

UNIVERSIDADE TIRADENTES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA *Candida*  
*albicans* DE FORMULAÇÕES SEMI-SÓLIDAS  
CONTENDO PRÓPOLIS VERMELHA**

**FELIPE OLIVEIRA BITTENCOURT**

ARACAJU  
Março - 2008

UNIVERSIDADE TIRADENTES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA *Candida*  
*albicans* DE FORMULAÇÕES SEMI-SÓLIDAS  
CONTENDO PRÓPOLIS VERMELHA**

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

**FELIPE OLIVEIRA BITTENCOURT**

**Orientadores: Prof.<sup>a</sup> Dra. Juliana Cordeiro Cardoso**

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Francine Ferreira Padilha**

ARACAJU  
Março – 2008

O AUTOR PERMITE A REPRODUÇÃO DE CÓPIAS OU PARTES DESTA  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SOMENTE PARA PROPÓSITOS ACADÊMICOS E  
CIENTÍFICOS DESDE QUE A FONTE SEJA CITADA.

Ficha catalográfica: Delvânia Rodrigues dos Santos Macêdo

CRB – 5/1425

B624d Bittencourt, Felipe Oliveira.

Desenvolvimento e avaliação da atividade antimicrobiana contra *Candida albicans* de formulações semi-sólidas contendo própolis vermelha / Felipe Oliveira Bittencourt; orientação [de] Juliana Cordeiro Cardoso, Francine Ferreira Padilha. – Aracaju: UNIT, 2008.

74 p.: il.; 30 cm

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes

1. Própolis vermelha. 2. *Candida albicans*. 3. Formas farmacêuticas semi-sólidas. 4. Atividade antifúngica. I. Cardoso, Juliana Cordeiro (orient.) II. Padilha, Francine Ferreira (orient.) III. Título.

CDU: 614:504

***DEDICO** este trabalho aos meus  
amados filhos Felipe e Alexandre, minha  
esposa Aline e meus pais Dilson e Cátia.*



## AGRADECIMENTOS

A DEUS, que me abençoa, me ilumina e me guia.

A minha querida esposa Aline pelo seu amor, pela sua presença, por sua compreensão e suporte.

Aos meus orgulhos Felipe e Alexandre pelo amor que me alegra e me inspira.

Aos meus pais Dílson e Cátia pela confiança, orações e orientações.

Ao meu grande irmão Rogério.

A Dra Juliana Cordeiro Cardoso minha grande professora e orientadora pelo apoio, atenção, dedicação e ensinamentos.

A Prof.<sup>a</sup> Dra Francine Ferreira Padilha pela orientação e apoio durante a execução deste trabalho.

A todos os professores do Mestrado em Saúde e Ambiente.

A todos os professores, técnicos e estagiários dos laboratórios do Instituto de Tecnologia e Pesquisa.

Aos meus colegas do mestrado em especial Anderson Siqueira e André Barreto.

Aos meus colegas de laboratório Juliana, Tâmara, Vandinha, Mateus, Romeu, Polliana, Ana Carolina, Ana Paula, Malone, Anderson, André e Vitor.

Aos apicultores da região de Brejo Grande/SE que gentilmente cederam as amostras de própolis para realização deste trabalho.

A todos os importantíssimos colaboradores na realização deste trabalho: Dra Sara Cuadros, Dra Julia Dias, Dra Lorena Dantas, Ysla, Luciana, Sheila, Roneval, Luzia, Do Carmo, Emanuelle, Elaine e Flavio Jorge.



*A procura da verdade é difícil e é fácil, já que ninguém poderá desvendá-la por completo ou ignorá-la inteiramente. Contudo, cada um de nós poderá acrescentar um pouco do nosso conhecimento sobre a natureza e, disto, uma certa grandeza emergirá.*

**Aristóteles, 350 aC**





**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA  
CONTRA *Candida albicans* DE FORMULAÇÕES SEMI-SÓLIDAS CONTENDO  
PRÓPOLIS VERMELHA**

Felipe Oliveira Bittencourt

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E  
AMBIENTE DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E  
AMBIENTE

Aprovada por:

---

Juliana Cordeiro Cardoso, D.Sc.  
Orientador

---

Francine Ferreira Padilha, D.Sc.  
Orientador

---

Paulo Sérgio Marcellini, D.Sc.  
Membro externo à Universidade Tiradentes

---

Edilson Divino de Araújo, D.Sc.  
Membro do Programa de Saude e Ambiente

---

Sara Cuadros Orellana, D.Sc  
Suplente

---

Ricardo Luiz C. Albuquerque Júnior, D.Sc  
Suplente

ARACAJU  
Março - 2008



## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESUMO</b>  | <b>17</b> |
| <b>ABSTRACT</b>  | <b>19</b> |
| <b>INTRODUÇÃO</b>  | <b>21</b> |
| <b>CAPITULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>  | <b>25</b> |
| Candidíase vulvovaginal  | 25        |
| Produtos naturais  | 26        |
| Própolis   | 28        |
| Formas farmacêuticas tópicas   | 30        |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>  | <b>34</b> |
| <b>CAPÍTULO II – (ARTIGO) DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE<br/>ANTIMICROBIANA CONTRA <i>Candida albicans</i> DE FORMULAÇÕES SEMI-<br/>SÓLIDAS CONTENDO PRÓPOLIS VERMELHA</b> | <b>45</b> |
| <b>RESUMO</b>  | <b>47</b> |
| <b>ABSTRACT</b>  | <b>47</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>   | <b>48</b> |
| <b>2. EXPERIMENTAL</b>   | <b>49</b> |
| 2.1 Material   | 49        |
| 2.2 Caracterização da própolis vermelha  | 49        |
| 2.3 Obtenção do extrato seco de própolis   | 49        |
| 2.4 Determinação da concentração de flavonóides  | 50        |
| 2.5 Avaliação da atividade antimicrobiana  | 50        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.6 Desenvolvimento da forma farmacêutica  | 51        |
| 2.7 Ensaio microbiológicos das formulações | 51        |
| 2.8 Análise estatística                    | 52        |
| <b>3.RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>           | <b>52</b> |
| 3.1 Caracterização da própolis vermelha    | 52        |
| 3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana  | 53        |
| 3.3 Desenvolvimento da forma farmacêutica  | 55        |
| 3.4 Ensaio microbiológicos das formulações | 59        |
| <b>4.CONCLUSÃO</b>                         | <b>61</b> |
| <b>5.BIBLIOGRAFIA</b>                      | <b>61</b> |
| <b>6.ANEXOS</b>                            | <b>67</b> |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1</b> – Parâmetros físico-químicos da própolis vermelha e do extrato de própolis vermelha.....   | 53 |
| <b>Tabela 2</b> – Diâmetro dos halos de inibição em mm de extrato hidroalcolico de própolis vermelha em <i>Candida albicans</i> .....  | 53 |
| <b>Tabela 3</b> – Diâmetros dos halos de inibição da Nistatina (controle positivo) e das formulações com própolis vermelha em <i>Candida albicans</i> em Hostacerin <sup>®</sup> e Lanette <sup>®</sup> em diferentes pHs..... | 60 |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Viscosidade do creme Lanette<sup>®</sup>, creme Lanette<sup>®</sup> após incorporação do extrato de própolis e creme Lanette<sup>®</sup> contendo própolis e com pH ajustado em 4,3.....58
- Figura 2** – Viscosidade do creme Polawax<sup>®</sup>, creme Polawax<sup>®</sup> após incorporação do extrato de própolis e creme Polawax<sup>®</sup> contendo própolis e com pH ajustado em 4,45.  
.....59
- Figura 3** – Viscosidade do creme-gel Hostacerin<sup>®</sup>, creme-gel Hostacerin<sup>®</sup> após incorporação do extrato de própolis e creme-gel Hostacerin<sup>®</sup> contendo própolis e com pH ajustado em 4,4.....59

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES**

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – American Type Culture Collection

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

OMS - Organização Mundial de Saúde

q.s. - Quantidade suficiente

q.s.p. - Quantidade suficiente para

RPHPTLC - Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência em Fase Reversa

RPHPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa

UI – Unidades Internacionais



# DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA *Candida albicans* DE FORMULAÇÕES SEMI-SÓLIDAS CONTENDO PRÓPOLIS VERMELHA

Felipe Oliveira Bittencourt

A candidíase vulvovaginal é uma infecção comum que ocorre mundialmente e sua incidência tem aumentado nas últimas décadas. Estima-se que aproximadamente 75% das mulheres terão a infecção pelo menos uma vez, e 40-50% delas apresentarão recorrência. A *Candida albicans* é isolada em 85–90% dos casos de candidíase vulvovaginal. As substâncias comumente utilizadas para o tratamento desta patologia são a nistatina e o fluconazol. Recentemente a própolis tem atraído a atenção de pesquisadores devido às suas várias atividades biológicas e propriedades terapêuticas. Tem sido muito utilizada no tratamento de infecções, redução de inflamação e promotor da cicatrização de feridas. Seus componentes podem variar dependendo da vegetação de origem, a qual as abelhas têm acesso. Em geral, a própolis é rica em flavonóides e numerosos estudos têm demonstrado suas propriedades antibacterianas, antivirais e antifúngicas. Este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a atividade antimicrobiana da própolis vermelha sobre *Candida albicans* e desenvolver uma formulação para uso vaginal contendo essa substância. Extratos hidroalcoólicos de própolis foram preparados e os flavonóides presentes determinados usando método colorimétrico. A atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos da própolis foi determinada pelo método de difusão em disco obtendo halo de inibição de aproximadamente 13 mm em 600 µg e a concentração fungicida mínima (CFM) foi de 347,7 µg/mL. As formulações foram desenvolvidas utilizando como excipientes o creme Lanette<sup>®</sup>, creme Polawax<sup>®</sup>, o creme-gel Hostacerin SAF<sup>®</sup>, o gel Aristoflex<sup>®</sup> e o gel Natrosol (hidroxietilcelulose). A formulação com própolis vermelha que apresentou melhor estabilidade, impressão global e atividade antifúngica (halo de 16,33 mm ± 0,58) foi a desenvolvida com o creme Lanette<sup>®</sup>.

Palavras-chave: própolis vermelha, *Candida albicans*, formas farmacêuticas semi-sólidas, atividade antifúngica.



**DEVELOPMENT AND EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY  
AGAINST *Candida albicans* OF SEMI-SOLID FORMULATIONS WITH RED  
PROPOLIS**

Felipe Oliveira Bittencourt

Vulvovaginal candidiasis is a common infection worldwide, and its incidence has increased in the last years. Approximately 75% of all women will have the infection at least once, and 40–50% of them will present recurrences. *Candida albicans* is isolated in 85–90% of all cases of vulvovaginal candidiasis. The substances commonly used in the treatment of this pathology were nistatin and fluconazol. Recently, researchers have given special attention to propolis due to its various biological activities and therapeutic properties. It is a natural product from honeybees used in the construction and maintenance of their hives. It has been used for hundreds of years to treat infections, reduce inflammation, and promote wound healing. Propolis components can change depending on its origin and the plants to which the bees had access. In general it is rich in flavonóides and numerous studies have attested the antibacterial, antiviral, and antifungal properties of propolis. This work was carried out in order to study *in vitro* antimicrobial activity of red propolis on *Candida albicans*, as well as to develop a new vaginal formulation within propolis. Hydroalcoholic propolis extracts were prepared and the flavonoids content was determined by colorimetric method. Antimicrobial activity of propolis extracts was performed by disc diffusion method. The results showed inhibition zone of 13 mm at 600 µg, and the minimal fungicidal concentration (MFC) was 347,7 µg/ mL. The excipients used to develop the formulations were Lanette™, Polawax™, Hostacerin SAF™, Aristoflex™ or Natrosol (hydroxyethylcellulose). The formulations with red propolis developed with Lannete™ presented the best stability, global impression and antifungal activity.

Key-words: red propolis, *Candida albicans*, semi-solid pharmaceutical dosage, antifungal activity.



## INTRODUÇÃO

De acordo com dados históricos, as vulvovaginites são conhecidas desde a época de Hipócrates, e desde então foram consideradas um agravo à saúde das mulheres. Muitos trabalhos têm focado os aspectos microbiológicos desta afecção, mas ainda pouco se conhece sobre outros fatores que podem favorecer ou dificultar a sua instalação (LINHARES *et al.*, 1998; MARTINS, 2007; OLIVEIRA e SOARES, 2007).

Nos Estados Unidos da América mais de dez milhões de consultas anuais são realizadas em função deste problema (HAEFNER, 1999), sendo também o motivo mais freqüente da procura nas clínicas particulares e nos serviços públicos especializados (SOBEL, 1999). Segundo GIRALDO *et al.* (1997), no Brasil em 1996 foi estimado um custo aproximado de 180 milhões de reais ao ano no tratamento das vulvovaginites representando um grande gasto social e econômico para o país. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (RIBEIRO *et al.*, 2001), a *Candida albicans* é a responsável por 80-92% dos episódios de candidíase vulvovaginal.

A *Candida albicans* pode viver em equilíbrio no ambiente vaginal, sendo um habitante comensal, sem que exista qualquer comprometimento à saúde (KOBAYASHI *et al.*, 2001). Todavia, se uma possível alteração local ocorrer, um processo infeccioso pode se instalar. O sintoma da infecção é determinado pela resposta imunológica da paciente, que poderá ser mais do tipo alérgica do que pela própria presença do microrganismo (CHEZ e SOPER, 2002). O controle do crescimento fúngico e bacteriano é realizado pelas células de defesa com a ativação de vários mecanismos como fagocitose, produção de imunoglobulinas, entre outros. Qualquer alteração, por menor que seja nesses meios de controle favorece a proliferação de microrganismos, que podem deixar de ser comensais e passarem a atuar como infectantes (FEITOSA, 2003).

Os principais medicamentos utilizados para o tratamento de candidíase são: fluconazol, anfotericina B, itraconazol, e nistatina. Entretanto, segundo SOUZA *et al.* (1989), SFORCIN *et al.*, (2000), STEPANOVIC *et al.* (2003), VARGAS *et al.* (2004) e FERNANDES JR *et al.* (2006) o uso da própolis verde como medicamento contra a candidíase pode ser uma alternativa aos demais tratamentos.

Não obstante já existam relatos conferindo à própolis as mais variadas aplicações em medicina popular e em veterinária (GACS *et al.*, 1993; HEINZE *et al.*, 1998), os estudos científicos vêm indicando que a própolis possui um grande potencial terapêutico,

principalmente, em relação às atividades antineoplásica, antimicrobiana, antioxidante e antiinflamatória (GHISALBERTI, 1979; ARVOUET-GRAND *et al.*, 1993; AHMED *et al.*, 1996; SOSA *et al.*, 1997; PARK *et al.*, 1998; MARCUCCI *et al.*, 2001; MONTPIED *et al.*, 2003).

A composição da própolis é determinada especialmente pelas características fitogeográficas presentes ao redor da colméia (KUMAZAWA *et al.*, 2004), podendo também variar sazonalmente em uma mesma localidade (SFORCIN *et al.*, 2000) e ser dependente das diferentes raças de *Apis mellifera* (SILICI e KUTLUCA, 2005). Em decorrência desta composição química diferenciada, a própolis apresenta variação em suas atividades farmacológicas.

Uma variedade de própolis brasileira conhecida como própolis vermelha vem sendo estudada em Alagoas e está despertando a atenção do mercado internacional (SILVA *et al.*, 2007). A própolis vermelha ainda foi pouco explorada cientificamente, porém já se sabe que pode ser encontrada em alguns estados brasileiros como Sergipe, Paraíba, Pernambuco e Bahia (DAUGSCH *et al.*, 2007). Em Sergipe, desde março de 2006 esta variedade vem sendo estudada, reunindo informações sobre suas propriedades, e desta forma fortalecendo a geração de emprego qualificado na região, a agregação de valor econômico à própolis bruta, para gerar uma fonte econômica de exploração apícola e o extrativismo auto-sustentável. A atividade apícola, além de gerar empregos, conscientiza a comunidade envolvida a respeitar e manter o meio ambiente, de maneira que a flora nativa (pasto apícola) próxima aos apiários permaneça preservada.

