vivo and In Vitro Testing of Sunscreening Fórmulas. v. 29, p. 559.566, 1979.

ROQUE, J. V.; Otimização da extração da própolis bruta no estudo da atividade anti-inflamatória. **Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto**, 2013.

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

SANTIAGO, PINTO. et al. Estudo da Atividade fotoprotetora de diferentes extratos vegetais e desenvolvimento de formulações de filtro solar. 2013

SCHALKA, S.; ADDOR, F. Protetores solares. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 65, n. SPEC. ISS. OCT., p. 6–11, 2008.

SCHALKA, S.; DOS REIS, V. M. S. Fator de proteção solar: Significado e controvérsia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 507–515, 2011.

SCHEEL, J. et al. Eye irritation potential: Usefulness of the HET-CAM under the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 59, n. 3, p. 471–492, abr. 2011.

TAKSHAK, S.; AGRAWAL, S. B. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 193, p. 51–88, 1 abr. 2019.

TAQUARITINGA, F. DE. Artigo de Revisão O potencial terapêutico da própolis verde Brasileira. The therapeutical role of Brazilian green propolis. v. 02, 2018.

VIOLANTE, I. M. P. et al. Avaliação in vitro da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2a, p. 452–457, 2009.

VOLPI, N.; BERGONZINI, G. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, n. 3, p. 354–361, 26 set. 2006.

YRIS MARIA FONSECA. Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato de própolis verde: estudos de estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea. **Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto**, 2007.