Neste contexto, o presente trabalho objetivou testar a atividade antimicrobiana da própolis vermelha contra *Candida albicans* e desenvolver uma formulação semi-sólida de uso vaginal contendo própolis vermelha.

Para o desenvolvimento de uma apresentação semi-sólida para a própolis fez-se necessário conhecer as suas características físico-químicas e sua compatibilidade com as opções de bases disponíveis no mercado. Em um desenvolvimento de fórmula é de extrema importância estudar e avaliar os custos, efetividade, produção e estabilidade da formulação final. A escolha da formulação ideal para a administração da própolis e o seu desenvolvimento levou em consideração além dos aspectos acima descritos, as características específicas da própolis como efetividade na base selecionada, solubilidade e incorporação, além da influência do pH e a viscosidade da formulação.

Dessa forma, o presente trabalho foi dividido em dois capítulos, onde o primeiro apresenta uma revisão de literatura relativa ao tema e o segundo apresenta os resultados na forma de um artigo.

## **CAPITULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**





## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### Candidíase vulvovaginal

Diversos trabalhos sobre a microbiota vaginal têm sido publicados discorrendo sobre os microrganismos aeróbios e anaeróbios e suas patogenias (GALLIS, 1980; ROSA e RUMEL, 2004; TANAKA, 2007). O *Trichomonas vaginalis*, a *Candida albicans*, a *Neisseria gonorrhoeae*, a *Gardnerella vaginalis* e a *Chlamydia trachomatis* são os patógenos mais freqüentemente relacionados às cervicites e vaginites (GARLAND, 2001; MARTINS, 2007; OLIVEIRA e SOARES, 2007). Os processos causados por *Gardnerella vaginalis* são também conhecidos como vaginose e os causados por *T. vaginalis* e *Candida sp*, como vaginites (OPLUSTIL *et al.*, 1999).

A candidíase vulvovaginal é caracterizada por uma inflamação da vagina provocada pela infecção por *Candida sp*. A *Candida ssp* é o microrganismo responsável por mais de 80% dos casos de candidíase hospitalares (COLOMBO e GUIMARÃES, 2003). As pacientes com candidíase podem ou não apresentar sintomas, tais como, corrimento espesso e esbranquiçado, prurido, avermelhamento da parte exterior da vagina e irritação ao urinar. Quando esses sintomas não são observados, o diagnóstico pode ser estabelecido através de cultura positiva de secreção vaginal (SOBEL *et al.*, 1998). Alguns microbiologistas afirmam que a *Candida sp* pode ser encontrada na vagina, sem causar sintomas, fazendo parte da sua microbiota normal (HURLEY, 1981; OLIVEIRA e SOARES, 2007).

Segundo NETO, HAMDAN e SOUZA (1999) e RIBEIRO *et al.* (2001), poucos dados epidemiológicos são relatados no Brasil. Estudos transversais realizados por estes pesquisadores em 1996, 1998 e 1999 em Minas Gerais e no Espírito Santo, demonstraram a prevalência de 25% de candidíase vulvovaginal entre as pacientes assintomáticas e de 60% entre as que apresentavam sintomas desta patologia. COLOMBO (2003) realizou um estudo em seis hospitais do Rio de Janeiro e São Paulo, envolvendo 145 episódios de candidíase, e concluiu que a *Candida albicans* era a espécie mais freqüentemente isolada, aparecendo em 37% dos casos estudados. Dentre as mais de 180 espécies de *Candida sp* catalogadas, a *Candida albicans* é responsável por 90% das infecções em pacientes com candidíase recorrente e é a espécie isolada na grande maioria dos casos de candidíase mucocutânea (CARVALHO *et al.*, 2003). Dentre os fatores que predispõem a ocorrência da candidíase humana esporádica são o uso de antibióticos e contraceptivos, gravidez e *Diabetes mellitus*.

Em relação à terapêutica utilizada no tratamento desta patologia, vários fármacos têm sido utilizados. Segundo RIBEIRO (1998), em estudo realizado com 120 amostras de secreção vaginal de mulheres com suspeita clínica de candidíase na cidade de Goiânia – GO, todas as espécies de *Candida* apresentaram-se sensíveis à anfotericina B e nistatina e especificamente a *Candida albicans* mostrou-se sensível ao cetoconazol (35,0%), fluconazol (22,8%) e itraconazol (47,4%).

No estudo realizado por BERGENDAL e ISACSSON (1980) foi constatado que a utilização tópica da nistatina para o tratamento da candidíase demonstrou-se eficiente, pois foi observado a eliminação de leveduras e a redução dos sinais clínicos. Porém, 40 dias após a suspensão do tratamento, a colonização por leveduras, e o aspecto edemaciado, atingiu índices semelhantes aos encontrados anteriormente ao tratamento.

Nas últimas décadas tem sido observado um crescente uso de produtos naturais na prevenção de doenças (PEREIRA, SEIXAS e NETO, 2002). Diversos relatos na literatura têm demonstrado que estes produtos apresentam atividade antimicrobiana sobre os patógenos vaginais, entre eles a *Candida albicans* (CASTILHO, MURATA e PARDI, 2006; LONGHINI *et al.*, 2007; PACKER e LUZ, 2007). A descoberta de novos produtos naturais e de seus compostos com atividade antimicrobiana é de grande importância. Dentre os produtos naturais recentemente estudados, a própolis se destaca devido às suas propriedades farmacológicas, tais como potencial antibacteriano, antifúngico, antioxidante, antiinflamatório, cicatrizante, anestésico e antitumoral (AHMED *et al.*, 1996; PARK *et al.*, 1998; KOO *et al.*, 2000; MARCUCCI *et al.*, 2001).

## **Produtos naturais**

Em muitas comunidades e grupos étnicos o conhecimento sobre plantas medicinais representa, muitas vezes, o único recurso terapêutico básico para manutenção da saúde. Desde os primórdios das civilizações as plantas são utilizadas no tratamento e cura de diversas enfermidades. As observações populares sobre o uso e a eficácia das plantas contribuem para a divulgação das suas potencialidades terapêuticas, e embasam o desenvolvimento de pesquisas científicas em áreas multidisciplinares (MACIEL *et al.* 2002).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), no início da década de 1990, divulgou que 65- 80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde. Apesar da evolução da medicina a partir da segunda metade do século XX, ainda existem inúmeros obstáculos básicos na promoção da saúde em algumas populações carentes, que vão desde o acesso

aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos. Estes motivos, associados com o grande conhecimento popular e a fácil obtenção e uso das plantas medicinais, contribuem para a utilização das mesmas pelas populações dos países em desenvolvimento (VEIGA JR *et al.*, 2005).

Atualmente, grande parte da comercialização de plantas medicinais é feita em lojas de produtos naturais e farmácias, onde preparações vegetais são comercializadas com rotulação industrializada. Em geral, essas preparações são produzidas a partir de plantas cultivadas, o que descaracteriza a medicina tradicional que utiliza, quase sempre, plantas da flora nativa. Além disso, a maioria não possui nenhum certificado de qualidade, o que tem gerado discussões para desenvolvimento de procedimentos para avaliação destes produtos (VEIGA JR *et al.*, 2005).

Segundo CASTILHO, MURATA e PARDI (2006), cerca de 30% dos medicamentos utilizados são originários de plantas, isolados diretamente ou produzidos por síntese a partir de um precursor vegetal. Os produtos naturais continuam sendo umas das maiores fontes para a descoberta de novos medicamentos com atividade antimicrobiana, cicatrizante, antiinflamatória, antineoplásica, entre outras.

O Sistema Público de Saúde (SUS) brasileiro não possui políticas de assistência farmacêutica capazes de suprir as necessidades medicamentosas de parte da população, o que gera grandes dificuldades na obtenção dos medicamentos essenciais. Com a descentralização do poder público, atualmente no Brasil, os municípios atingem a gestão plena, com autonomia para implantar programas de assistência à saúde, quando necessários. Desta forma, alguns estados e municípios brasileiros vêm realizando nas duas últimas décadas a implantação de um Programa de Fitoterapia na Atenção Primária à Saúde, com o intuito de suprir as carências medicamentosas de suas comunidades (SILVA *et al.* 2006).

Nos países em desenvolvimento, bem como nos mais desenvolvidos, os apelos da mídia, o valor dos medicamentos tradicionais e seus inúmeros efeitos adversos contribuem, a cada dia, para o aumento do consumo de produtos à base de fontes naturais. Desta forma, o conhecimento mais aprofundado das atividades biológicas destes produtos faz-se necessário para que a terapêutica seja segura. A própolis, além de muito utilizada popularmente, tem suas funções discutidas em uma vasta literatura com comprovação científica dos seus efeitos biológicos (VEIGA JR *et al.*, 2005).

## Própolis

A própolis é uma substância resinosa, gomosa e balsâmica, coletada pelas abelhas *Apis mellifera*, de diversas partes da planta como broto, botões florais e exsudados resinosos, às quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para a elaboração do produto final. Seu emprego na vida da colônia está relacionado com suas propriedades mecânicas, sendo utilizada na construção e adaptação da colméia, e antimicrobianas, garantindo um ambiente asséptico (FUNARI e FERRO, 2006; PARK, IKEGAKI e ALENCAR, 2000). Ela é um produto muito conhecido e empregado pela medicina popular devido suas propriedades biológicas antibacteriana, antifúngicas e reparadoras (LIMA *et al.*, 2006).

Têm sido usados extratos etanólicos, hidroalcoólicos e aquosos da própolis em diferentes situações como agentes antimicrobianos (MARCUCCI *et al.*, 2001; PARK *et al.* 1998; AHMED *et al.*, 1996), como antiinflamatórios (MONTPIED *et al.*, 2003; SOSA *et al.*, 1997), como cicatrizante (GHISALBERTI, 1979), em ferimentos orais e da pele (ARVOUET-GRAND *et al.*, 1993; PARK *et al.*, 1998). Além disso, também vem sendo utilizada pelas indústrias farmacêuticas e alimentícias na forma de alimentos funcionais (ACKERMANN, 1991).

Pelo menos 200 componentes diferentes já foram identificados em amostras de própolis de origem diversas. Dentre esses, ácidos graxos, ésteres fenólicos, flavonóides (flavonas, flavanonas, flavonóis, di-hidroflavonóis, etc.), terpenos, aldeídos e álcoois aromáticos, sesquiterpenos e naftaleno. Para estas classes de substâncias, destacam-se a dos flavonóides e a dos ácidos fenólicos, pois tem sido descrito como responsáveis por parte das atividades biológicas constatadas para a própolis (GREENAWAY *et al.*, 1991; AGA *et al.*, 1994; BANKOVA *et al.*, 1995; MARCUCCI *et al.*, 1996, MARCUCCI *et al.*, 2001; FUNARI e FERRO, 2006).

Segundo KOSALEC *et al.* (2005), OLIVEIRA *et al.* (2006) e PARKER e LUZ (2007) a concentração de flavonóides nas amostras é o que confere à própolis sua atividade antimicrobiana. Em seus estudos eles constataram resultados positivos na utilização da própolis em testes nas seguintes bactérias gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Enterococcus faecalis*; na levedura: *Candida albicans*; e nas bactérias Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa*. Foi observado também que as bactérias Gram-positivas apresentaram maior sensibilidade que as Gram-negativas aos extratos de própolis nas variedades estudadas. FERNANDES JR *et al.* (2006) verificou que amostras de própolis verde coletados em três cidades brasileiras Botucatu (SP), Mossoró

(RN) e Urubici (SC) tiveram halos de inibição completamente diferentes quando testados nos mesmos microrganismos citados acima, demonstrando que a biodiversidade local altera os componentes bioativos presentes em cada amostra.

A composição, o cheiro, a cor e os componentes químicos da própolis variam de acordo com a espécie vegetal utilizada pelas abelhas e do local onde ela foi coletada (KOSALEC *et al.*, 2005). A quantidade de componentes contido nas amostras de diferentes própolis depende também destas particularidades.

A própolis vermelha tem sido encontrada em Cuba e na Venezuela, onde foram identificados os seus antecessores botânicos como sendo respectivamente a *Clusia nemorosa* e a *Clusia scrobiculata*. Desde a década de 90 já existem trabalhos descrevendo o potencial biológico destas variedades como antimicrobianos, cicatrizantes e antioxidantes (TRUSHEVA *et al.*, 2006).

Existem poucos trabalhos publicados sobre própolis vermelha brasileira. Após revisão bibliográfica foram encontrados apenas oito artigos publicados sobre esta variedade de apíderivado, sendo todos relativamente recentes (SAWAY *et al.*, 2004; TRUSHEVA *et al.*, 2006; ALENCAR *et al.*, 2007; AYRES, MARCUCCI e GIORGIO, 2007; DAUGSCH *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2007; SALOMÃO *et al.*, 2007; OLDONI, 2007). Tais trabalhos trazem informações que demonstraram o potencial biológico desta variedade de própolis, além da descrição dos constituintes bioativos (TRUSHEVA *et al.*, 2006; OLDONI, 2007), composição química e origem botânica (SAWAY *et al.*, 2004; DAUGSCH *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2007; ALENCAR *et al.*, 2007).

Em relação à atividade biológica da própolis vermelha brasileira, a literatura apresenta resultados positivos dos extratos contra *Leishmania amazonenses* (AYRES, MARCUCCI e GIORGIO, 2007), *Staphylococcus aureus* (TRUSHEVA *et al.*, 2006; DAUGSCH *et al.*, 2007; ALENCAR *et al.*, 2007; SALOMÃO *et al.*, 2007), *Staphylococcus mutans* (ALENCAR *et al.*, 2007), *Escherichia coli* (TRUSHEVA *et al.*, 2006), *Candida albicans* (TRUSHEVA *et al.*, 2006; SALOMÃO *et al.*, 2007), *Trypanosoma cruzi*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Sporothrix schenckii* e *Paracoccidioides brasiliensis* (SALOMÃO *et al.*, 2007).

ALENCAR *et al.* (2007) estudaram a composição química da própolis vermelha proveniente do sul do estado de Alagoas e relataram que a mesma possui 20 componentes químicos diferentes daqueles comumente encontrados nos 12 tipos de própolis catalogados

por PARK *et al.* (2000). Além disso, eles concluíram que essa variedade de própolis possui quatro tipos de isoflavonas nunca antes encontrados em apíderivados, comprovando ser uma nova variedade com potencial biológico diferente das própolis já estudadas.

DAUGSCH *et al.* (2007) concluiu em seu trabalho que a origem botânica principal da própolis vermelha é a *Dalbergia ecastopyllum*. Após coletar amostras de própolis vermelha de cinco estados do nordeste brasileiro (Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco e Paraíba) ele as comparou através de testes em Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência em Fase Reversa (RPHPTLC) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (RPHPLC) com resinas da *D. ecastopyllum* constatando perfis muito similares. Ainda neste trabalho foram testados extratos hidroalcoólicos da própolis coletadas nos seis estados, através do método do disco, em *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 obtendo resultados positivos na inibição desse microrganismo.

### **Formas farmacêuticas tópicas**

Para o tratamento da candidíase vulvovaginal existem dois tipos de administração de fármacos: formulações de uso oral e uso vaginal. Na terapêutica oral, os medicamentos mais utilizados são o fluconazol, cetoconazol e itraconazol na forma de cápsula e comprimido revestido (RIBEIRO, 2002). Para o uso vaginal os medicamentos mais utilizados são a nistatina e a anfotericina B em creme e óvulo vaginal.

No desenvolvimento de uma forma farmacêutica eficiente alguns parâmetros devem ser levados em conta. A escolha dos excipientes deve ser realizada através de estudos de compatibilidade do ativo com os mesmos, da biodisponibilidade do fármaco na formulação final e de sua estabilidade (KOROLKOVAS, 2002).

Para o tratamento de afecções vaginais existem três opções de formas farmacêuticas semi-sólidas: cremes, creme-gel e gel. Este tipo de formulação deve ser de fácil aplicação, possuir viscosidade (adesividade) compatível que permita a permanência da forma na mucosa vaginal e como as outras formas semi-sólidas ser compatível com o ativo e ter estabilidade adequada (KOROLKOVAS, 2002).

Os cremes são emulsões heterogêneas, termodinamicamente instáveis, formados pela associação de substâncias lipofílicas (fase oleosa) com hidrofílicas (fase aquosa) através de agentes emulsificantes (tensoativos). Uma das fases se apresenta descontínua e dispersa em gotículas envolvidas pelos agentes tensoativos emulsificantes, responsáveis pela estabilidade física e pela manutenção da dispersão na segunda fase (fase contínua). São classificadas de acordo com sua fase externa, sendo chamadas de emulsões óleo em

água (O/A) ou água em óleo (A/O) (GENNARO, 2004). As emulsões tipo O/A são as mais utilizadas devido ao seu aspecto menos oleoso, mais agradável tanto para aplicação tópica (loções, leites e cremes) quanto para a administração por via oral (emulsões farmacêuticas) (GENNARO, 2004; RIBEIRO, 2002). As bases na forma creme mais utilizadas na farmácia magistral são o creme Polawax<sup>®</sup> e creme Lanette<sup>®</sup>, devido ao custo baixo e facilidade de incorporação para a maioria das substâncias ativas.

Lanette<sup>®</sup> (álcool cetoestearílico e cetil estearil sulfato de sódio) é uma cera auto-emulsionante de natureza aniônica, muito usada e relativamente antiga. O Polawax<sup>®</sup> (álcool cetoestearílico e monoestearato de sorbitano polioxietileno) é uma cera auto-emulsionante de natureza não-iônica e de alta densidade. Constitui um sistema completo de emulsão, entretanto, de acordo com a solubilidade do ativo, pode ser adicionada a sua formulação óleos, ceras e outras gorduras (ZANIN *et al.*, 2001).

Segundo SAMPAIO (1999), as bases não-iônicas auto-emulsionantes vieram substituir as bases aniônicas cada vez mais, pois as últimas não são totalmente estáveis em pHs inferiores a 2,5, são incompatíveis com tensoativos catiônicos e sais de metais polivalentes, como alumínio, chumbo, estanho e zinco e também porque podem causar problemas dermatológicos.

Os géis são sistemas semi-sólidos, que consistem em suspensões formadas por pequenas partículas inorgânicas ou por grandes moléculas orgânicas penetradas por um líquido. Os géis de fase única são macromoléculas orgânicas, as quais podem ser de origem sintética (Aristoflex<sup>®</sup>) ou natural (tragacanto), distribuídas uniformemente através de um líquido. Geralmente se apresentam em uma fase aquosa, podendo ser utilizado também alcoóis e óleos como fase dispersora. Os géis são utilizados topicamente e em cavidades corporais e são consideradas formas farmacêuticas de escolha devido à sua consistência, facilidade de aplicação, remoção e uso. Em géis, geralmente observa-se uma liberação mais rápida do fármaco independentemente da sua solubilidade em água, quando comparado a cremes e pomadas (USP 24, 1999). Em farmácias magistrais geralmente são utilizados géis de Carbopol 934<sup>®</sup>, natrosol e Aristoflex<sup>®</sup>. O gel de carbopol, apesar de apresentar a aparência de maior apelo mercadológico é pouco estável às alterações de pH, restringindo-se a formulações neutras.

O Aristoflex<sup>®</sup> é um polímero sintético de ácido sulfônico acrilóildimetiltaurato e vinilpirrolidona pré-neutralizado que permite formar um gel de excelente consistência em sistemas aquosos. Também é utilizado como agente espessante em emulsões óleo/água. Seu pH varia entre 4 a 6 e sua viscosidade entre 48.000 a 80.000 mPa.s (solução 1% em

água). O gel de Aristoflex<sup>®</sup> forma uma rede quimicamente estável e apresenta maior viscosidade e valor de cisalhamento do que outros géis (ZANINI, 2007; LOFFLER e MILLER, 2002).

O natrosol (hidroxietilcelulose) é um gel não iônico usualmente selecionado pelas suas propriedades de elevar a viscosidade, suportar incorporação em ampla faixa de pH, apresentar estabilidade e geralmente ser compatível com diversas vias de administração (LUBI, SATO e GAENSLY, 2003). Segundo SATO *et al.* (2007) o gel natrosol é constantemente usado como agente de consistência em emulsões com a finalidade de melhorar a estabilidade e a aplicabilidade.

Outra forma alternativa de formulação é o creme-gel. O creme-gel pode ser obtido a partir de Hostacerin SAF<sup>®</sup>, sendo este uma base auto-emulsionante, de caráter aniônico, desenvolvida para possibilitar o preparo de emulsões em temperatura ambiente. Ele é composto por associações de promotores de viscosidade, emulsionantes e emolientes, se diferenciando de outras bases auto-emulsionantes não apenas pela facilidade do preparo instantâneo em temperatura ambiente, mas principalmente porque dão origem a emulsões com aspecto e textura agradável e grande estabilidade à incorporação dos principais ativos dermatológicos (KOROLKOVAS, 2004). O creme-gel é uma emulsão que contém polímeros formadores de gel, os quais podem interferir na viscosidade do produto. A viscosidade de uma emulsão é aumentada em função da concentração de sólidos e da ação de aditivos (PALMA e GIUDICI, 2006). O informe técnico do fornecedor relata que o polímero formador de gel do Hostacerin SAF<sup>®</sup> é o gel Aristoflex<sup>®</sup>.

Para o desenvolvimento racional de formas farmacêuticas estáveis e seguras torna-se importante a avaliação de uma série de parâmetros, tais como, o exame macroscópico da formulação após incorporação do ativo, pH, viscosidade e estabilidade física e térmica.

Os ensaios macroscópicos são realizados para avaliação das características do produto testado, tais como, aspecto, cor, odor, sabor e tato. Tais parâmetros avaliam alterações como separação de fases, precipitação e turvação. Geralmente é utilizada uma amostra de referência (ou padrão) para comparar com o produto desenvolvido (BRASIL, 2007).

Dentre os parâmetros macroscópicos importantes, destaca-se a cor da formulação. A alteração de cor pode indicar reações de degradação, tipo oxidação, ou também incompatibilidade entre as substâncias presentes na formulação (GENNARO, 2004). Outro parâmetro importante para a avaliação da estabilidade do produto é o pH da formulação.



Reações de degradação podem alterar o pH, sendo este indicador de qualidade do produto. O pH também pode alterar a biodisponibilidade do produto. A depender do pH da formulação, o fármaco poderá estar na forma ionizada, o que dificulta a absorção pelo endotélio. No caso de tratamento contra microrganismos vaginais, tais como a *Gardnerella vaginalis*, o pH pode ser crucial para o êxito da terapêutica. Este microrganismo se desenvolve em pH acima de 4,5 e dificulta o desenvolvimento de *Lactobacillus sp*, o qual está presente na microbiota vaginal saudável. Desta forma, o ajuste do pH da formulação pode facilitar o restabelecimento do equilíbrio microbiano local, agindo sinergicamente com o fármaco antimicrobiano (CATLIN, 1992).

A viscosidade do produto pode influenciar na aplicação e uso do mesmo. A viscosidade é a resistência que o produto oferece à deformação ou ao fluxo, e depende das características físico-químicas e das condições de temperatura do material (CORREA *et al.*, 2005; CHORILLI *et al.*, 2007). A reologia estuda a fluidez e a deformação das substâncias sob cisalhamento. Quando se estuda os fluidos em um viscosímetro rotacional e se elabora um sistema de coordenadas da velocidade de fluxo em função da força de fluxo, obtêm-se reogramas de características próprias, tornando-se possível verificar se o comportamento é newtoniano ou não newtoniano e caracterizar a plasticidade, pseudoplasticidade, a dilatância, bem como a presença ou não de tixotropia (PADER, 1993; AULTON, 2005).

A viscosidade depende da temperatura, sendo importante controlar a mesma durante as determinações experimentais (LEWIS, 1993). No caso de produto para uso vaginal é importante avaliar a viscosidade à temperatura ambiente, para obter valores sobre seu escoamento durante a aplicação do produto e armazenamento do mesmo e também à 37°C, temperatura corporal, para obter informações sobre o comportamento reológico do produto *in loco*.

O gel e o creme-gel normalmente apresentam comportamento pseudoplástico e a principal característica é a de redução da viscosidade quando submetido a uma elevada tensão de cisalhamento, retornando a viscosidade inicial ao cessar-se o cisalhamento. Além disso, o comportamento tixotrópico também pode estar presente, devido ao aglomerado de partículas que formam uma estrutura similar ao de uma rede, e que sob tensão sofre desestruturação temporária na trama, com perda de viscosidade (PADER, 1993; AULTON, 2005).

Para a determinação do grau de tixotropia, o material em estudo é submetido a um gradiente de cisalhamento crescente, ocorrendo uma desorganização maior ou menor da estrutura, até que se obtenha o que se chama de ponto superior da curva, sendo submetido

logo após a gradientes de cisalhamento decrescentes. São, assim, obtidas duas curvas, uma ascendente e outra descendente indicando, respectivamente, desorganização e reorganização estrutural do sistema. O traçado dessas duas curvas delimita uma área chamada de histerese que traduz o tempo que o sistema leva para refazer a viscosidade inicial, indicando o seu grau de tixotropia. Geralmente os cremes são formas que apresentam grau de tixotropia. Quando, nos reogramas, as curvas ascendente e descendente se sobrepõem, não há tixotropia, indicando reorganização estrutural imediata, característico de gel e creme-gel (AULTON, 2005).

A estabilidade física do produto pode ser verificada pela exposição do mesmo ao estresse mecânico. A centrifugação do produto é utilizada para observar a separação (quebra) de fases e conseqüentemente sua estabilidade física. Este ensaio também pode ser efetuado utilizando temperaturas mais altas, avaliando a estabilidade térmica do produto em relação à separação de fases. A força da gravidade atua sobre os produtos, fazendo com que suas partículas se movam no seu interior. A centrifugação produz estresse na amostra, simulando um aumento na força de gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis instabilidades. Estas poderão ser observadas na forma de precipitação, separação de fases, formação de sedimento compacto e coalescência, entre outras (PROENÇA *et al.*, 2006).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMANN, T. **Fast chromatography study of propolis crudes**. Food Chemistry, Oxon, v.42, n.2, p.135-138, 1991.
- AGA, H.; TAKASHI, S.; TOSHIYUKI, S.; MASASHI, K.; SHUHEI, N. **Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis**. Biosci Biotechnol Biochem, Tokio, v.58, n.5, p.945-946, 1994.
- AHMED, F.H.; SALEM, H.M.; ADBEL RAHIM, E.A.; BADAWI, A.M. **Antimicrobial activity of bee glue (propolis) extracts**. Egypt J Microbiol, Cairo, v.31, n.3, p.423-435, 1996.
- ALENCAR, S.M.; OLDONI, T.L.C.; CASTRO, M.L.; CABRAL, I.S.R.; COSTA-NETO, C.M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKID, M. **Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis**. Journal of Ethnopharmacology, eCAM Advance Access published online on July 7, 2007.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists**, 16 th Edition, cap. 4.1.03, 1997.

ARVOUET-GRAND, A. **Extrait de propolis: Etude de cicatrisation de plaies chez le lapin et chez le rat.** J Pharm Belg; 48(3):171-8, 1993.

ASPIS, D. **Suscetibilidade in vitro a antibióticos de cepas de *Staphylococcus spp* e *Micrococcus spp* isoladas a partir de mucosa oral de macacos-pregos (*Cebus apella*) mantidos em cativeiro.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. v. 40 (2), 2003.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas.** 2. Ed – Porto Alegre, Artmed, 2005.

BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M.C.; POPOV, S. **Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis.** Z Naturforsch C, v.50, n.3-4, p.167–172, 1995.

BERGENDAL, T.; ISACSSON, G. **Effect of nystatin in the treatment of denture stomatitis.** Scand J Dent Res; 88 (5): 446-54, 1980.

BRITO, K.P.P.; LEIOTE, J.O.; SOARES, V.T.B.; ARAUJO, E.D.; CARDOSO, J.C.; MAECCELLINI, P.S. **Caracterização físico-química da própolis vermelha e influências nos cuidados de coleta.** In: XVI Congresso Brasileiro de Apicultura e II Congresso Brasileiro de Meliponicultura, 2006, Aracaju. Anais do XVI Congresso Brasileiro de Apicultura e II Congresso Brasileiro de Meliponicultura. Aracaju : Imagem. v. único. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos/ Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** – ANVISA, 130 p. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa.** Publicado no Diário Oficial da União de 23/01/2001; Seção 1; p.18.

CARROLL, C.J.; HURLEY, R.; STANLEY, V.C.; **Criteria for diagnosis of candida vulvovaginitis in pregnant women.** J Obstet Gynaecol Br Common; 80:258-63; 1973.

CARVALHO, R.J.V.; CUNHA, C.M.; SILVA, D.A.O.; SOPELETE, M.C.; URZEDO, J.E.; MOREIRA, T.A.; MORAES, P.S.A.; TAKETOMI, E.A. **IgA, IgE e subclasses de IgG anti-*Candida albicans* no soro e lavado vaginal de pacientes com candidíase vulvovaginal.** Rev. Assoc. Med. Bras. v.49; nº.4; 2003.

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

CASTILHO A.R., MURATA R.M.; PARDI, V. **Produtos naturais em odontologia.** *Revista Saúde*: 11-19, 2006.

CASTRO, M.L.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. **Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica.** *Química Nova*. v.30; nº7; 2007.

CATLIN, B.W. ***Gardnerella vaginalis*: Characteristics, Clinical Considerations, and Controversies.** *American Society for Microbiology. Clinical Microbiology Reviews*, p. 213-237; 1992.

CHEZ, R.A.; SOPER, D.E. – **Tratamento da Vaginite considerando as bases.** *Ginecol Obstet*, 11:17-8, 2002.

CHORILLI, M.; ZAGUE, V.; SCARPA, M.V.; LEONARDI, G.R. **Influência da viscosidade do veículo na liberação *in vitro* da cafeína.** *Revista Eletrônica de Farmácia* v. 4; 1º ed; p. 52-60, 2007.

COLOMBO, A.L. **Contribuições para o entendimento da epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp.* e para sua abordagem terapêutica.** Tese para obtenção do título de livre-docência apresentada a Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, 2003.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. **Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp.*** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36; 5º ed; p.599-607; 2003.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. **Candidúria: uma abordagem clínica e terapêutica.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v.40; nº3; 2007.

CORREA, N.M.; JUNIOR, F.B.C.; IGNÁCIO, R.F.; LEONARDI, G.R. **Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos.** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41; nº1; 2005.

DAUGSCH, A.; MORAES, C.S.; FORT, P.; PARK, Y.K. **Brazilian Red Propolis - Chemical Composition and Botanical Origin.** *eCAM Advance Access published*, July 7, p.1, 2007.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Stras-Strasbourg: Council of Europe. 4th ed., 2002.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Atheneu Editora. 4ª ed., v. 2, n. 4, 2002.

FEITOZA, S.B.N. **Avaliação das células de defesa do conteúdo vaginal de mulheres com e sem vulvovaginites.** Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. Campinas, SP; 2003.

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

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

GACS, M.; HUSZENICZA, G.; KEG, T.; VIGH, Z.; STOLLAR, Z.; OLAH, O.; JONSSON. J.; O PPEL, K. **Experiences on the effectiveness of an intramammary infusion without containing antibiotics.** Magyar Allatorvosok, v.48; nº 8; p.473-478; 1993.

GALLIS, H.A. **Microbial ecology and normal flora of the human body.** Zynnsser microbiology.. New York, Appleton-Century Crofts, 17th ed; p. 405-11; 1980.

GARLAND, S.M.; TABRIZI, S.N.; BYAMBAA, S.C.C.; DAVAAJAV, K. **Prevalence of sexually transmitted infections (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* and human papillomavirus) in female attendees of a sexually transmitted diseases clinic in Ulaanbaatar, Mongolia.** Infect. Dis. Obstet. Gynecol., 9º ed; p.143–146; 2001.

GENNARO, A.R. **Remington: A ciência e a prática da farmácia.** Editora Guanabara Koogan S.A., 20º ed; p. 1022-1031; 2004

GIRALDO, P.C.; RIBEIRO FILHO, A.D.; SIMÕES, J.A.; GOMES, F.A.M.; JARBAS, M. **Vulvovaginites: aspectos habitualmente não considerados.** J Bras. Ginecol., 107º ed; p.89-93; 1997.

GHISALBERTI, E. L. **Própolis: a review.** Bee World, Cardiff, v.60, nº2, p.59-84, 1979.

GREENAWAY, W. et al. **Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis.** Z Naturforsch C, Tübingen, v.46, nº1-2, p.111– 121, 1991.

GREENWOOD J. R.; PICKETT M. J. **Salient features of *Haemophilus vaginalis*.** J. Clin. Microbiol. 9:200-204.5. 1979.

HAEFNER, H.K. **Current evaluation and management of vulvovaginitis**. Clin. Obstet Gynaecol, 42<sup>o</sup> ed; p.184-95, 1999.

HEINZE, W.; HOLZ, J.; NATTERMANN, H.; BLANKENSTEIN, P. **Effects of ethanol extracts of propolis against common bacteria, fungi and viruses of veterinary importance**. Tierärztliche Umschau, v.53, n<sup>o</sup> 6, p.321-326, 1998.

HURLEY, R.; **Recurrent Candida infection**. Clin Obstet Gynaecol; 8<sup>o</sup> ed; p. 209-214; 1981.

KOBAYASHI, G.; MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K. **Medical Microbiology**. MOSBY INC, 4<sup>o</sup> ed; p. 632; 2001.

KOO, H.; GOMES, B.P.; ROSALEN, P.L.; AMBROSANO, G.M.; PARK, Y.K.; CURY, J.A.; **In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica montana against oral pathogens**. Arch Oral Biol., 45<sup>o</sup> ed; v.2; p.141-148; 2000.

KOROLKOVAS, A. - **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Ed. 2001/2002, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S.; BAKMAZ, M.; KNEZEVIC, S.V. **Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products**. Acta Pharma, 55<sup>o</sup> ed; p. 423–430; 2005.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. **Antioxidant activity of propolis of various geographic origins**. Food Chemistry, v.84; n<sup>o</sup> 3; p.329-339; 2004.

LEWIS, M. J. **Propriedades Físicas de los Alimentos y los Sistemas de Processado**. Zaragoza: Editorial Acribia S. A., 1993.

LINHARES, I.M.; MIRANDA, S.D.; VERGOLINO, R.V.D.; CAETANO, M.E.; PEIXOTO, S. **Vulvovaginites: aspectos dietéticos e bioquímicos**. J. Bras. Doenças Sexualm. Transm, 10<sup>o</sup> ed; p. 43-47; 1998.

LIMA, O.I.; OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; FARIAS, N.M.P.; SOUZA, E.L. **Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida***. Rev Bras Farmacogn, 16<sup>o</sup> ed; p. 197-201; 2006.

LOFFLER, M.; MILLER, D.J. **Aristoflex AVC – a new pH stable polymer for gels and O/W emulsions**. SOFW – Journal, 128<sup>o</sup> ed; p. 46-52; 2002.

LONGHINI, R.; RAKSA, S.M.; OLIVEIRA, A.C.P.; SVIDZINSKI, T.I.E.; FRANCO, S.L. **Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica.** Revista Brasileira de Farmacognosia, 17<sup>o</sup> ed; v.3; p. 388-395; 2007.

LUBI, N.C.; SATO, M.E.O.; GAENSLY, F. **Desenvolvimento de formas farmacêuticas líquida de uso oral isenta de substâncias glicogênicas, com extrato fluido de *Mikania glomerata* Sprengel - Asteraceae (guaco).** Revista Brasileira de Farmacognosia. v. 13; p. 43-46; 2003.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; JUNIOR, V.F.V.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. **Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares.** Química. Nova, v. 25, nº 3; p. 429-438; 2002.

MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; VIGUERA, G.C.; BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.L.; DANTAS, A.P.; VALENTE, P.H.M.; PAULINO, N. **Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities.** Journal of Ethnopharmacology. v. 74; p. 105-112; 2001.

MARTINS, M.C.L.; BOER, C.G.; SVIDZINSKI, T.I.E.; DONIDA, L.G.; MARTINS, P.F.A.M.; BOSCOLI, F.N.S.; CONSOLARO, M.E.L. **Avaliação do método de Papanicolaou para triagem de algumas infecções cérvico-vaginais.** RBAC, v. 39; 3<sup>o</sup> ed; p. 217-221; 2007.

MONTPIED, P. et al. **Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents inflammatory stress in organotypic hippocampal slice cultures.** Molecular Brain Research, v.115; nº 2, p.111-120; 2003.

NETO, A.; HAMDAN, A.N.; SOUZA, R.C. **Prevalência de cândida na flora vaginal de mulheres atendidas num serviço de planejamento familiar.** Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, 21<sup>o</sup> ed; p.441-445; 1999.

NUGENT, R. P.; KROHN, M. A.; HILLIER, S. L. **Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram-stain interpretation.** J Clin Microbiol, 29<sup>o</sup> ed; p.297-301; 1991.

OLIVEIRA, A.C.P. et al. **Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions.** Mem I Oswaldo Cruz, 101<sup>o</sup> ed; p. 493-497; 2006.

OLDONI, T.L.C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis***

**mellifera**. Dissertação de Mestrado, escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba-SP, 104 f;2007.

OLIVEIRA, E.H.; SOARES, L.F. **Prevalência de Vaginites infecciosas através da Citologia Clínica: Um estudo no Laboratório Central de Saúde Pública do Piauí**. RBAC, v. 39, nº1; p. 33-35; 2007.

OLIVEIRA, G.F. **Avaliação da atividade antimicrobiana, in vitro, do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (jambolão)**, Dissertação (Mestrado em Promoção da Saúde) – Universidade de Franca. 93 f; 2005.

OPLUSTIL, C.P.; SOUZA, N.; AUN, N.; FRANCISCO, W.; MENDES, C. **Utilização de sondas de DNA para o diagnóstico de vaginites e vaginoses**. Laes & Haes, 116º ed; p. 98-106; 1999.

PACKER, J.F., LUZ, M.M.S. **Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural**. Rev Bras Farmacogn, 17º ed; p.102-107; 2007.

PADER, M. **Reological properties of cosmetics and toiletries**. New York: Marcel Dekker, p. 247-273; 1993.

PALMA, M.; GIUDICI, R. **Copolimerização em emulsão de acetato de vinila e acrilato de butila com alto teor de sólidos**. Polímeros: Ciência e Tecnologia; v. 16; nº 004; p. 269-275; 2006.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M. **Classificação da própolis brasileira a partir de suas características físicoquímicas e propriedades biológicas**. Mensagem Doce, v.58, n.9, p.3-7, 2000.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J.A.S.; ALCICI, N.M. **Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações**. Ciênc. Tecnol. Aliment. V. 18; n. 3; 1998.

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

PINTO, M. S.; FARIA, J. E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S. T. A.; PEREIRA, C. S.; GIOSO, M. M. **Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite**. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 38, nº 6; p. 278-283; 2001.



PINTO, U.M. **Detecção de *Listeria*, *Salmonella* e *Klebsiella* em serviço de alimentação hospitalar.** Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa. Rev. Nutr, v.17; nº.3; 2004.

PRISTA, L.V.N.; MORGADO, R.M.R.; LOBO, J.M.S. **Tecnologia farmacêutica.** Foundation Calouste Gulbenkian, 6º ed; v.I, 2003.

PROENÇA, K.S.; ROMA, R.M.; OLIVEIRA, R.V.M.; GONÇALVES, M.; VILA, M.M.D.C. **Avaliação da estabilidade de cremes empregando diferentes agentes de consistência** Rev. Bras. Farm., 87º ed; n.3; p. 74-77, 2006.

RIBEIRO, H.M. **Teorias de estabilidade de emulsões cosméticas.** Cosmetic & Toiletries.14º ed, n.4; p. 88-90, 2002

RIBEIRO, L.E. **Aspectos biológicos das leveduras do gênero *Cândida* isoladas de candidíase vaginal.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 31º ed; n.6; p.595, 1998.

RIBEIRO, M.A.; DIETZE, R.; PAULA, C.R.; DA MATTA, D.A.; COLOMBO, A.L. **Susceptibility profile of vaginal yeast isolates from Brazil.** Mycopathologia, 151º ed; p. 5-10; 2001.

ROSA, M.I. RUMEL, D. **Fatores Associados à Candidíase Vulvovaginal: Estudo Exploratório.** RBGO, v. 26, nº 1, 2004.

SALOMÃO, K. **Brazilian Propolis: Correlation Between Chemical Composition and Antimicrobial Activity.** Oxford Journals. eCAM Advance Access published online on June 11, 2007.

SAMPAIO, A. C. **Curso avançado de cremes e loções cremosas.** Consulcom, 1999.

SATO, M.E.O.; GOMARA, F.; PONTAROLO, R.; ANDREAZZA, I.F.; ZARONI, M. **Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 43; nº 2; 2007.

SFORCIN, J.M. **Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity.** J Ethnopharmacol, v.73, nº.1-2, p. 43-249, 2000.

SILICI, S. & KUTLUCA, S. **Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region.** Journal of Ethnopharmacology, v.99, n.1, p.69-73, 2005.

SILVA, B.B.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V.C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S.M. **Chemical Composition and Botanical Origin of Red propolis, a New Type of Brazilian Propolis.** eCAM Advance Access published July 7, 2007.

SILVA, M.I.G.; GONDIM, A.P.S.; NUNES, I.F.S.; SOUZA, F.C.F. **Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE).** Revista Brasileira de Farmacognosia, 16º ed; n.4; p.455-462; 2006

SILVA R.A. **Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil.** Ciência Rural, Santa Maria, v.36; nº.6; p.1842-1848; 2006.

SOBEL, J.D. **Vulvovaginitis in healthy women.** Compr Ther, 25º ed; p.335-46; 1999.

SOBEL, J.D.; FARO, S.; FORCE, R.W.; **Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations.** Am J Obstet Gynecol, 178º ed; p. 203-211;1998.

SOSA, S, **Preliminary investigation on the anti-inflammatory and anti-microbial activities of propolis.** Pharmaceutical Pharmacology Letters, 7º Ed; p.168-171; 1997.

SOUZA, E.T.; NETO, B.A.; LILENBAUM W.; SANTOS C.S.; SILVA L.C.S. **Ação da própolis perante *Candida albicans*.** Ciênc. Méd., 8, 39-42; 1989.

STEPANOVIC, S. **In vitro antimicrobial activity of própolis and synergism between própolis and antimicrobial drugs.** Microbiol Res, v.158; nº4; p.353-357; 2003.

TANAKA, V.A.; FAGUNDES, L.J.; CATAPAN, A.; GOTLIEB, S.L.D.; JUNIOR, W.B.; ARNONE, M.; SOREANO, R.; MORAES, F.R.B. **Perfil epidemiológico de mulheres com vaginose bacteriana, atendidas em um ambulatório de doenças sexualmente transmissíveis, em São Paulo - SP.** Anais Brasileiros de Dermatologia, v.82; nº1; 2007.

USP. United States pharmacopeia: **Pharmacopeia Convention.** Rockville 24 ed.; p.2149-2163; 1999

VARGAS, A.C. **Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico e própolis.** Ciência Rural, v.34, nº1; p.159-163; 2004.

VEIGA JR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. **Plantas medicinais: cura segura?** Química. Nova, v. 28; nº 3; p. 519-528; 2005.

WHO. **Quality control methods for medicinal plant materials.** World Health Organization Editor, 1998.

ZANIN, S.M.W.; MIGUEL, M.D.; CHIMELLI, M.; DALMAZ, A.C. **Parâmetros físicos no estudo da estabilidade das emulsões.** Revista Visão Acadêmica, v.2; nº2; p. 47-58; 2001.

ZANINI, M. **Gel de ácido tricloroacético - Uma nova técnica para um antigo ácido.** Med. Cutan. Iber. Lat. Amer, 35º ed; v.1; p.14-17; 2007.



**CAPÍTULO II – (ARTIGO) DESENVOLVIMENTO E  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA  
*Candida albicans* DE FORMULAÇÕES SEMI-SÓLIDAS  
CONTENDO PRÓPOLIS VERMELHA**



## **Desenvolvimento e avaliação da atividade antimicrobiana contra *Candida albicans* de formulações semi-sólidas contendo própolis vermelha.**

### RESUMO

A *Candida albicans* é um microrganismo associado à maioria das vulvovaginites. Vários produtos naturais têm sido estudados para o tratamento da candidíase, sendo a própolis citada por diversos autores como produto promissor. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar o potencial antifúngico de formulações contendo própolis vermelha, sendo esta um produto ainda pouco explorado cientificamente. Os resultados da análise dos flavonóides indicaram que o conteúdo destes no produto foi em torno de 1,8%. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de difusão em disco obtendo halo de inibição de cerca de 13 mm para 600 µg de própolis e a concentração fungicida mínima (CFM) foi de 347,7 µg/mL. As formulações foram desenvolvidas utilizando como excipientes o creme Lanette®, creme Polawax®, o creme-gel Hostacerin®, o gel Aristoflex® e o gel Natrosol (hidroxietilcelulose) e avaliadas quanto ao pH, estabilidade física e térmica, perfil reológico e avaliação macro e microscópica. A formulação com própolis vermelha que apresentou melhor estabilidade, impressão global e atividade antifúngica (halo de 16,33 mm) foi a desenvolvida com o creme Lanette®.

Palavras-chave: própolis vermelha, *Candida albicans*, formas farmacêuticas semi-sólidas, atividade antifúngica.

### ABSTRACT

*Candida albicans* is a microorganism associated to the majority of vulvovaginites. Several natural products have been studied for the candidiasis treatment and propolis has been shown in many works as promissory product. Propolis is a natural flavonoids-rich product that has presented excellent antifungal activity. Once there are only few reports about biological properties of red propolis, the aim of this work was to develop formulations containing this natural product, as well as to evaluate their antifungal activity. The contents of flavonoids were approximately 1.8%. The antimicrobial activity was performed by diffusion method and showed inhibition zone of 13.18 mm using 600 µg, and the minimum fungicidal

concentration (MFC) was 347.7 µg/ mL. The formulation has been developed using Lanette™ cream, Polawax™ cream, Hostacerin SAF™ cream-gel, Aristoflex™ gel and Natrosol gel (hydroxyethylcellulose) as excipients. The formulation with red propolis presenting the best stability and antifungal activity (zone of 16,33 mm) was with Lanette™ cream.

Key-words: red propolis, *Candida albicans*, pharmaceutical dosage, antifungal activity

## 1. INTRODUÇÃO

A candidíase vulvovaginal é caracterizada por uma inflamação da vagina provocada pela infecção por *Candida* sp, sendo a *Candida albicans* responsável por 80 – 92% dos casos de candidíase (COLOMBO e GUIMARÃES, 2003). As pacientes com candidíase geralmente apresentam sintomas, tais como, corrimento espesso e esbranquiçado, prurido, avermelhamento da parte exterior da vagina e irritação ao urinar (SOBEL *et al.*, 1998). Esta patologia varia de 25% na população feminina em geral a 42% entre as mulheres adolescentes (RYLANDER *et al.*, 2004). Os principais medicamentos utilizados para o tratamento de candidíase são o fluconazol, o itraconazol e a nistatina. Entretanto, o uso da própolis verde como medicamento contra a candidíase é uma alternativa aos demais tratamentos (SOUZA *et al.*, 1989; VARGAS *et al.*, 2004; FERNANDES Jr. *et al.*, 2006; SFORCIN *et al.*, 2000; STEPANOVIC *et al.*, 2003). Estudos científicos vêm indicando que a própolis possui um grande potencial terapêutico, principalmente, em relação às atividades antineoplásica, antimicrobiana, antioxidante e antiinflamatória (GACS *et al.*, 1993; HEINZE *et al.*, 1998; CASTALDO e CAPASSO, 2002).

A composição da própolis varia principalmente devido às condições ambientais, raça da abelha e localização (SFORCIN *et al.*, 2000; KUMAZAWA *et al.*, 2004). Atualmente existem vários tipos de própolis catalogadas no Brasil, sendo esta variação decorrente da biodiversidade e das dimensões geográficas do país (PARK, ALENCAR e AGUIAR, 2002; SALATINO *et al.*, 2005). A própolis verde é a mais estudada, porém a própolis vermelha tem despertado grande interesse, por ser uma variedade mais rara encontrada principalmente nos estados de Alagoas e Sergipe. Recentes estudos relatam que esta variedade tem apresentado atividade antioxidante e antimicrobiana positiva em testes preliminares *in vitro*, sugerindo que este produto também apresenta potencial farmacológico e composição rica em compostos bioativos (ALENCAR *et al.*, 2007; TRUSHEVA *et al.*, 2006; AYRES, MARCUCCI e GIORGIO, 2007; DAUGSCH *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2007; AWALE *et al.*, 2007).



Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo testar a atividade antimicrobiana da própolis vermelha sergipana contra *Candida albicans*, desenvolver formulações semi-sólidas de uso vaginal contendo este ativo e verificar o potencial antimicrobiano das mesmas.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1 Material

Foi utilizada amostra de própolis vermelha, proveniente de apiário situado no município de Brejo Grande/Sergipe/Brasil (S – 10°28'25" e W – 36°26'12"), coletada em dezembro de 2006. Os excipientes utilizados para a preparação das formas farmacêuticas vaginais foram o creme Polawax<sup>®</sup>, o creme Lanette<sup>®</sup>, creme-gel Hostacerin SAF<sup>®</sup>, gel de hidroxietilcelulose (Natrosol) e gel de Aristoflex<sup>®</sup>, todos adquiridos em farmácia de manipulação do município de Aracaju/SE. O microrganismo utilizado foi a *Candida albicans* ATCC – 10231 proveniente do laboratório de materiais de referência da Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Foram utilizados meios de cultura Agar Sabouraud e Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid/England).

### 2.2 Caracterização da própolis vermelha

A amostra foi analisada quanto ao aroma, massa, aspecto, consistência, granulometria, estrutura, cor e impurezas visíveis segundo Instrução Normativa nº03 (BRASIL, 2001). Foi determinado o teor de umidade e cinzas na própolis conforme metodologia descrita pela *Association of Official Agricultural Chemists* (AOAC, 1997) em triplicata.

### 2.3 Obtenção do extrato seco de própolis

Os extratos hidroalcoólicos de própolis foram obtidos conforme BRITO *et al.* (2007). Amostras de 2 g de própolis vermelha foram pesadas e um volume de 200 mL de uma solução etanol a 70% foi adicionado. A extração foi realizada durante um período de 24 horas em temperatura ambiente. Após este período, o solvente foi eliminado por rotaevaporação e o rendimento calculado em relação à massa inicial da própolis antes da extração e expresso em porcentagem.

## 2.4 Determinação da concentração de flavonóides.

O teor de flavonóides no extrato de própolis foi determinado segundo KOSALEC *et al.* (2005). Flavonas e flavonóis foram expressos como equivalente de quercetina, após obtenção de uma curva padrão (ANEXO I). Para obtenção da curva padrão foram utilizadas soluções de quercetina em diferentes concentrações (20, 40, 60 e 80 e 100 µg/mL). Foi utilizado 0,5 mL da amostra (diluída 1:10) ou solução de quercetina, as quais foram adicionados 1,5 mL de etanol 95% (v/v), 0,1 mL de nitrato de alumínio a 10% (m/v), 0,1 mL de acetato de potássio 1 mol/L e 2,8 mL de água destilada. Para o branco, foi substituído o nitrato de alumínio a 10% (m/v) e o acetato de potássio 1 mol/L por água destilada. Após repouso da solução por 40 minutos, em temperatura ambiente, foi feita a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda 415 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

## 2.5 Avaliação da atividade antimicrobiana

A cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 proveniente do Laboratório de Materiais de Referência da Fundação Oswaldo Cruz – INCQS (Rio de Janeiro) foi utilizada para os testes microbiológicos. O material liofilizado foi reativado em meio Agar Sabouraud e incubado à 37°C por 24 horas.

A atividade antimicrobiana foi realizada pela técnica de difusão em disco de acordo com o método descrito por KIM, MARSHALL e WEI, 1995; SIVROPOULOU *et al.*, 1995. Foi inoculado caldo BHI com *Candida albicans* e incubado à 37° C/24horas. Após este período, o inóculo foi ajustado ao tubo 0,5 da escala McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC) em solução salina. 30 µL desta cultura foi inoculada por espalhamento em placas contendo ágar Sabouraud, nas quais foram depositadas discos de papel filtro impregnados com soluções de própolis vermelha contendo 80, 200, 400 e 600 µg e incubadas por 24 horas a 37 °C. A atividade inibitória foi determinada pela medição da zona de inibição.

Para determinação da concentração fungicida mínima foram utilizados tubos contendo 5,0 mL do caldo BHI, 4 mL de solução de própolis vermelha, seguido de diluição seriada gerando concentrações entre 290 e 14.800 µg.mL<sup>-1</sup> de própolis (FERNANDES Jr. *et al.*, 2006). Foi adicionado aos tubos 1 mL de inóculo a 0,5 da escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC) e incubado por 37°C/24 horas (DOTTO *et al.*, 2006; PAREKH e CHANDA, 2007). Após este período, 100 µL dos conteúdos dos tubos foram inoculados em superfície em placas de ágar Sabouraud, sendo estas incubadas a 37°C/24 horas. Este experimento foi realizado em

duplicata. Após o período de incubação foram observadas as placas que apresentaram crescimento fúngico.

## 2.6 Desenvolvimento da forma farmacêutica

Foram utilizadas 5 bases cosméticas para incorporação do extrato seco de própolis vermelha, sendo duas emulsões (creme Lanette<sup>®</sup> e creme Polawax<sup>®</sup>), um creme-gel (Hostacerin SAF<sup>®</sup>) e dois géis (Aristoflex<sup>®</sup> e Natrosol). Foi preparada uma solução a 7,5% a partir do extrato seco de própolis vermelha, usando como veículo de solubilização álcool absoluto. A incorporação foi realizada por meio de diluição geométrica, gerando uma concentração final de 5 mg de própolis por grama de base. Formulações com pH 4,4 também foram preparadas utilizando solução de ácido cítrico a 1% para ajuste.

As formulações obtidas foram avaliadas em relação às suas características macroscópicas, tais como separação de fases, precipitação ou turvação, ressecamento, pH, consistência e cor (BRASIL, 2007).

A determinação da viscosidade aparente das formulações foi realizada utilizando viscosímetro rotativo Visco Star-R Modelo: V 10002 (Fungilab S.A.) com “spindle” R7 ou R6, a 20°C. A velocidade de cisalhamento aplicada foi entre 0,3 a 200 RPM, com 2 minutos de intervalo entre cada medição. As determinações da viscosidade foram realizadas em triplicata (LUBI, SATO e GAENSLY, 2003).

A estabilidade física e térmica das formulações foram avaliadas por centrifugação (High Speed Brushless Centrifuge MPW-3505) a 2325 x g durante 10 minutos nas temperaturas de 25 e 35°C.

## 2.7 Ensaio microbiológico das formulações

A avaliação da atividade fúngica das formulações foi realizada seguindo a metodologia descrita por PEREIRA e GÓMEZ (2007), com algumas modificações. 100 µL de inóculo (0,5 da escala de McFarland) foi adicionado em placas com ágar Sabouraud. Foram adicionados 0,2 mL de amostra em poços com 5 mm de diâmetro previamente perfurados no ágar. As amostras testadas foram Hostacerin SAF<sup>®</sup> base, Hostacerin SAF<sup>®</sup> com Nistatina 25.000 UI/g, Hostacerin SAF<sup>®</sup> com própolis 5 mg/g pH 4,3 e Hostacerin SAF<sup>®</sup> com própolis 5 mg/g pH 6,2, Lanette<sup>®</sup> base, Lanette<sup>®</sup> com Nistatina 25.000 UI/g, Lanette<sup>®</sup> com própolis 5 mg/g pH 4,3 e Lanette<sup>®</sup> com própolis 5 mg/g pH 6,2. As placas foram

incubadas a 37° C/24 horas. A inibição foi detectada pela presença de halos ao redor dos poços. O experimento foi realizado em triplicata.

## 2.8. Análise Estatística

A diferença da medida dos halos de inibição de extratos de própolis e das formulações foi realizada com auxílio do programa *Statistica*, versão 7.0. Aplicou-se análise de variância (ANOVA), sendo que as diferenças significativas foram determinadas pelo teste de Tukey. Diferenças entre as médias a um nível de 5% ( $p < 0,05$ ) foram consideradas significativas.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Caracterização da própolis vermelha

A amostra coletada apresentou aroma balsâmico acentuado, o que além de identificar o produto ainda indica se tratar de uma amostra nova. A cor forte avermelhada é característica da própolis produzida por algumas colméias da região norte de Sergipe e sul de Alagoas. O material se apresentou isento de impurezas do tipo abelhas, madeira, vegetais e outros. A granulometria da amostra selecionada foi heterogênea, não pulverizada com pedaços de diferentes tamanhos e consistência rígida à temperatura ambiente, o que pode indicar elevado teor de resinas. Segundo FUNARI e FERRO (2006), o alto teor de resinas é favorável uma vez que as substâncias provenientes destas possuem inúmeras atividades biológicas já comprovadas.

A amostra apresentou teor de cinzas e umidade dentro dos limites estabelecidos na legislação (tabela 1) (BRASIL, 2001). Apesar disso, o teor de ceras está muito próximo do valor limite, considerando o desvio encontrado nas análises. É importante ressaltar que os limites definidos pela normativa, referem-se à própolis mais comum e mais estudada (própolis verde) no Brasil. A própolis vermelha apresenta aspecto muito distinto da própolis verde. Desta forma, os teores de umidade, cinzas, além da composição de ceras e outros componentes podem ser diferentes, sendo que os limites devem ser observados e estabelecidos para esta nova variedade.

O rendimento da extração foi de 43,5%, acima do valor mínimo especificado na legislação (35%), mostrando-se solúvel no solvente extrator. O teor de flavonóides em amostras de extrato seco deve apresentar no mínimo de 0,25% (m/m) e na própolis no mínimo 0,5% (m/m), segundo normativa nº3 (BRASIL, 2001). O teor obtido no extrato

hidroalcoólico foi próximo a 2%, caracterizando-o como um extrato que possui médio teor de flavonóides (tabela 1). Todos os parâmetros estudados identificam a própolis e demonstram que a mesma não foi adulterada.

Tabela 1-Parâmetros físico-químicos da própolis vermelha e do extrato de própolis vermelha

| Teste       | Valores de Referência *<br>(%/m/m)                | Média dos resultados $\pm$ DP**<br>(%/m/m) |
|-------------|---|--|
| Umidade     | Máximo de 8                                       | 6,47 $\pm$ 1,31                            |
| Cinzas      | Máximo de 5                                       | 4,39 $\pm$ 0,67                            |
| Flavonóides | Baixo: até 1,0<br>Médio: >1,0 - 2,0<br>Alto: >2,0 | 1,87 $\pm$ 0,26                            |

\* Valores de referência de acordo com legislação vigente (BRASIL, 2001)

\*\* DP: desvio padrão

### 3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

A própolis vermelha apresentou halos com tamanho entre 9,65 a 13,18 mm contra *C. albicans* (tabela 2). A maior inibição ocorreu na presença de própolis na concentração de 600  $\mu$ g (13,18  $\pm$  2,14 mm), o que representa 11,22  $\mu$ g de flavonóides. A maioria dos trabalhos não correlaciona a quantidade de flavonóides presentes na amostra com a atividade biológica encontrada. Os flavonóides são compostos considerados como marcadores químicos da amostra e segundo literatura são estas as moléculas responsáveis pelas atividades biológicas (GREENAWAY *et al.*, 1991; AGA *et al.*, 1994; BANKOVA *et al.*, 1995; MARCUCCI *et al.*, 1996, MARCUCCI *et al.*, 2001; FUNARI e FERRO, 2006). Esta correlação é muito importante devido a composição química da própolis ser amplamente variada.

Tabela 2 – Atividade antifúngica de extrato hidroalcoólico de própolis vermelha em *Candida albicans*.

| Própolis ( $\mu$ g) | Flavonóides ( $\mu$ g) | Diâmetro dos halos (mm)          |
|---------------------|------------------------|----------------------------------|
| 80                  | 1,50                   | 10,35 $\pm$ 2,70 <sup>a,b*</sup> |
| 200                 | 3,74                   | 9,65 $\pm$ 0,77 <sup>a*</sup>    |
| 400                 | 7,48                   | 11,90 $\pm$ 2,39 <sup>b*</sup>   |
| 600                 | 11,22                  | 13,18 $\pm$ 2,14 <sup>b*</sup>   |

\* média  $\pm$  desvio padrão; letras iguais representam valores estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ )

Comparando o maior halo de inibição da própolis vermelha do estado de Sergipe ( $13,18 \pm 2,14$  mm para 600  $\mu$ g de própolis) com o menor obtido por SALOMÃO *et al.* (2007) que testou amostras de própolis vermelha oriundas de Alagoas para inibição de *Candida albicans* (halo de 21 mm para 400  $\mu$ g) observou-se significativa diferença no halo de inibição. O autor não quantificou o marcador químico na amostra e por isso não foi possível comparar o comportamento microbiológico em relação ao teor de flavonóides. O valor de halo diferenciado pode ser devido a diferente concentração deste marcador. A própolis vermelha de Alagoas passou por procedimento de extração diferente, protegendo seu extrato da luz. Desta forma pode-se aumentar a estabilidade dos constituintes presentes na amostra. Além disso, apesar dos estados em questão (Alagoas e Sergipe) serem muito próximos, a biodiversidade é fator fundamental e afeta a qualidade dos constituintes presentes no produto. Segundo PEREIRA *et al.* (2002) e CASTRO *et al.* (2007), a composição química da própolis varia de acordo com a flora regional, a sazonalidade, o manejo e variedade da abelha presente no apiário. No caso da própolis vermelha, sua origem botânica não está totalmente elucidada, apesar de já estar correlacionada com espécies encontradas nas proximidades dos apiários.

Outro ponto que diferencia o presente trabalho do autor citado é a metodologia do ensaio microbiológico. SALOMÃO *et al.* (2007) realizou o ensaio utilizando poços contendo 200  $\mu$ L de solução de própolis, enquanto que na técnica utilizada neste trabalho, o material foi aplicado em um disco de papel de filtro, e portanto apresentou-se na forma sólida. Sabe-se que a forma de apresentação do material pode interferir no perfil de resposta. OLIVEIRA (2005) testou os dois métodos utilizando extrato de *Syzygium cumini* (jambolão) e observou que existe diferença significativa dos diâmetros encontrados pelas duas técnicas. Na maioria de seus resultados foi observado que a técnica de poços apresenta maior halo de inibição para uma mesma concentração. A transferência de massa no meio líquido é favorecida em relação ao meio sólido.

OLIVEIRA (2005) testou ainda miconazol 50  $\mu$ g como controle positivo para *C. albicans* pela técnica de disco obtendo halo de 20,0 mm. Já o extrato de jambolão apresentou halo de inibição de 15,3 mm utilizando uma massa de 3200  $\mu$ g. Segundo o autor, os resultados são promissores para o uso deste extrato.

FARIAS BUFFON e CINI (2003) testaram a nistatina a 100.000 UI/ mL (150.000 UI) utilizando método do poço. O halo de inibição apresentado foi de 17 mm para *Candida albicans*. A nistatina é um fármaco comumente utilizado para candidíase.

Segundo SILVA *et al.* (2006) a própolis verde coletada na microrregião do Brejo Paraibano/PB em diferentes épocas do ano testadas a 30% em solução alcoólica não apresentou atividade antimicrobiana e antifúngica sobre *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*.

Em relação à concentração fungicida mínima (CFM), foi observado que a partir da concentração 347,7 µg/mL de própolis vermelha não houve crescimento fúngico após o período de incubação de cinco dias. FERNANDES Jr *et al.* (1995) e OTA *et al.* (2001) estudaram extratos etanólicos de própolis verde de doze diferentes regiões do Brasil obtendo as concentrações mínimas fungicidas de 3800 µg/mL em *C. albicans* e 9000 µg/mL em *Candida sp* respectivamente. Comparando estes resultados, foi observado que pode-se considerar significativo o resultado obtido com o extrato de própolis vermelha.

Segundo KOSALEC *et al.* (2005), OLIVEIRA *et al.* (2006) e PARKER e LUZ (2007), o teor de flavonóides nas amostras está relacionado às propriedades antimicrobianas da própolis. Considerando o resultado do teor de flavonóides obtido na amostra estudada (1,87%± 0,26), conclui-se que a CFM em relação aos flavonóides foi de 6,50 µg/mL. BATISTA, BIRMAN e CURY (1999) em seus estudos concluíram que a CFM dos medicamentos fungicidas de referência no mercado para o tratamento de *C. albicans*, foram 0,15 µg/mL, 64 µg/mL e 64 µg/mL para anfotericina B, cetoconazol e miconazol, respectivamente. No estudo realizado por OLIVEIRA *et al.* (2006) a CFM do extrato de própolis verde para 67 cepas diferentes de levedura causadoras de onicomicoses foi de 200 µg/mL de flavonóides. Desta forma, observa-se que o extrato de própolis vermelha estudado apresenta potencial fungicida comparável a outras substâncias já utilizadas.

### 3.3 Desenvolvimento da forma farmacêutica

As formulações contendo própolis em gel Natrosol e Aristoflex® apresentaram imediata separação de fases. Durante o procedimento de incorporação foi observada a incompatibilidade da solução de própolis vermelha com as referidas bases. No processo de espatulação houve precipitação da própolis, gerando resíduos na formulação final. Esse evento foi ocasionado provavelmente devido aos componentes do extrato seco de própolis vermelha apresentarem baixa solubilidade em água. Apesar da utilização de um co-solvente (propilenoglicol), o qual propicia a total solubilização do extrato de própolis vermelha, o alto teor de água na formulação diminuiu a estabilidade do sistema, facilitando a precipitação do material. Microscopicamente foi observado que os géis apresentaram alto teor de resíduos de própolis, entretanto diferentemente do Natrosol, o gel Aristoflex® não apresentou

separação de fases e sim uma baixa solubilidade da própolis da dispersão polimérica (ANEXO II e III).

Na incorporação em creme-gel Hostacerin SAF<sup>®</sup> foi observada compatibilidade adequada do produto com a base, permanecendo uma quantidade mínima de resíduos. A formulação com Hostacerin SAF<sup>®</sup> não apresentou precipitação após procedimento de incorporação. Microscopicamente, a formulação se assemelha ao gel de Aristoflex<sup>®</sup>, mas com uma quantidade muito inferior de resíduos, provavelmente devido ao conteúdo lipofílico do creme-gel (ANEXO IV). A diminuição do conteúdo aquoso facilitou a incorporação da própolis e solubilização da mesma no meio. No trabalho desenvolvido por MARQUELLE-OLIVEIRA *et al.* (2007) utilizando própolis verde foi evidenciado que formulações com maior teor lipídico suportavam melhor a incorporação de extrato de própolis.

Durante a incorporação nos cremes Polawax<sup>®</sup> e Lanette<sup>®</sup>, os quais possuem um teor lipídico superior às formulações descritas anteriormente, foi observada uma interação adequada das bases com o extrato de própolis, não apresentando separação de fases ou precipitação. Foi observada microscopicamente uma pequena quantidade de própolis não solubilizada na formulação com o Polawax<sup>®</sup> (ANEXO V e VI)

O odor antes e após a incorporação da própolis nas diferentes bases não foi alterado e a alteração da cor foi devido à característica intrínseca do extrato incorporado.

As formulações de própolis com creme Lanette<sup>®</sup>, creme-gel Hostacerin SAF<sup>®</sup> e creme Polawax<sup>®</sup> foram as que apresentaram melhor impressão global, sendo as mesmas selecionadas para avaliação da atividade antimicrobiana.

A determinação do pH é importante durante o desenvolvimento de um produto, pois avalia a estabilidade do produto durante o período de estocagem, assegura o pH compatível com os componentes da formulação e como o local de aplicação, evitando irritações. Os pHs das bases Lanette<sup>®</sup>, Hostacerin<sup>®</sup> e Polawax<sup>®</sup> foram 6,3, 6,3 e 6,1, respectivamente. Após incorporação da própolis nas três bases foi observado que não existiu variação no pH. MARQUELLE-OLIVEIRA *et al.* (2007) desenvolveram formulações com creme Polawax<sup>®</sup> e creme-gel Hostacerin SAF<sup>®</sup> e evidenciaram que a adição de própolis verde ocasionou ligeira redução do pH, sendo estas duas formulações as mais estáveis dentre as estudadas.

Nas formulações contendo própolis vermelha onde o pH das formulações foi ajustado para aproximadamente 4,3 foi observado mudanças na coloração sem comprometimento da aparência do produto final (ANEXO VII).



Em relação à estabilidade física do produto, foi observado que os cremes Lanette® e Hostacerin SAF® apresentaram estabilidade superior ao creme Polawax® quando submetidos a condições de estresse térmico e mecânico. O creme Polawax® apresentou separação de fases após 10 minutos de centrifugação na temperatura de 33°C. As demais bases testadas não apresentaram separação de fases até a temperatura de 35 °C (ANEXO VIII). MARQUELE-OLIVEIRA *et al.* (2007) estudaram a incorporação de própolis verde em creme Polawax®. Neste estudo os autores relatam que esta formulação apresentou estabilidade física e funcional durante o período estudado.

Para todas as bases e formulações testadas, os resultados do perfil reológico evidenciaram fluxo não newtoniano, com variação da viscosidade com o grau de cisalhamento aplicado, sendo que a tensão e o gradiente de cortes não foram diretamente proporcionais, originando diferentes valores de viscosidade. Assim, as bases gel Aristoflex®, gel Natrosol e creme-gel Hostacerin SAF® apresentaram fluxo não newtoniano do tipo pseudoplástico tempo independente, com diminuição da viscosidade com o aumento do grau de cisalhamento. Os cremes Lanette® e Polawax® também apresentaram fluxo não newtoniano do tipo pseudoplástico, porém apresentaram área de histerese, demonstrando um comportamento tempo dependente. Os cremes possuem uma viscosidade menor que as dos géis e uma menor capacidade de retornar a forma original no tempo do experimento. São classificados como tixotrópicos. Os géis apresentaram melhor desempenho reológico, e devido a essa característica são amplamente utilizados como veículos (BARRY, 1983; RICCI *et al.*, 2002; CHORILLI *et al.*, 2007).

A determinação do perfil reológico das formulações é fundamental, pois traz informações importantes sobre os efeitos da formulação e do processamento sobre as características do produto e sobre sua qualidade e estabilidade. Esse perfil está relacionado com seu enchimento e retirada do material de acondicionamento, com a espalhabilidade e aderência do material sobre o local de aplicação, com a biodisponibilidade dos ativos, com a aceitabilidade pelo paciente e com a estabilidade física do produto (SORIANO *et al.*, 1996; BORGHETTI E KNORST, 2006). Aditivos reológicos podem ser adicionados às formulações com o objetivo de alterar seu perfil de fluxo e aumentar a estabilidade do produto final (CHORILLI *et al.*, 2007).

As formulações semi-sólidas possuem propriedades adequadas para o uso tópico, pois se deformam facilmente quando aplicados. No caso das formulações testadas, uma pequena tensão é capaz de diminuir acentuadamente a viscosidade. Desta forma, o material flui com facilidade. No momento que a tensão é retirada, rapidamente o material se

reestrutura e retorna a viscosidades maiores. Neste momento o material já foi aplicado e deve permanecer no ambiente vaginal, se escorrer.

O creme Lanette<sup>®</sup> apresentou menor viscosidade aparente após incorporação da própolis, porém o ajuste de pH não alterou significativamente a viscosidade aparente (figura 1). O creme Polawax<sup>®</sup> apresentou perfil reológico muito semelhante, com ligeiro aumento de viscosidade aparente após incorporação do extrato de própolis e ajuste de pH (figura 2). O creme gel Hostacerin SAF<sup>®</sup> apresentou comportamento semelhante ao dos géis, sendo que após incorporação da própolis e alteração de pH não houve alteração no perfil reológico (figura 3).

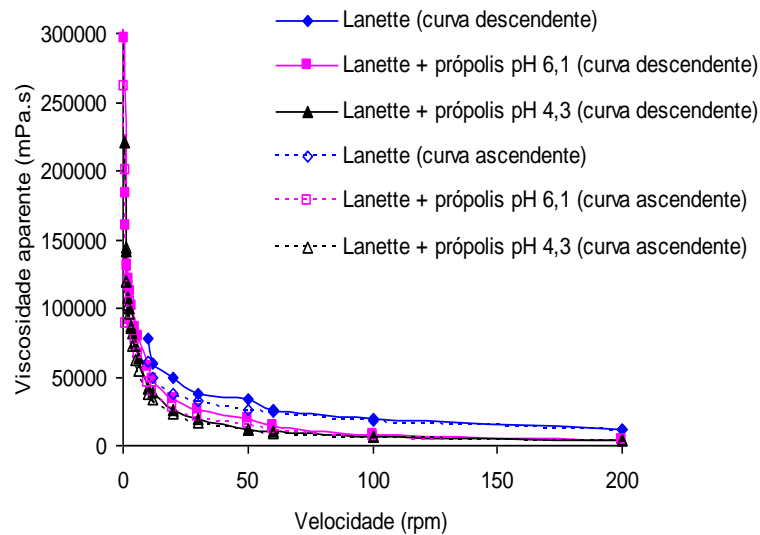


Figura 1 – Viscosidade aparente do creme Lanette<sup>®</sup>, creme Lanette<sup>®</sup> após incorporação do extrato de própolis e creme Lanette<sup>®</sup> contendo própolis e com pH ajustado em 4,3.

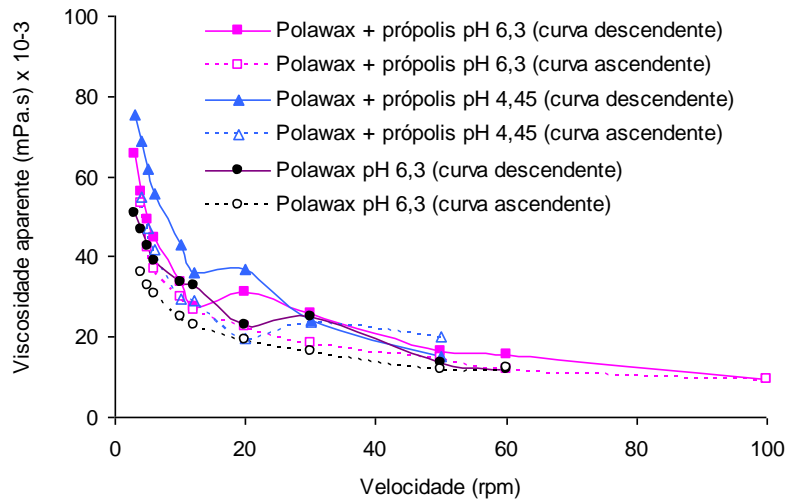


Figura 2 – Viscosidade aparente do creme Polawax<sup>®</sup>, creme Polawax<sup>®</sup> após incorporação do extrato de própolis e creme Polawax<sup>®</sup> contendo própolis e com pH ajustado em 4,45.

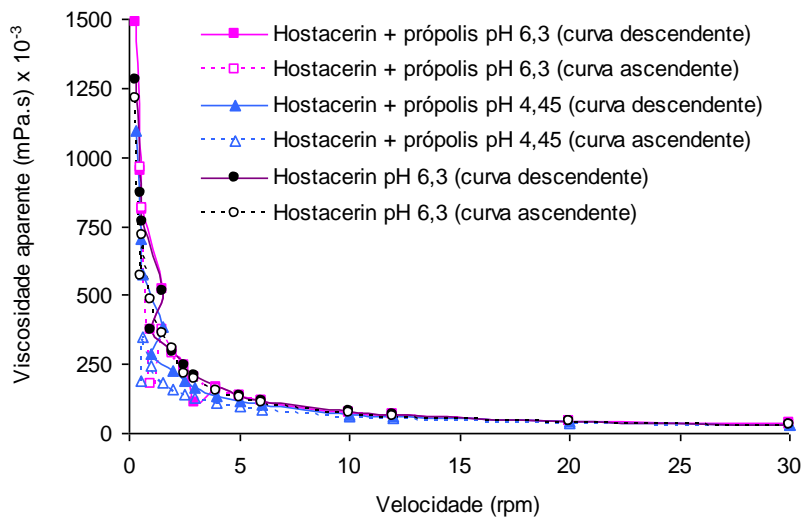


Figura 3 – Viscosidade aparente do creme-gel Hostacerin SAF<sup>®</sup>, creme-gel Hostacerin SAF<sup>®</sup> após incorporação do extrato de própolis e creme-gel Hostacerin SAF<sup>®</sup> contendo própolis e com pH ajustado em 4,4.

### 3.4 Ensaio microbiológico das formulações

Após a realização dos ensaios microbiológicos foi observado que o creme-gel Hostacerin SAF<sup>®</sup> com própolis vermelha em diferentes pHs apresentou halos de inibição muito pequenos para *C. albicans* (tabela 3). Porém, a base sem incorporação de ativos

apresentou halo de aproximadamente 10 mm, inibição esta provavelmente resultante do conservante existente na base.

Tabela 3. Diâmetros dos halos de inibição da Nistatina (controle positivo) e das formulações com própolis vermelha em *Candida albicans* em Hostacerin<sup>®</sup> e Lanette<sup>®</sup> em diferentes pHs.

| Amostras                 | Hostacerin <sup>®</sup>             | Lanette <sup>®</sup>     |
|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------|
|                          | Halos de inibição (mm) (Média ± DP) |                          |
| Base (controle negativo) | 10,33±0,58 <sup>a*</sup>            | 11,67±2,08 <sup>a*</sup> |
| Nistatina (5000 UI)      | 15,00±0,00 <sup>b*</sup>            | 19,00±1,00 <sup>b*</sup> |
| Própolis pH 4,43 (1 mg)  | 4,00±1,73 <sup>c*</sup>             | 16,33±0,58 <sup>c*</sup> |
| Própolis pH 6,43 (1 mg)  | 3,33±0,58 <sup>c*</sup>             | 16,33±1,53 <sup>c*</sup> |

\* = letras iguais representam valores estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ) numa mesma coluna

Os resultados sugerem uma forte interação entre a base Hostacerin SAF<sup>®</sup> e a própolis, originando a inativação das substâncias com atividade antimicrobiana. A incorporação do extrato nesta base apresentou-se inefetiva contra *C. albicans*, demonstrando que uma base inerte pode interagir com os ativos, alterando sua capacidade farmacológica. É imprescindível a seleção dos adjuvantes farmacotécnicos ideais para cada substância, não somente do ponto de vista da estabilidade, custo e aparência, mas principalmente em relação a sua efetividade. Nesta mesma base, foi observado halo de inibição significativo para a nistatina (15 mm) compatível com os obtidos por FARIAS BUFFON e CINI (2003). Este resultado aponta que a referida base é compatível com a nistatina, apesar da formulação utilizando Lanette<sup>®</sup> o mesmo ter apresentado halo de inibição superior (tabela 3). A escolha da base ideal deve ponderar os parâmetros acima relacionados (custo, aparência, estabilidade) com os dados da atividade do produto.

As formulações com o creme Lanette<sup>®</sup> e a própolis vermelha apresentaram halo de inibição em torno de 16 mm resultado que demonstra perfeita compatibilidade da base com o ativo. O resultado da formulação contendo própolis foi significativo quando comparado ao da formulação com nistatina, pois a concentração de flavonóides (possível responsável pela ação fungicida) é de 0,010 mg/mL e a de nistatina (4400 UI – 1 mg) é de 1,14 mg/mL, mais de cem vezes inferior à concentração do fármaco de referência.

No que diz respeito à influência do pH na formulação a sua manutenção em torno de 4,5 é uma característica importante para as fórmulas vaginais, pois preserva o pH vaginal minimizando o desenvolvimento de patógenos. Para as formulações de Lanette<sup>®</sup>, como

pode-se verificar na tabela 3, em testes *in vitro*, a alteração do pH não influenciou no resultado final de inibição.

#### 4. CONCLUSÃO

Após observação dos resultados deste trabalho concluiu-se que o extrato hidroalcoólico de própolis vermelha do litoral norte do estado de Sergipe inibiu *Candida albicans* ATCC – 10231 e apresentou ação fungicida em uma concentração de 347,7 µg/mL. Também foi observado que, dentre as bases estudadas, a que possui melhor característica físico-química para a incorporação e veiculação do ativo, sendo o melhor excipiente na ação antifúngica da própolis vermelha foi o creme Lanette®.

#### 5. BIBLIOGRAFIA

ALENCAR, S.M.; OLDONI, T.L.C.; CASTRO, M.L.; CABRAL, I.S.R.; COSTA-NETO, C.M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKID, M. **Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis**. *Journal of Ethnopharmacology*, v.10; 10º ed; 2007.

AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists**, 16º ed; cap. 4; 1997.

AWALE, S.; LI, F.; ONOZUKA, H.; ESUMI, H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. **Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16º ed; p.181–189; 2008.

AYRES, D.C.; MARCUCCI, M.C.; GIORGIO, S. **Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis***. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 102; n º 2; p. 215-220; 2007.

BARRY, B.W. **Dermatological Formulations: percutaneous absorption**. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, v.18, ed. 1, p. 351-402, 1983.

BATISTA, J.M.; BIRMAN, E.G.; CURY, A.E. **Suscetibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética**. *Rev. Odontol Univ São Paulo*. v. 13, n. 4, p. 343-348, 1999.

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

BRITO, K. P. P ; LEITE, J. O. ; SOARES, V. T. B. ; ARAÚJO, E. D. ; MARCELLINI, P.S. ; CARDOSO, J. C. . **Caracterização físico-química da própolis vermelha e influência nos cuidados de coleta.** In: 16o. Congresso Brasileiro de Apicultura, 2006, Aracaju. Anais do 16o. Congresso Brasileiro de Apicultura. Aracaju, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos/ Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** – Brasília : Anvisa, p. 130; 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa.** Publicado no Diário Oficial da União de 23/01/2001 , Seção 1 , Página 18.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. **Propolis, an old remedy used in moderm medicine.** Fitoterapia, v.73, p.51-56; 2002.

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

CHORILLI, M.; ZAGUE, V.; SCARPA, M.V.; LEONARDI, G.R. **Influência da viscosidade do veículo na liberação *in vitro* da cafeína.** Revista Eletrônica de Farmácia, v. 4; n ° 1; p. 52-60; 2007.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. **Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp.*** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 36 ° ed; n ° 5; p.599-607; 2003.

DAUGSCH, A.; MORAES, C.S.; FORT, P.; PARK, Y.K. **Brazilian Red Propolis - Chemical Composition and Botanical Origin.** eCAM Advance Access published, July 7, p.1, 2007.

DOTTO, S.R.; TRAVASSOS, R.M.C.; FERREIRA, R.; SANTOS, R.; WAGNER, M. Avaliação da ação antimicrobiana de diferentes medicações usadas em endodontia. Revista Odonto Ciência. Fac. Odonto/ PUCRS, v. 21; n ° 53; 2006.

FARIAS, N.C.; BUFFON, M.M.; CINI, R. **Avaliação *in vitro* da ação antifúngica do digluconato de clorhexidina e nistatina no controle do crescimento de *Candida albicans*.** Visão Acadêmica, v. 4; n<sup>o</sup> 2; p. 83-88; 2003.

FERNANDES Jr., A.; SUGIZAKI, M.F.; FOGO, M.L.; FUNARI, S.R.C.; LOPES, C.A.M. ***In vitro* activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections.** J. venom. Anim. Toxins, 1<sup>o</sup> ed; p. 63-69; 1995.

FERNANDES Jr., A.; LOPES, M.M.R.; AYDIR, V.C.; MOTEIRO, C.M.; VIEIRA, E.P.; **Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil.** Ciência Rural, Santa Maria, v.36; n<sup>o</sup> 1; p.294-297; 2006.

FUNARI C.S.; FERRO V.O. **Análise de própolis.** Ciência e Tecnologia Alimentar, Campinas, 26<sup>o</sup> ed; n<sup>o</sup> 1; p. 171-178; 2006.

GACS, M.; HUSZENICZA, G.; KEG, T.; VIGH, Z.; STOLLAR, Z.; OLAH, O.; JONSSON. J.; O PPEL, K. **Experiences on the effectiveness of an intramammary infusion without containing antibiotics.** Magyar Allatorvosok, v.48; n<sup>o</sup> 8; p.473-478; 1993.

HEINZE, W.; HOLZ, J.; NATTERMANN, H.; BLANKENSTEIN, P. **Effects of ethanol extracts of propolis against common bacteria, fungi and viruses of veterinary importance.** Tierärztliche Umschau, v.53; n<sup>o</sup> 6; p.321-326; 1998.

KIM, J.; MARSHALL, M. R.; WEI, C. **Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens.** Journal Agriculture Food Chemistry, v.43; n<sup>o</sup> 11; p.2839-2845; 1995.

KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S.; BAKMAZ, M.; KNEZEVIC, S.V. **Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products.** Acta Pharma, 55<sup>o</sup> ed; p. 423–430; 2005.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. **Antioxidant activity of propolis of various geographic origins.** Food Chemistry, v.84; n<sup>o</sup> 3; p.329-339; 2004.

LUBI, N.C.; SATO, M.E.O.; GAENSLY, F. **Desenvolvimento de formas farmacêuticas líquida de uso oral isenta de substâncias glicogênicas, com extrato fluido de *Mikania glomerata* Sprengel - Asteraceae (guaco).** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 13; p. 43-46; 2003.

MARQUELE-OLIVEIRA, Y.M. FONSECA, O. DE FREITAS AND M.J.V. FONSECA. **Development of topical functionalized formulations added with propolis extract: Stability, cutaneous absorption and in vivo studies.** International Journal of Pharmaceutics, v. 342; p. 40-48; 2007.

OLIVEIRA, A.C.P.; SHINOBU, C.S.; LONGHINI, R.; FRANCO, S.L.; SVIDZINSKI, T.I.E. **Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions.** Mem Inst Oswaldo Cruz, v.101; p. 493-497; 2006.

OLIVEIRA, G.F. **Avaliação da atividade antimicrobiana, in vitro, do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (jambolão),** Dissertação (Mestrado em Promoção da Saúde) – Universidade de Franca, 93 f;2005.

OTA, C.; UNTERKIRCHER, C.; FANTINATO, V.; SHIMIZU, M.T. **Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*.** Mycoses, 44<sup>o</sup> ed; p. 375-378; 2001.

PACKER, J.F., LUZ, M.M.S. **Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural.** Rev Bras Farmacognosia, 17<sup>o</sup> ed; p.102-107; 2007.

PAREKH, J.; CHANDA, S. **In vitro antibacterial activity of the crude methanol extract of *Woodfordia fruticosa kurz*. Flower (Lythraceae).** Brazilian Journal of Microbiology, 38<sup>o</sup> ed; p.204-207; 2007.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. **Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis.** J Agric Food Chem, 50<sup>o</sup> ed; p.2502–2506; 2002.

PEREIRA, V.G.; GOMEZ, R.J.H.C. **Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimento.** Ciência Agrárias, v. 28; n<sup>o</sup> 2; p. 229-240; 2007.

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

RICCI, E. J.; BENTLEY, M. V. L. B.; FARAH, M.; BRETAS, R. E. S.; MARCHETTI, J. M. **Rheological characterization of Poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels.** Eur. J. Pharm. Sci, v. 17; p. 161-167; 2002.



RYLANDER, E; BERGLUND, A.L.; KRASSNY, C.; PETRINI, B. **Vulvovaginal candida in a young sexually active population: prevalence and association with oro-genital sex and frequent pain at intercourse.** Sex Transm Infect, 80<sup>o</sup> ed; p. 54-57; 2004.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E.W.; NEGRIL, G.; MESSAGE, D. **Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis.** Published by Oxford University Press, 2<sup>o</sup> ed; p. 33–38; 2005.

SALOMÃO, K.et.al. **Brazilian Propolis: Correlation Between Chemical Composition and Antimicrobial Activity.** Oxford Journals, June 11, 2007.

SFORCIN, J.M. **Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity.** J Ethnopharmacol, v.73, nº.1-2, p. 43-249, 2000.

SILVA, B.B.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V.C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S.M. **Chemical Composition and Botanical Origin of Red propolis, a New Type of Brazilian Propolis.** eCAM Advance Access published July 7, 2007.

SILVA R.A. **Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil.** Ciência Rural, Santa Maria, v.36; nº.6; p.1842-1848; 2006.

SIVROPOULOU, A.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. **Antimicrobial activity of mint essential oils.** Journal Agriculture Food Chemistry, v.43, nº9, p.2384-2388, 1995.

SOBEL, J.D.; FARO, S.; FORCE, R.W.; **Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations.** Am J Obstet Gynecol, 178<sup>o</sup> ed; p.203-211;1998.

SORIANO, M.M.J.;CONTRERAS, M.J.F.; FLORES, E.S. **Proposal and pharmacotechnical study of a modern dermopharmaceutical formulation for cold cream.** Bolletino Chimico Farmacêutico, v.135; p.364-373; 1996.

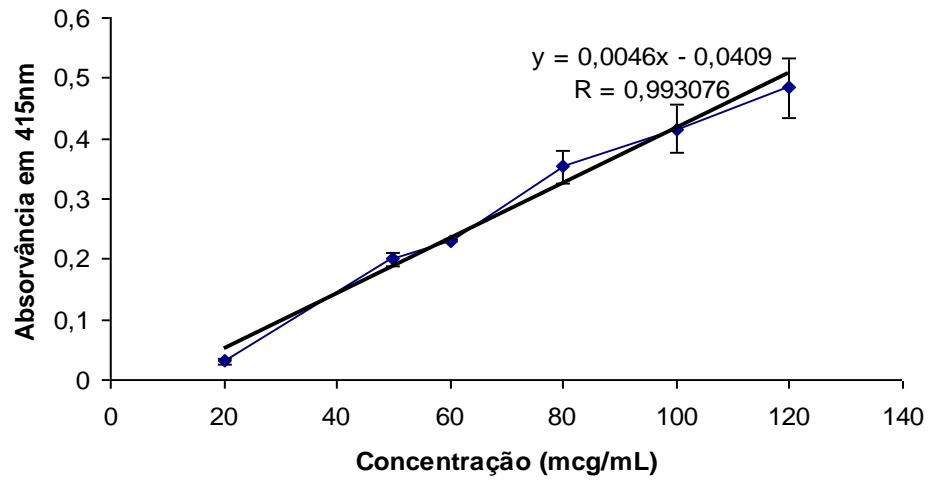
SOUZA, E.T.; NETO, B.A.; LILENBAUM W.; SANTOS C.S.; SILVA L.C.S. **Ação da própolis perante *Candida albicans*.** Cienc. Med, 8<sup>o</sup> ed; p. 39-42; 1989.

STEPANOVIC, S. **In vitro antimicrobial activity of própolis and synergism between própolis and antimicrobial drugs.** Microbiol Res, v.158; nº4; p.353-357; 2003.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M.C.; MIORIN, P.L.; PASIN, F.R.; TSVETKOVA, I. **Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis.** Published by Oxford University Press, 3<sup>o</sup> ed; p.249–254; 2006.

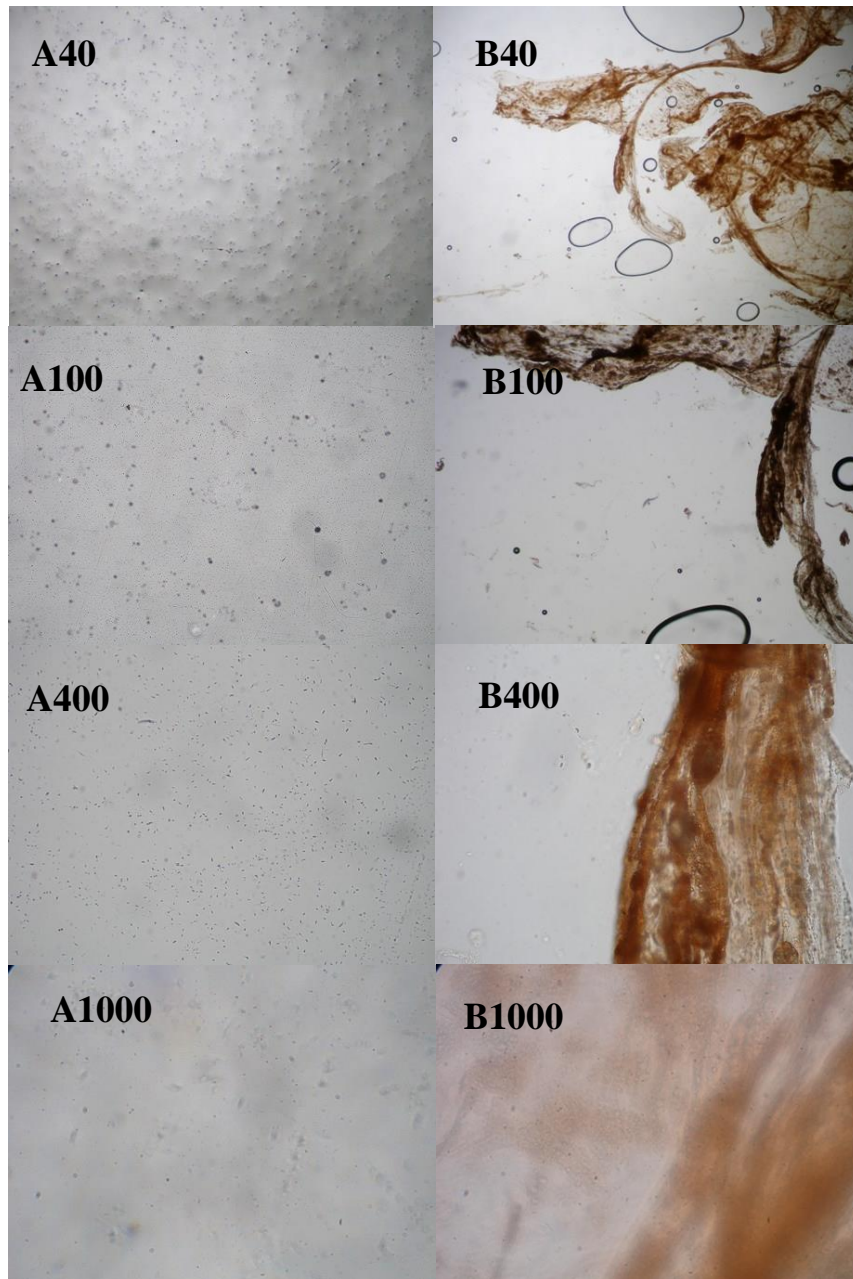
VARGAS, A.C. **Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico e própolis.**  
Ciência Rural, v.34, n 01; p.159-163; 2004.

## ANEXO I



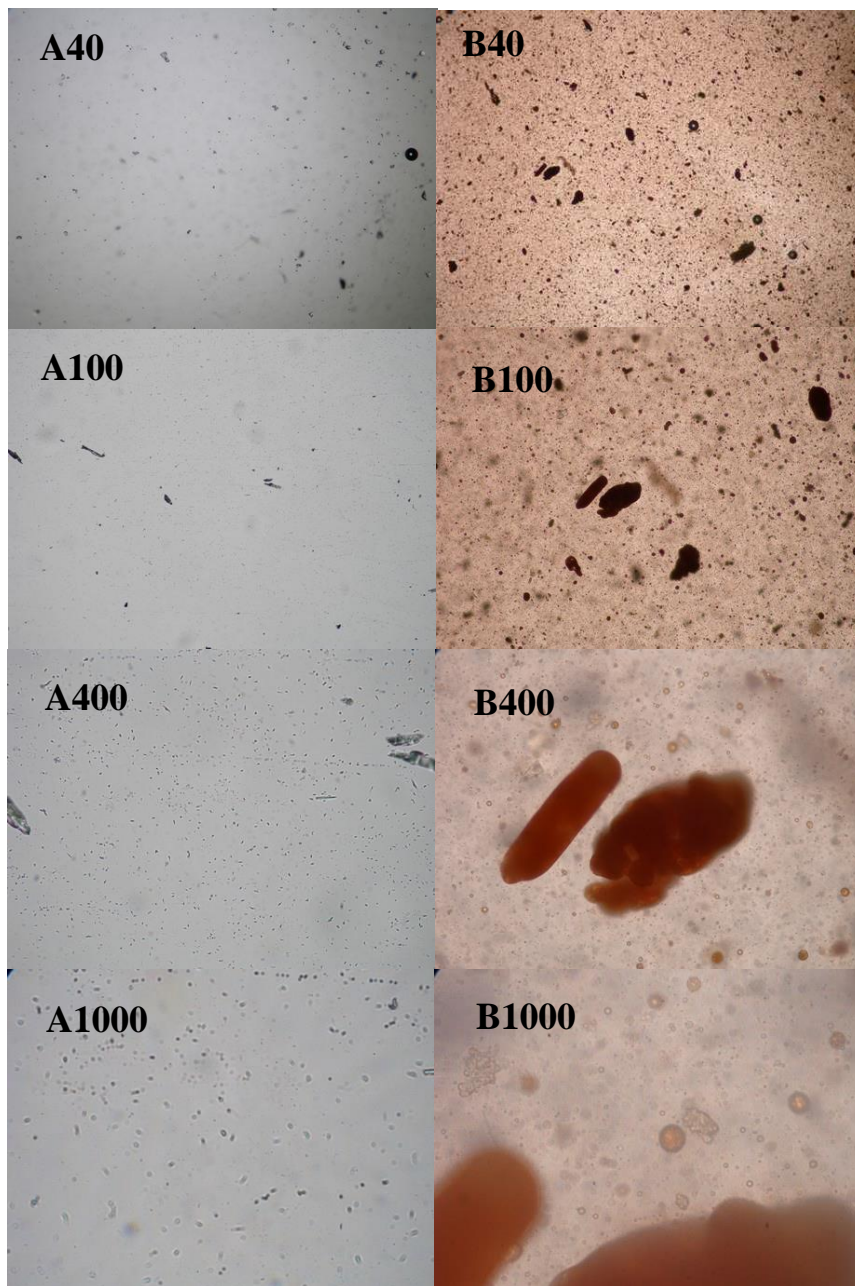
Curva padrão de quercetina para determinação do teor de flavonóides da amostra de própolis vermelha da região de Brejo Grande/SE.

**ANEXO II**



Fotomicrografias do gel natrosol antes (A) e após a incorporação do extrato de própolis a 1% (B), nos aumentos 40 (A40 e B40), 100 (A100 e B100), 400 (A400 e B400) e 1000 (A1000 e B1000) vezes.

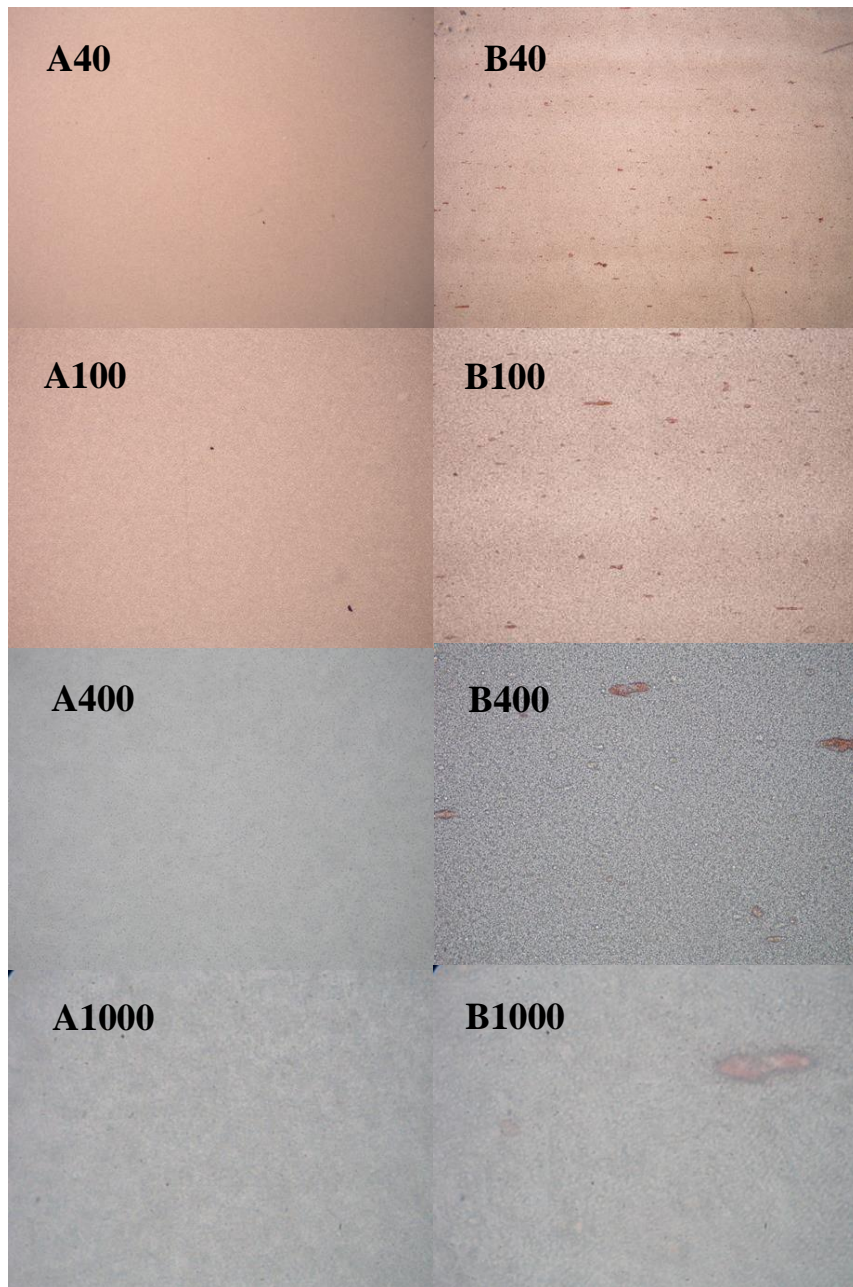
**ANEXO III**



Fotomicrografias do gel aristoflex® antes (A) e após a incorporação do extrato de própolis a 1% (B), nos aumentos 40 (A40 e B40), 100 (A100 e B100), 400 (A400 e B400) e 1000 (A1000 e B1000) vezes.

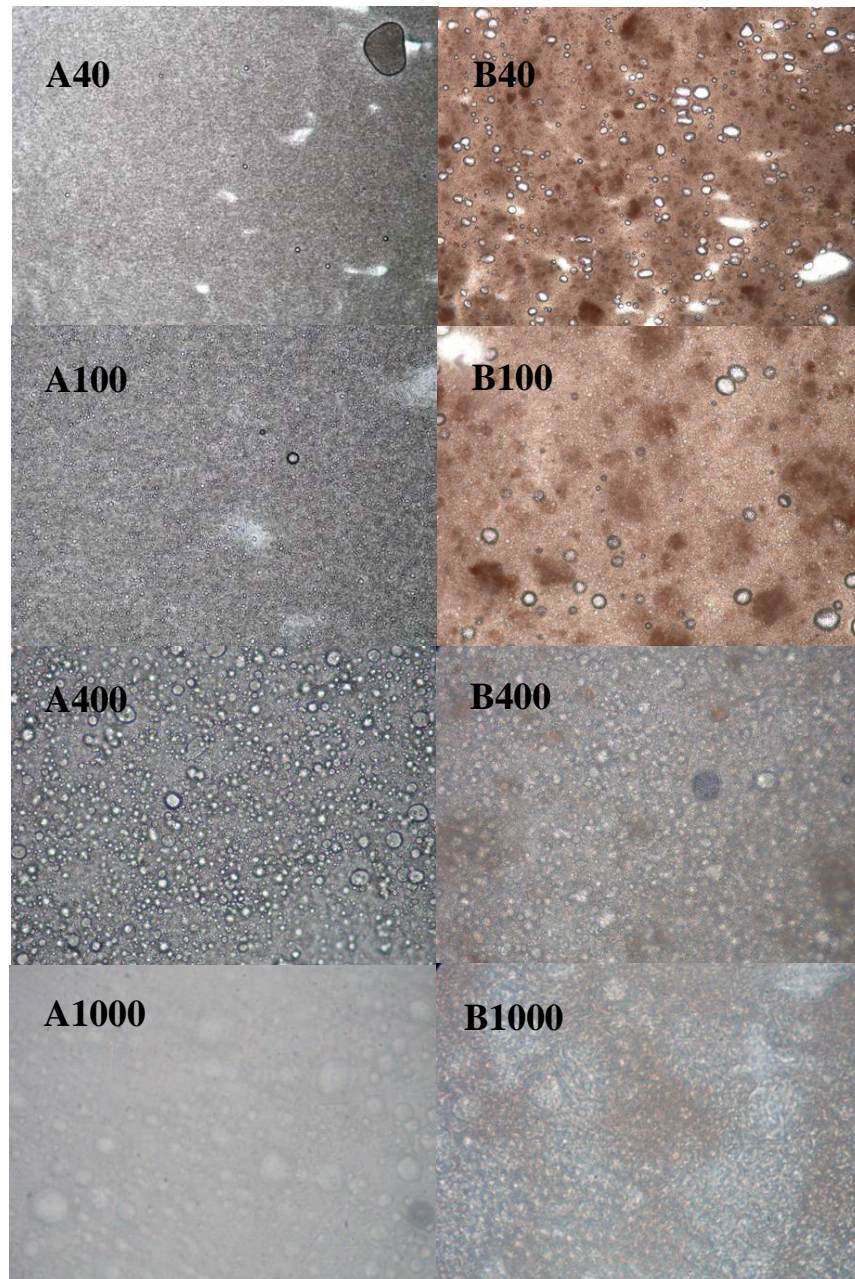


## ANEXO IV



Fotomicrografias do creme-gel Hostacerin® antes (A) e após a incorporação do extrato de própolis a 1% (B), nos aumentos 40 (A40 e B40), 100 (A100 e B100), 400 (A400 e B400) e 1000 (A1000 e B1000) vezes.

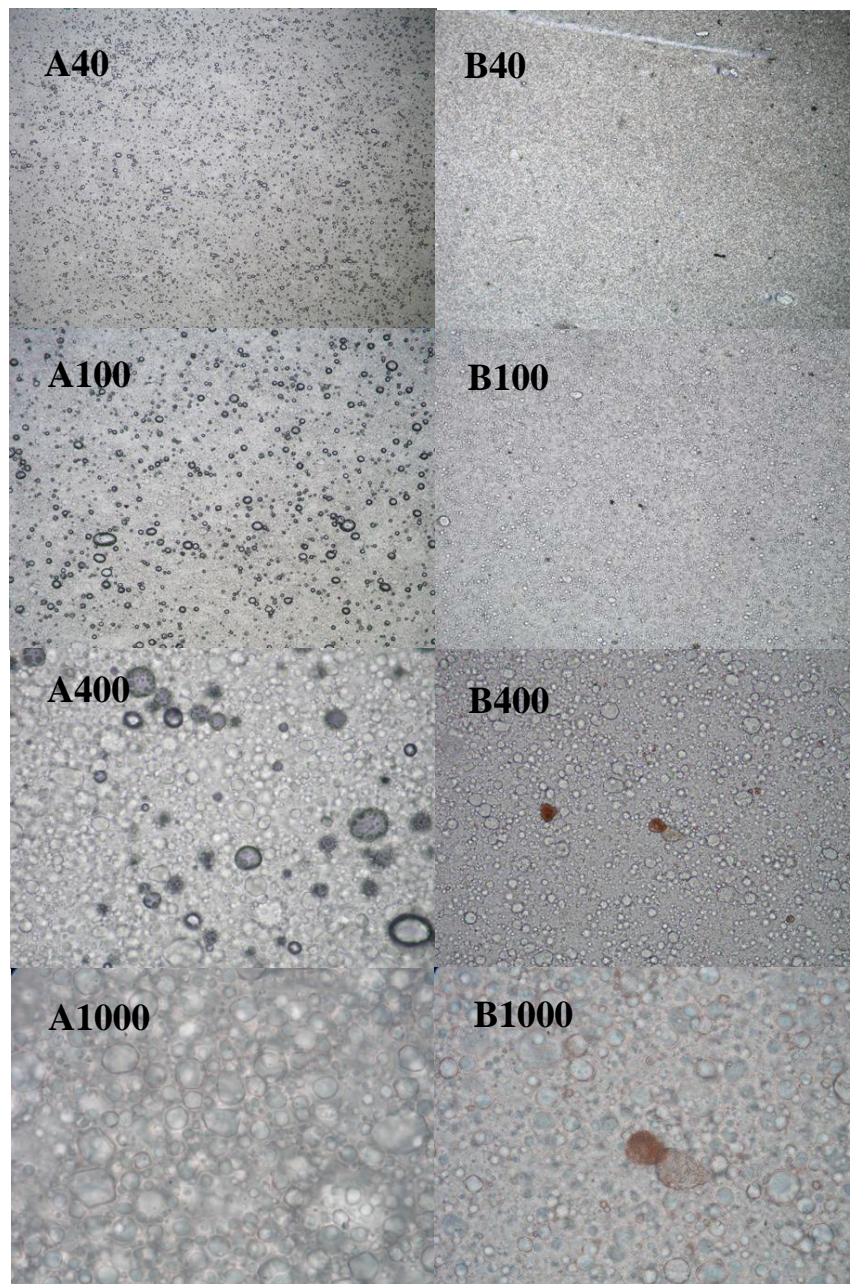
**ANEXO V**



Fotomicrografias do creme polawax® antes (A) e após a incorporação do extrato de própolis a 1% (B), nos aumentos 40 (A40 e B40), 100 (A100 e B100), 400 (A400 e B400) e 1000 (A1000 e B1000) vezes.



## ANEXO VI



Fotomicrografias do creme Lanette antes (A) e após a incorporação do extrato de própolis a 1% (B), nos aumentos 40 (A40 e B40), 100 (A100 e B100), 400 (A400 e B400) e 1000 (A1000 e B1000) vezes.



## ANEXO VII



Foto do creme-gel Hostacerin® (A), do creme Lanette® (B) e do creme polawax® (C) antes (A1, B1 e C1) e depois (A2, B2 e C2) da acidificação da formulação

## ANEXO VIII



Creme polawax® centrifugado a 33°C, 5000 RPM em 10 min.



Creme Lanette® centrifugado a 35°C, 5000 RPM em 10 min.



Creme – gel Hostacerin® centrifugado a 35°C, 5000 RPM em 10 min.